

学 位 論 文 題 名

ヒト IgA 腎症凍結腎組織からの IgA の 抽出の試みとその抗体特異性の解析

学位論文内容の要旨

I. 目的

IgA腎症はわが国で最も多く認められる原発性糸球体疾患である。本症の病因については、血中IgA高値の症例が23%程度認められること、血中のIgA型免疫複合体の上昇が認められること、また腎生検組織において、IgAとともにC3の沈着が認められること、さらに電子顕微鏡で免疫複合体型の高電子密度沈着物質が認められることなどから、何らかの抗原刺激が加わりその結果生じたIgA主体の免疫複合体が腎糸球体に沈着することが本症の発症に関与しているものと考えられている。

本研究はIgA腎症の病因解析を目標とし、ヒトIgA腎症の凍結腎組織からIgAを効率よく抽出する方法を模索し、抽出したIgAの抗体特異性の解析を行った。

II. 材料と方法

1) IgA腎症モデルマウスからクエン酸を用いて抽出したIgA抗体の抗体活性の解析

IgA型マウスモノクローナル抗DNP抗体4mgとDNP-BSA2mgを、BALB/cマウス尾静脈から投与した。48時間後に採血し、両腎を摘出した。腎組織からクエン酸緩衝液及び抗マウス-Sepharose 4Bを用いてIgAを抽出精製した。抽出IgAのDNPに対する抗体活性をWestern blot法およびELISA法で解析した。

2) ヒトIgA腎症凍結腎組織からの抽出IgAの検討

ヒトIgA腎症凍結切片に、クエン酸緩衝液処理のみ、コラゲナーゼ処理5分、10分、30分後クエン酸緩衝液処理を行い、FITC標識抗ヒトIgA抗体で染色性の減弱を検討した。ヒトIgA腎症凍結生検組織50 μ lからクエン酸緩衝液またはコラゲナーゼ/クエン酸緩衝液で抽出したIgA分画を抗ヒトIgA抗体を用いてWestern blot法で解析した。IgA型マウスモノクローナル抗DNP抗体を、クエン酸緩衝液処理またはコラゲナーゼ/クエン酸緩衝液処理し、DNPに対する抗体活性をELISA法で解析した。

3) 抽出IgAと腎可溶化分画との反応性の検討

IgA腎症患者凍結生検組織から抽出したIgAと同検体から作成した腎可溶化分画との反応性をWestern blot法で解析した。IgA腎症9症例の生検混合組織から抽出したIgA5 μ gと同組織から作成した腎可溶化分画との反応性を解析した。

4) 抽出IgAと細菌抗原との反応性の検討

ヒトIgA腎症凍結腎生検組織10検体、肝硬変によるIgA陽性の剖検腎1検体および肺癌症例のIgA陰性の剖検腎から抽出したIgA各3 μ g/mlと、*Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*)、*Streptococcus pneumoniae*、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa*の細菌可溶性蛋白との反応性を解析した。IgA腎症患者5例およびIgA陽性の9症例の剖検腎組織から抽出したIgAと、*H. influenzae*可溶性蛋白との反応性をWestern blot法で解析した。

5) 血清IgA、IgGと*H. influenzae*34kDa抗原との反応性の検討

IgA腎症患者12例、肝硬変患者10例および健常人10例の血清中IgGおよびIgAと細菌抗原との反応をWestern blot法で解析した。

Ⅲ. 結果

1) モデルマウス腎から抽出したIgAの抗体活性

腎組織から抽出したIgAは、血清中IgAに比べてDNPに対する抗体活性が高くみられた。Western blot法で腎可溶性蛋白中の66kDaのDNP-BSAと抽出IgAとの反応を認めた。

2) ヒトIgA腎症腎組織からの抽出IgAの検討

IgA腎症凍結切片にコラゲナーゼ/クエン酸緩衝液処理を行うことで糸球体沈着IgAの著明な低下がみられた。IgA腎症凍結組織から抽出精製したIgA分画に対しWestern blot解析を行い56kDaのIgA heavy 鎖を確認した。コラゲナーゼ処理を加えた抽出法は、クエン酸緩衝液のみの抽出法に比べ、IgA回収量が増加していた。コラゲナーゼ処理によってIgA型マウスモノクローナル抗体の抗体活性の低下は認められなかった。

3) ヒトIgA腎症凍結腎組織から抽出したIgAと腎可溶性分画との反応

各腎組織から抽出したIgAと腎可溶性分画との反応は認められなかった。

4) 抽出IgAと細菌抗原との反応

IgA腎症10検体混合組織から抽出したIgAは、*H. influenzae*34kDa抗原と反応した。またIgA腎症5例中3例および、IgA陽性の剖検腎9例中3例から抽出したIgAは*H. influenzae*34kDa抗原と反応を示した。

5) 血清中IgG、IgAと*H. influenzae*34kDa抗原との反応

IgA腎症12例中2例、肝硬変患者10例中4例、健常人10例中3例の血清中IgAと34kDa抗原との反応が認められた。各群のIgG、IgAともに反応陽性率に有意差は認めなかったが、IgA腎症患者及び肝硬変患者血清中IgAと34kDa抗原との反応は健常人血清IgAに比べて強い傾向を示した。

Ⅳ. 考察

IgA腎症の責任抗原については、食餌抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、内因性抗原など多くの報告がある。今回の検討で、コラゲナーゼ/クエン酸緩衝液処理を行うことで患者腎組織から沈着IgAを抗体活性を保った状態で有効に抽出することが可能であることが示された。IgA腎症生検腎組織から抽出したIgAと腎可溶性分画との反応性は認められず、沈着している抗原は微量であると考えられた。IgA腎症および肝硬変などに伴うIgA陽性の剖検腎から抽出したIgAで*H. influenzae*34kDa抗原と反応する症例があることから、この抗原が糸球体沈着IgAの責任抗原の一つである可能性があると考えられる。今回の検討で腎組織か

ら抽出したIgAが34kDa抗原と反応を示した症例や、血清中IgAが強い反応性を示した症例においては、健常人に比べて34kDa抗原に対し、過剰なIgAを産生した可能性が指摘できる。今後この34kDa抗原の糸球体への沈着の有無の解析や、血清中の34kDaに対する特異的抗体価を定量的に検討する必要があると考えられた。

V. 結語

モデルマウス腎組織からクエン酸緩衝液を用いて腎沈着IgAを活性を失わない状態で抽出しうることを応用し、ヒトIgA腎症腎組織から従来のクエン酸緩衝液のみの抽出法にコラゲナーゼ処理を加えることで、有効にIgAを抽出可能であることを証明した。IgA腎症患者腎からこの方法を用いて抽出したIgAは*H. influenzae* 34kDa抗原と反応する症例がみられ、本疾患における糸球体沈着IgAの責任抗原の一つとして同抗原の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

ヒト IgA 腎症凍結腎組織からの IgA の 抽出の試みとその抗体特異性の解析

学位論文の内容は、IgA腎症の病因解析を最終目標としたもので、ヒトIgA腎症の凍結腎組織からIgAを効率よく抽出するための予備実験として、まずIgA沈着モデルマウスから、クエン酸緩衝液を用いて抽出したIgAの抗体活性をELISAおよびWestern blot法で確認した。次にヒトIgA腎症凍結腎組織から従来のクエン酸緩衝液のみの抽出法に加えてコラゲナーゼ処理を併用することによって、IgAの抗体活性を保ったまま効率よく抽出しうることを確認した。抽出IgAの抗体特異性の解析をWestern blot法で行ったところ、患者腎可溶化分画との反応は認められず、4種類の細菌抗原との反応解析では、*H. influenzae* 34kDa抗原との反応を認めた。症例を増やして検討すると、IgA腎症5例中3例、および肝硬変や胆汁うっ滞などのIgA陽性剖検腎9例中3例から抽出したIgAにおいても反応がみられた。血清中のIgA、IgGと*H. influenzae* 34kDa抗原との反応は、IgA腎症12例、肝硬変10例、健常人10例で陽性率に有意な違いは認めなかった。以上のことから本研究の結論として、IgA腎症患者腎組織からコラゲナーゼを用いて抗体活性を保持したまま有効にIgAを抽出しうることを、そして腎糸球体沈着IgA抗体の責任抗原のひとつとして*H. influenzae* 34kDa抗原の可能性があることが示された。

学位論文発表後、副査の小林邦彦教授から、本研究では抽出IgAと腎可溶化分画との反応性は認められず、腎臓に沈着しているIgAは免疫複合体として沈着していない可能性も考えられる。沈着IgA自体の異常が腎糸球体沈着に関与していることも考えられるが、抽出IgA自体の解析についてはどのような解析をしているかとの質問があった。この質問に対し、申請者は患者血清中IgAの糖鎖異常の報告を引用し、腎抽出IgAに関しても今後糖鎖異常の有無の解析を行う予定であると述べた。また、同教授から、腎抽出IgAと腎可溶化分画との反応性のより鋭敏な解析方法として、腎可溶化蛋白をRIでラベルし、腎抽出IgAおよび抗ヒトIgA抗体を用いて免疫沈降法で特異的な抗原を解析する方法を用いてはとの助言があった。

続いて副査の小池隆夫教授から、細菌抗原と腎抽出IgAとの反応性の解析において、*Haemophilus influenzae*、*Streptococcus pneumoniae*、*Escherichia coli*、

*Pseudomonas aeruginosa*の4種類に限ったのは何故かという質問があった。申請者はまずWestern blot解析を行うに際して、腎抽出IgAを有効な濃度で細菌抗原と反応させるためには、4種類以上は難しいこと、更に本疾患が上気道炎感染で増悪すること、慢性的な抗原刺激が本疾患の発症に関与しているのではないかと考え、*H. influenzae*、*Str. pneumoniae*を選択し、腎糸球体にIgAがしばしば沈着するような肝硬変患者において*E. coli*、*P. aeruginosa*が高頻度で分離されることからこれらの細菌を選んだ旨を述べた。さらに小池隆夫教授から、IgA腎症患者でIgAが*H. influenzae* 34kDa抗原と反応性を認めた症例に関しては、病歴に他の症例と違いはみられたかとの質問があった。この質問に対し、申請者は、腎抽出IgAが34kDa抗原と反応があった症例においては、ネフローゼ症候群や高血圧を示したといったような臨床上的特徴はみられなかったが、血清中IgAが反応性を示した2症例においてはまだ臨床病歴を検討していないと答えた。更に小池隆夫教授から、腎抽出IgAは今回の研究からはheterogeneousであるという考察であるが、もしもoligoclonalなものであれば、腎抽出IgAを固相化し、ランダムペプチドライブラリーを用いて、抗体のエピトープを決定するという方法もあるとの助言があった。

主査の吉木敬教授からは、34kDa抗原の患者腎組織上の局在の有無について、特異的抗体を用いた染色による解析は行っているかとの質問があった。申請者は、34kDa抗原についてはアミノ酸解析を含め現在検討中であり、34kDa抗原に対する特異的抗体については申請者自身が作製する予定であり、既知の*H. influenza*外膜蛋白に対する抗体で34kDaに特異性がある可能性がある抗体を入手し、腎組織を染色する準備を進めている旨を述べた。

本論文は、ヒトIgA腎症凍結腎組織からIgAを抗体活性を保ったまま従来のクエン酸緩衝液のみの抽出方法に比べてコラゲナーゼを加えることでより有効に抽出することができることを報告したこと、更に責任抗原の一つとして*Haemophilus influenzae* 34kDa抗原を同定した点で高く評価され、腎抽出IgAの構造異常の解析や、指摘された解析方法を用いた抗体特異性の解析を行うことで、今後IgA腎症の病因解明と臨床応用の可能性が期待される。

審査員一同は、これらの成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位等も併せ申請者が博士（医学）の学位を受ける資格を有するものと判定した。