

自己免疫病マウスMRL/lprの糸球体腎炎発症機序におけるIgG3産生の重要性

著者	高橋 智
号	1088
発行年	1991
URL	http://hdl.handle.net/10097/20482

論 文 内 容 要 旨

MRL/lprマウスは、ヒトSLE類似の糸球体腎炎を自然発症するモデル動物として知られているが、その糸球体腎炎発症機序については、抗DNA抗体や、gp70抗gp70抗体免疫複合体が重要であるとの報告がなされているが、今だ明らかにされてはいない。そこで本研究では、如何なる抗体分子が糸球体腎炎発症に関与しているかについて解析した。

1. 血清中、腎抽出液中のIgGサブクラスの定量

始めにこのマウスの、血清中、さらには腎臓に沈着しているIgGについて、サブクラス毎の定量を試みた。定量はSRID法により行った。その結果、血清中では、IgG2aが最も多いサブクラスであることが確認された。しかし、腎抽出液中では血清中に多量にあるIgG2aではなく、IgG3が最も多量にあり、選択的に腎臓に沈着していることが明らかとなった。また、血清中のIgG3の約半分が、免疫複合体様になっていることが確認された。

2. サイクロスポリンA投与におけるIgGサブクラスの質、量に対する影響

次に、MRL/lprマウスの糸球体腎炎の発症を抑えることが報告されているサイクロスポリンAの投与により、IgGのサブクラスがどの様に变化するかを解析した。MRL/lprマウスを投与時期により3群に分け、サイクロスポリンAを50mg/kgで、週6日の経口投与を行った。サイクロスポリンAは、全ての群で糸球体腎炎の発症を完全に抑制すると共に、血清中のIgG3量、さらにはmRNAの量を抑制し、荷電に影響を与えた。しかしながら一方で、IgG2aには何等影響を与えないことが明らかとなった。

3. ハイブリッドマウスにおけるIgG3 mRNA量と糸球体腎病変との相関

さらに、糸球体腎炎をランダムに発症するMRL/lpr×(MRL/lpr×C3H/lpr) F1ハイブリッドマウスの系において、IgG3、IgG2a mRNA量と糸球体腎炎の病変の重症度との相関について解析した。12-20週齢のハイブリッドマウスの脾臓よりGTC/CsCl法によりRNAを抽出し、ノーザンブロット、ドットブロットを行なった。得られた結果をデンスitomーターで数値化し解析した。その結果、糸球体腎炎の重症度とIgG3 mRNAの量は相関係数 $R=0.79$ と強い正の相関を示すが、IgG2a mRNAの量とは $R=0.29$ と殆ど無相関だった。

4. 糸球体腎炎惹起性モノクローナルIgG3抗体の作出

IgG3が、糸球体腎炎発症に重要であることをより明らかにするために、MRL/lprマウスよりモノクローナルIgG3抗体を作成し、糸球体腎炎惹起能を調べた。MRL/lprマウスの脾細胞とNS-1細胞を融合し、ハイブリドーマ細胞を得た。得られた細胞をIgG3産生で選択し、クローニングを行い21のクローンを得た。その21クローンのIgG3産生ハイブリドーマのうち、5クローンが腎炎惹起性であった。このことは、IgG3の糸球体腎炎発症における重要性の直接証明であると共に、ある特定のV regionを持ったIgG3だけが腎炎惹起性であることを示唆している。

5. モノクローナルIgG3抗体の塩基配列の解析

そこでそれぞれの抗体の塩基配列について調べ、どのような構造が糸球体腎炎発症に重要であるかを調べた。得られた腎炎非惹起性のクローンよりcDNAライブラリーを作成し、抗体遺伝子をクローニングしIgG3のC region, kappa light chainのC regionについて塩基配列を決定した。その結果、正常のBALB/cとの間に差が無いことが明らかとなった。このことはIgG3の定常部領域だけでは病原性が発揮されないという、ハイブリドーマの解析とも一致する。そこで、V regionの解析を腎炎惹起性のクローンについて行った。解析を迅速に行うために、PCR法を利用した。その結果V regionのD segmentが糸球体腎炎を惹起するのに重要である事が示唆された。

以上のようにMRL/lprマウスの糸球体腎炎発症に於て、その原因の全てではないにしろ、IgG3サブクラスの抗体が重要であることが、明らかにできたのではないかと考える。

審査結果の要旨

腎炎のメカニズムは、病気そのものの多彩さもあって、その全貌は解明されないままである。腎炎のなかで比較的因果関係が明らかであろうと思われる免疫複合体型のものでも血中循環免疫複合体が必ずしも糸球体にすべて沈着するわけでもなく、逆にすべての複合体型腎炎はin situで作られる、即ち抗原と抗体は別々に血中を流れているとの説もあり一定していない。申請者、高橋智は、ヒトSLE類似の免疫複合体型腎炎を100%、さらに動脈炎、慢性関節炎も高率に自然発症することで知られるMRL/Mp-lpr/lprマウスの免疫複合体型腎炎において、いかなる抗体分子がその発症に関係しているかを、病理組織学的検索からスタートして、最終的には抗体の分子構築に依存することを見出したものである。以下、5段階から成る研究である。

①MRL/lprマウスの血清免疫グロブリンは量的にはIgG2aが最も多いが、IgG3は50%が免疫複合体型になっており、それが選択的に腎糸球体に沈着していた。

②サイクロスポリンAは糸球体腎炎の発症を完全に抑制するが、これは血清中のIgG3量さらにはmRNAの量も抑制し、荷電に影響を与えたためである。

③MRL/lprとC3H/lprのF2バッククロス系において、糸球体腎炎の重症度とIgG3mRNAの量は強い正の相関を示した。

④MRL/lpr脾細胞とNS-1細胞の融合からIgG3産出ハイブリドーマ21株を得、内5クローンが腎炎惹起性であった。しかもその病像はクローン毎にそれぞれ特徴をもっていた。

⑤これらのIgG3モノクロナル抗体の構造上に催腎炎性の特徴があるか否かを求めて、塩基配列を調べたところ、重鎖のC領域と軽鎖カッパのC領域は、対照のBALB/Cのそれと1ヶ所（カッパのCodon205）以外は全く同じであり、しかもその変化もサイレントであった。そこでV領域を比較した所、催腎炎性IgG3モノクロナル抗体のD segmentが、非腎炎株に比し変動が激しく、この部分に催腎炎性のあることが示唆された。さらに、この部分の違いだけで腎炎の病像が変わることも明らかとなった。これらのIgG3はいずれもクリオグロブリンであるが、クリオグロブリンだけでは腎炎は起こらず、このD領域の変動が必要と考えられる。

以上、この一連の研究は、糸球体腎炎という病像の現場から、その病因を分子生物学的に追いつめて、遂にIgG3クリオグロブリンのvariable portionのD segmentの異常が腎炎を起こし、さらにその病像をも決めてしまうということを発見した研究で、糸球体腎炎の病因論に大きなインパクトを与える素晴らしい研究であり、東北大学医学博士を與えるに充分ふさわしいものと認める。