

## <Original Papers>The Mechanism of Glomerular Infiltration of Leukocytes in Human Crescentic Glomerulonephritis

著者	OOTAKA Tetsuya, SOMA Jun, SATO Toshinobu, SATO Hiroshi, SAITO Takao
journal or publication title	東北大学医療技術短期大学部紀要 = Bulletin of College of Medical Sciences, Tohoku University
volume	9
number	1
page range	63-70
year	2000-01-31
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/33722">http://hdl.handle.net/10097/33722</a>

## 半月体性腎炎における細胞浸潤機序について

大高 徹也, 相馬 淳\*, 佐藤 寿伸\*  
佐藤 博\*, 齊藤 喬雄\*\*

東北大学医療技術短期大学部 衛生技術学科

\*東北大学医学部 第二内科

\*\*東北大学医学部 血液浄化療法部

## The Mechanism of Glomerular Infiltration of Leukocytes in Human Crescentic Glomerulonephritis

Tetsuya OOTAKA, Jun SOMA\*, Toshinobu SATO\*,  
Hiroshi SATO\* and Takao SAITO\*\*

*Department of Medical Technology, College of Medical Science, Tohoku University*

*\*The Second Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine*

*\*\*Blood Purification Center, Tohoku University School of Medicine*

Key words: Crescentic Glomerulonephritis, Intercellular Adhesion Molecule

To investigate the mechanism of glomerular infiltration of leukocytes in human crescentic glomerulonephritis (pauci-immune type), we evaluated the correlation of the glomerular expression of ICAM-1 with the infiltration of leukocytes bearing LFA-1, CR3 and CR4 in intra- and extra-capillary areas respectively. On 21 ethanol-fixed paraffin-embedded renal biopsy specimens, the expression of these antigens was detected and demonstrated by 3-layer indirect immunoperoxidase method. The mean number of LFA-1<sup>+</sup>, CR3<sup>+</sup> and CR4<sup>+</sup> cells were calculated in extra- and intra-capillary areas respectively, while ICAM-1 expression in each area was evaluated by semi-quantitative scores, to 3+.

ICAM-1 was expressed both on glomerular epithelial cells and glomerular tufts in early stage of glomerular lesions and rapidly decreased together with the progression of the stage of crescent formation. Similarly, infiltration of leukocytes bearing LFA-1, CR3 and CR4 were observed both in extra- and intra-capillary areas in early stage of glomerular lesions and rapidly decreased together with the progression of the stage of crescent formation. These antigens started to decrease at the stage of cellular or fibro-cellular crescent and almost disappeared at the stage of fibrous crescent. Extra-capillary expression of ICAM-1 was significantly correlated with extra-capillary infiltration of LFA-1<sup>+</sup> cells ( $r=0.634, p<0.001$ ) and CR3<sup>+</sup> cells ( $r=0.517, p<0.05$ ). Intra-capillary expression of ICAM-1 was also significantly correlated with intra-capillary infiltration of LFA-1<sup>+</sup> cells ( $r=0.566, p<0.02$ ) but not with CR3<sup>+</sup> cells ( $r=0.171, NS$ ).

These results suggested that ICAM-1/LFA-1 interaction was involved in both the extra- and intra-capillary infiltration of leukocytes in early stage of human idiopathic crescentic glomerulonephritis.

## はじめに

半月体性腎炎は、臨床的には急速進行性糸球体腎炎の経過をとり、進行性に腎機能が低下し数週間から数カ月以内に末期腎不全または死に至り、最も予後不良の腎疾患の一つである。

これまで我々は、補体沈着と補体受容体との相互関係や接着因子発現とそのリガンド発現との関連に着目して、各種糸球体腎炎における糸球体白血球浸潤機序を検討してきた。表1は、インテグリンと接着因子との相互関係を示す。表に示す如く、LFA-1はICAM-1・ICAM-2・ICAM-3、CR3はC3bi・fibrinogen・ICAM-1、CR4はC3bi・fibrinogenをそれぞれリガンドとしているが、これまでの検討により、膜性増殖性糸球体腎炎では糸球体における補体活性化が補体受容体(CR3)を介した各種白血球浸潤に関与していること<sup>1)</sup>、IgA腎症では糸球体におけるICAM-1発現がLFA-1を介した白血球浸潤に関与していること<sup>2)</sup>を明らかにしてきた。

急速進行性糸球体腎炎(半月体性腎炎)を引き起こす糸球体疾患として、Goodpasture症候群やSLE等の抗GBM腎炎や免疫複合体型腎炎も知られているが、頻度は少なく、本腎炎の原因疾患としては、特発性半月体性腎炎・結節性多発動脈炎・Wegener肉芽腫症等の所謂pauci-immune型半月体性腎炎が大多数を占めている。前者では免疫複合体や免疫globulinの糸球体沈着を伴っているが、後者では半月体へのfibrin沈着が認められるのみで、免疫グロブリンや補体の沈着を伴

Table 1. Leukocyte integrins and ligands

Leukocyte integrin	CD number	Ligand
LFA-1	CD11a/CD18	ICAM-1
		ICAM-2
		ICAM-3
Mac-1 (CR3)	CD11b/CD18	C3bi
		Fibrinogen
		ICAM-1
		C3bi
p150, 95 (CR4)	CD11c/CD18	Fibrinogen

わず、その発症・進展機序については未だ不明な点が多い。本研究ではこのpauci-immune型半月体性腎炎を対象に、糸球体への炎症細胞浸潤機序を免疫組織学的に検討した。

## 対象及び方法

1. 対象：当院及び関連施設で腎生検を施行した半月体性腎炎21例を対象とした。表2に症例の臨床診断及び臨床像を示す。疾患の内訳は、特発性急速進行性糸球体腎炎18例、活動性腎炎の尿所見を呈した結節性多発動脈炎2例、Wegener肉芽腫症1例で、いずれも、免疫染色上はpauci-immune crescentic glomerulonephritisと診断された。

2. 抗体：表3に示す如く各種白血球マーカー及び接着因子・インテグリンに対する各種モノクローナル抗体を用い、糸球体・半月体における各種白血球浸潤・接着因子発現・インテグリン発現を酵素抗体法により検討した。各種マーカー陽性細胞数は、糸球体(管内)及びBowman腔(管外)のそれぞれにつき計測し、症例毎に平均値を算定した。ICAM-1の発現は、糸球体(管内)及びBowman腔(管外)のそれぞれにつき、-から3+

Table 2. Clinical findings of patients at renal biopsy

Diagnosis	
Idiopathic Crescentic GN	18 cases
Periarteritis Nodosa	2 cases
Wegener's Granulomatosis	1 case
Age (years)	61.3±10.5*
Sex (M:F)	12:9
Urine Protein (g/day)	3.0±2.6*
Urine RBC (/hpf)	
0-4	1 case
5-19	0 case
20-49	3 cases
50-99	15 cases
100-	2 cases
BUN (mg/dl)	58.7±26.4*
Cr (mg/dl)	4.4±2.6*

\*: mean±SD

**Table 3.** Antibodies used for immunocytochemical study

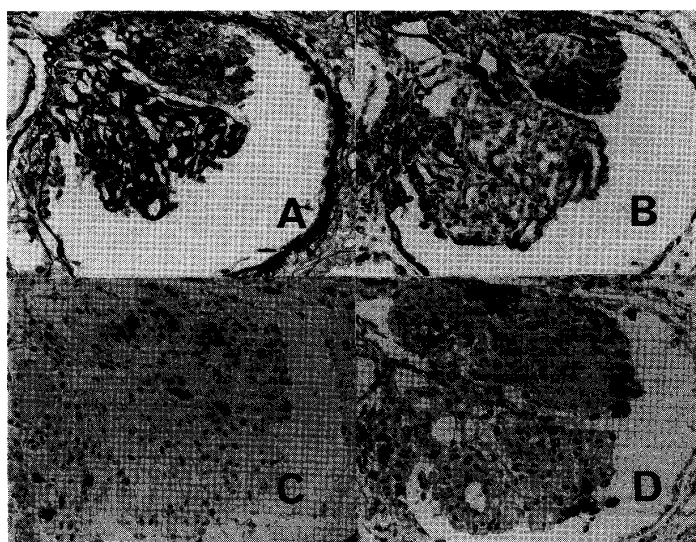
Antigen	CD number	Supplier	Clone
Immune Cells			
Common Leukocyte	CD45R	Dakopatts	2B11+PD7/26
T-cell	CD3	Dakopatts	T3-4B5
Monocyte/Granulocyte	CD15	Bekton-Dickinson	C3D-1
Macrophage	CD68	Dakopatts	EBM11
Integrin Family			
LFA-1 $\alpha$	CD11a	Dakopatts	MHM24
Mac-1	CD11b	Dakopatts	2LPM19c
p150, 95	CD11c	Dakopatts	KB90
Adhesion Molecule			
ICAM-1	CD54	Dakopatts	6.5B5
Epithelial antigen			
Vimentin		Dakopatts	V9

の4段階で評価し、症例毎に平均値を算定した。

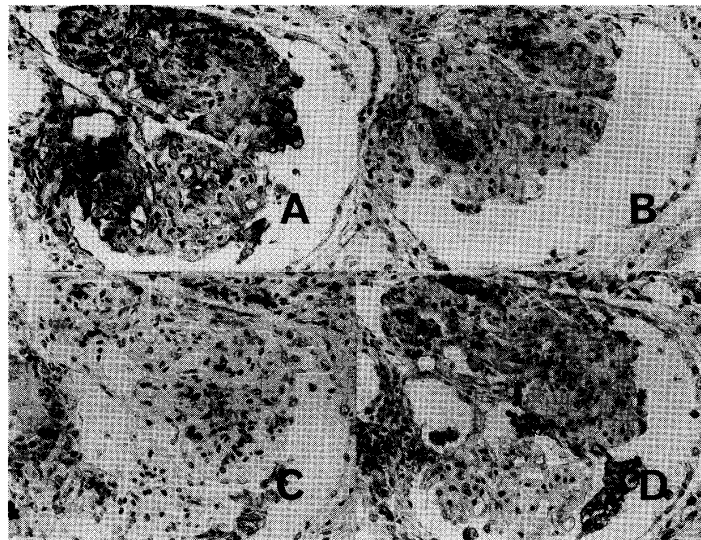
3. 統計解析：上述の各種免疫組織学的パラメーターにつき、相互の関連を Spearman の順位相関係数にて検討した。有意水準 0.05 以下を有意の相関とした。

## 結 果

1. 初期の糸球体病変：図1は半月体性腎炎初期の糸球体病変のPAS染色像(A)と、同じ糸球体におけるビメンチン発現(B)、CD15陽性単球/顆粒球浸潤(C)、CD68陽性マクロファージ浸潤(D)を示す。ビメンチン陽性の上皮細胞の増殖に



**Figure 1.** Micrographs of a glomerulus in early stage of crescentic glomerulonephritis by PAS staining (A) and immunoperoxidase staining showing the proliferation of vimentin<sup>+</sup> glomerular epithelial cells (B), the infiltration of CD15<sup>+</sup> granulocytes/monocytes (C) and CD68<sup>+</sup> macrophages (D). (counterstained with hematoxylin, magnifications  $\times 400$ )

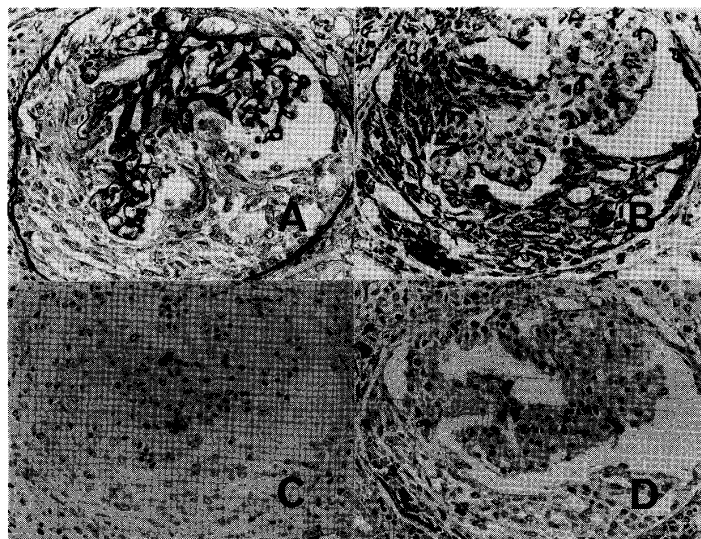


**Figure 2.** Micrographs of a glomerulus in early stage of crescentic glomerulonephritis by immunoperoxidase staining showing the expression of ICAM-1 (A) and the infiltration of LFA-1<sup>+</sup> (B), CR3<sup>+</sup> (C) and CR4<sup>+</sup> immune cells (D) (counterstained with hematoxylin, magnifications  $\times 400$ ).

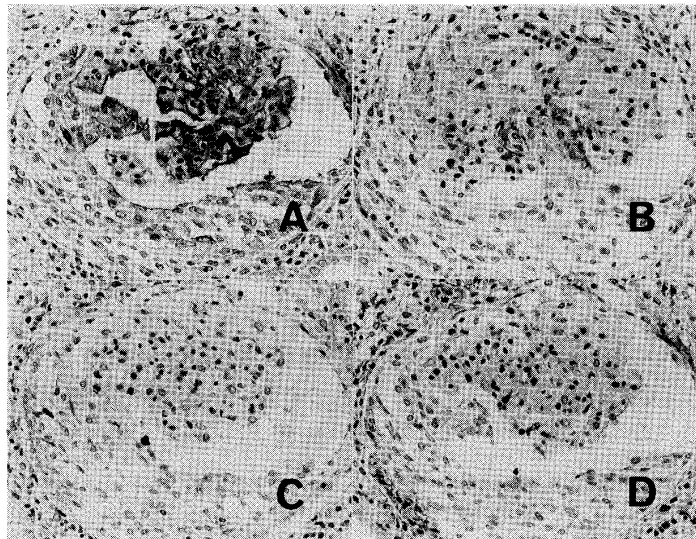
伴って管内，管外に単球/顆粒球・マクロファージの浸潤が多数認められる。図2は，同じ糸球体でのICAM-1発現(A)とLFA-1(B), CR3(C), CR4(D)の各種インテグリン陽性細胞の浸潤を示す。管外病変では増殖した上皮細胞と管外に遊出

したCD68陽性マクロファージに，また管内では内皮細胞とメサンギウム細胞にICAM-1の強い発現が見られ，同時に，管内・管外共に各インテグリン陽性細胞の浸潤が認められた。

2. 半月体形成期の糸球体病変：図3は明らか



**Figure 3.** Micrographs of a glomerulus with apparent crescent formation by PAS staining (A) and immunoperoxidase staining showing the proliferation of vimentin<sup>+</sup> glomerular epithelial cells (B), the infiltration of CD15<sup>+</sup> granulocytes/monocytes (C) and CD68<sup>+</sup> macrophages (D). The infiltrating leukocytes are obviously decreased compared with those in the glomerulus in early stage. (counterstained with hematoxylin, magnifications  $\times 400$ )



**Figure 4.** Micrographs of a glomerulus with apparent crescent formation by immunoperoxidase staining showing the expression of ICAM-1 (A) and the infiltration of LFA-1<sup>+</sup> (B), CR3<sup>+</sup> (C) and CR4<sup>+</sup> immune cells (D). These integrin<sup>+</sup> immune cells are obviously decreased together with the decrease of ICAM-1 expression. (counterstained with hematoxylin, magnifications ×400)

な半月体形成を伴う糸球体病変のPAS染色像(A)と、同じ糸球体におけるビメンチン発現(B), CD15陽性単球/顆粒球浸潤(C), CD68陽性マクロファージ浸潤(D)を示す。半月体に一致してビメンチンの強い発現が認められるが、管内、管外いずれの領域においても浸潤している単球/顆粒球・マクロファージの数は著明に減少している。図4は、同じ糸球体でのICAM-1発現(A)とLFA-1(B), CR3(C), CR4(D)の各種インテグリン陽性細胞の浸潤を示す。ICAM-1発現は著明に減弱し、各種インテグリン陽性細胞の浸潤も明らかに減少していた。細胞性半月体の形成と共に、ICAM-1発現の減弱、各種白血球の減少、各種インテグリン陽性細胞の減少が始まり、線維性半月体を伴う糸球体においては、いずれも殆どが消失していた。

3. 浸潤細胞と発現インテグリンとの関連: 表4は、管内病変・管外病変における各種白血球マーカー陽性細胞数と各種インテグリン陽性細胞数との関連を示す。管内病変では、単球/顆粒球とCR3, マクロファージとCR4との間に、管外病変では、T細胞とLFA-1, 単球/顆粒球とLFA1・CR3・CR4, マクロファージとCR4との間にそれ

**Table 4.** Spearman's rank correlation coefficients of immune cell integrins with immune cell markers

	CD45R	CD3	CD15	CD68
Glomerulus	Glomerulus			
LFA-1 $\alpha$	0.471*	0.318	0.216	0.394
CR3	0.590***	0.292	0.598***	0.491*
CR4	0.494*	0.470*	0.306	0.604***
Crescent	Hrescent			
LFA-1 $\alpha$	0.313	0.554**	0.666***	0.38
CR3	0.405	0.344	0.534**	0.361
CR4	0.460*	0.483*	0.554**	0.545**

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.02$ , \*\*\*:  $p < 0.01$

ぞれ明らかな正相関が見られた。

4. ICAM-1発現と各種浸潤白血球・インテグリン陽性細胞との関連: 表5は管内・管外病変における、ICAM-1発現と各種浸潤白血球数との関連を示す。管内・管外病変ともに、ICAM-1発現とマクロファージとの間に有意の正相関が見られた。表6は管内・管外病変における、ICAM-1発現と各種インテグリン陽性細胞数との関連を示

**Table 5.** Spearman's rank correlation coefficients of ICAM-1 expression with infiltrating immune cells

	CD45R	CD3	CD15	CD68
Glomerulus	Glomerulus			
ICAM-1	0.311	0.321	0.297	0.620*
Crescent	Crescent			
ICAM-1	0.280	0.388	0.408	0.629**

\*:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.005$ **Table 6.** Spearman's rank correlation coefficients of ICAM-1 expression with integrins of immune cells

	LFA-1 $\alpha$ (CD11a)	CR3 (CD11b)	CR4 (CD11c)
Glomerulus	Glomerulus		
ICAM-1	0.566**	0.171	0.534**
Crescent	Crescent		
ICAM-1	0.634***	0.517*	0.737****

\*:  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.02$ , \*\*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*\*:  $p < 0.001$ 

す。管内・管外病変ともに、ICAM-1 発現と LFA-1・CR4 との間に有意の正相関が見られた。管外病変では ICAM-1 発現と CR3 との間にも有意の正相関が見られた。

## 考 察

半月体性腎炎は、臨床的には急速進行性糸球体腎炎の経過をとり、予後不良の腎疾患であるが、その発症機序については不明な点が多い。半月体は種々の糸球体疾患で観察されるが、Patey らは急性糸球体腎炎・IgA 腎症・紫斑病性腎炎及び抗 GBM 腎炎・免疫複合体型腎炎を含む急速進行性糸球体腎炎等、各種糸球体疾患の半月体における接着因子発現およびインテグリン発現を検討し、初期の病変における、ICAM-1/LFA-1 相互作用を介した炎症細胞浸潤機序を示唆している<sup>3)</sup>。これまで我々は、糸球体への炎症細胞浸潤機序が糸球体疾患毎に異なる可能性を示しているが<sup>1)2)</sup>、糸

球体疾患として均一な集団として pauci-immune 型半月体性腎炎症例を対象とした検討は未だ行われていないようである。一方、ラット抗 GBM 腎炎等、半月体性腎炎の実験モデルでの炎症細胞浸潤機序の検討も行われている。Nishikawa らは、ラット抗 GBM 腎炎で、糸球体の ICAM-1 発現と LFA-1 陽性 T 細胞・単球・マクロファージの浸潤が、腎炎の発症に伴って観察されること、また本モデルで ICAM-1 または LFA-1 に対する抗体を投与すると、腎炎の発症や半月体形成が抑制されることから、ICAM-1/LFA1 相互作用による T 細胞と単球・マクロファージの浸潤が腎炎の開始とそれ以降の進行に決定的な影響を与えると報告している<sup>4)</sup>。また、Kawasaki らは、同様の実験腎炎で、腎炎の発症進展に、CD8 陽性 NK 細胞の重要性を示している<sup>5)</sup>。

一方半月体の形成には、糸球体上皮細胞と T-リンパ球・マクロファージの関与が考えられる。Coers らは、rat を用いた pauci-immune 型実験腎炎で、糸球体における IFN- $\gamma$  産生に引き続き、糸球体 ICAM-1・MHC class I・MHC class II 発現、IL-1 $\beta$ ・TNF- $\alpha$  産生が観察されること、in vitro の検討で、糸球体上皮細胞が T-リンパ球由来の IFN $\gamma$  の刺激により、ICAM-1・MHC class I・MHC class II を発現することを報告している<sup>6)</sup>。同様に Moutabarrik らは、in vitro の検討で、マクロファージ由来の IL-1 $\beta$  が糸球体上皮細胞に作用し、IL-6 の産生や ICAM-1 発現を誘導することを報告しており<sup>7)</sup>、上皮細胞が、浸潤細胞との相互作用により接着分子や MHC 抗原の発現、サイトカイン放出を引き起こし、糸球体の局所的な炎症の持続に重要であることが推定されている。

今回ヒトの pauci-immune 型半月体性腎炎を対象とした検討では、極めて早期の糸球体病変において管内（糸球体）・管外（上皮細胞）病変ともに、ICAM-1 発現と各種白血球の浸潤が見られたが、糸球体病変の陳旧化と共にいずれも減弱・消失した。ICAM-1 は、浸潤細胞の他、糸球体上皮・内皮・メサンギウム細胞など、糸球体管外・管内の内在性細胞に主に発現していたが、糸球体管内

ICAM-1 発現は糸球体管内 LFA-1 陽性細胞数と有意の相関を示し、管外上皮細胞 ICAM-1 発現は管外 LFA-1 陽性細胞・CR3 陽性細胞数と有意の正相関を示したことから、糸球体管内への免疫担当細胞浸潤に ICAM-1/LFA-1 相互作用が、管外病変への免疫担当細胞浸潤に ICAM-1/LFA-1 相互作用及び ICAM-1/CR3 相互作用が関与していることが示唆された。これらの所見は、ヒト半月体性腎炎においても、前述の実験半月体性腎炎と同様、糸球体内在性細胞に ICAM-1 発現が誘導され、免疫担当細胞の糸球体への持続的浸潤を引き起こす結果、糸球体細胞の破壊・傷害が進展することを示唆しているものと思われる。本腎炎では、糸球体への細胞浸潤を直接引き起こす抗原などの存在は知られておらず、免疫担当細胞の糸球体浸潤における最初のステップとなる機序はいまだ明らかではない。今回の検討では、糸球体・上皮細胞の ICAM-1 発現は、各々管内・管外のマクロファージ浸潤と有意の正相関を示したが、前述の *in vitro* の知見も考え合わせ、浸潤細胞、特にマクロファージ由来のサイトカイン(IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ )により、糸球体内在性細胞に ICAM-1 発現が誘導されることが推察される。半月体性腎炎、特に pauci-immune 型半月体性腎炎においては、糸球体への免疫複合体や補体の沈着が殆ど見られないことから、免疫複合体や補体を介した炎症細胞浸潤機序は考えにくく、今回の知見は本症における腎炎の発症・進展機序の特異性を示すものとして興味深いものと思われる。

### ま と め

ヒト pauci-immune 型半月体性腎炎における接着因子発現と各種インテグリン陽性細胞浸潤の関連を検討した。

糸球体管内の ICAM-1 発現は管内 LFA-1 陽性細胞数と有意の相関を示したことから、管内病変への免疫担当浸潤には ICAM-1/LFA-1 相互作用が関与しているものと考えられた。上皮細胞の ICAM-1 発現は管外 LFA-1・CR3 陽性細胞数と有意の相関を示したことから、管外病変への免疫担当浸潤には ICAM-1/LFA-1 相互作用及び

ICAM-1/CR3 相互作用が関与しているものと考えられた。

また、糸球体・上皮細胞ともに、その ICAM-1 発現は各々管内・管外のマクロファージ浸潤と有意の正相関を示し、両者へのマクロファージ浸潤に ICAM-1 発現が深く関与していること、また、これらの ICAM-1 発現にマクロファージ由来のサイトカインが関与していることが示唆された。

### 文 献

- 1) Soma J, Saito T, Seino J, Sato H, Ootaka T, Yusa A, Abe K.: Participation of CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in membranoproliferative glomerulonephritis type I. Clin. Exp. Immunol, **100**, 269-276, 1995
- 2) Ootaka T, Saito T, Soma J, Yusa A, Abe K.: Intercellular adhesion molecule-1/leukocyte function associated antigen-1-mediated and complement receptor type 4-mediated infiltration and activation of glomerular immune cells in Immunoglobulin A nephritis. Am. J. Kidney Dis., **28**, 40-46, 1996
- 3) Patey N, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L, Noel LH.: Adhesion molecules in human crescentic glomerulonephritis. J. Pathol., **179**, 414-20, 1996
- 4) Nishikawa K, Guo YJ, Miyasaka M, Tamatani T, Collins AB, Sy MS, McCluskey RT, Andres G.: Antibodies to intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 prevent crescent formation in rat autoimmune glomerulonephritis. J. Exp. Med., **177**, 667-77, 1993
- 5) Kawasaki K, Yaoita E, Yamamoto T, Tamatani T, Miyasaka M, Kihara I.: Antibodies against intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 prevent glomerular injury in rat experimental crescentic glomerulonephritis. J. Immunol., **150**, 1074-83, 1993
- 6) Coers W, Brouwer E, Vos JT, Chand A, Huitema S, Heeringa P, Kallenberg CG, Weening JJ.: Podocyte expression of MHC class I and II and intercellular adhesion molecule-1



(ICAM-1) in experimental pauci-immune crescentic glomerulonephritis. Clin. Exp. Immunol., **98**, 279-86, 1994

7) Moutabarrak A, Nakanishi I, Zaid D, Namiki

M, Kawaguchi N, Onishi S, Ishibashi M, Okuyama A.: Interleukin-1-beta activation of cultured glomerular epithelial cells. Experimental Nephrology, **2**, 196-204, 1994