

学 位 論 文 題 名

Glomerular expression of collagen IV  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$   
and  $\alpha 5$  chains in childhood IgA nephropathy

(小児 IgA 腎症の糸球体における  
IV 型コラーゲン  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  鎖の発現)

学位論文内容の要旨

1. 概要

IgA 腎症においてよく見られる糸球体基底膜(GBM)障害の程度は、その腎予後と深く関連すると考えられている。IV 型コラーゲンは、最も重要な GBM 構成成分の一つで、その発現様式の変化は GBM の構造変化をもたらし得る。今回の研究では、21 名の小児 IgA 腎症患者を対象に、IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$  および $\alpha 5$  鎖 [ $\alpha 1$ (IV)、 $\alpha 3$ (IV)、 $\alpha 5$ (IV)]の GBM における発現様式の変化を、新鮮凍結標本を用いたペルオキシダーゼ染色により明らかにした。

2. 背景と目的

IgA 腎症は、小児期において最もよくみられる原発性糸球体腎炎であり、発症後 20 年の経過で、その約 20~30%が末期腎不全に進行し得る。病理組織学的には、IgA のびまん性沈着をとまなうメサンギウム細胞および基質の増加を特徴とするが、電子顕微鏡による検討では、GBM の構造変化を頻回に観察する。症例によっては、 $\alpha 3$ (IV)- $\alpha 5$ (IV)鎖の遺伝子変異により発症する Alport 症候群に特徴的な激しい GBM 病変 (GBM 緻密層の分裂、層状化)をも伴い得る。IgA 腎症における GBM 病変は、局所的な基底膜の融解がその引き金とされ、メサンギウム増殖病変の重症度、細胞性半月体の頻度、腎予後と深く相関するといわれてきた。

IV 型コラーゲンは、GBM の最も重要な構成成分で、現在までに 6 種の亜型 ( $\alpha$ 鎖)が知られている。糸球体では、 $\alpha 1$ (IV)、 $\alpha 2$ (IV)鎖はメサンギウム領域および GBM 内皮側に分布し、また $\alpha 3$ (IV)- $\alpha 5$ (IV)鎖は GBM 緻密層に分布する。これまでに、幾つかの原発性糸球体腎炎の GBM 病変において $\alpha$ (IV)鎖の発現様式の異常を認めることが報告されている。例えば、 $\alpha 1$ (IV)、 $\alpha 2$ (IV)鎖は、各種糸球体腎炎における硬化病変の過程でメサンギウムおよび硬化部位に一致して、その発現が増強することが知られている。また、糖尿病性腎症また膜性腎症における GBM 肥厚病変においては、GBM 緻密層に特異的に分布する $\alpha 3$ (IV)- $\alpha 5$ (IV)鎖の発現が著明に増強する事が知られている。

本研究においては、まず IgA 腎症に合併する微細な GBM 病変を、光学顕微鏡レベルでより明らかにするために、従来の蛍光抗体法でなく、新鮮凍結切片を利用したペルオキシダーゼ染色法にて $\alpha 1$ (IV)、 $\alpha 3$ (IV)、 $\alpha 5$ (IV)鎖の発現を検索する事を試みた。確立した染色条件が、良好な感度、特異度を有する事を確認した後、小児 IgA 腎症患者 21 名から得られた腎組織を用いて、IgA 腎症の GBM 病変における $\alpha 1$ (IV)、 $\alpha 3$ (IV)、 $\alpha 5$ (IV)鎖の発現様式の変化を明らかにし、臨床病理学的特徴との関連性を検討した。

### 3. 結果と考察

まず新鮮凍結標本を用いたペルオキシダーゼ法による $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の染色条件の確立を試みた。本法の確立のためには、 $\alpha(\text{IV})$ 鎖抗原の露出を目的とした尿素処理時間の調整、ブロッキング条件の調整が最も重要であった。

#### (a) 正常、微小変化群、Alport 症候群腎組織における $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の発現

正常腎糸球体においては、過去の報告に一致して $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖はメサンギウム領域から GBM 内皮側に沿って発現していた。 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖は、GBM 特異的に発現を認めた。微小変化群の糸球体における $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の発現様式は、正常腎とほぼ同様であった。染色法の特異性を確認するため Alport 症候群の腎および皮膚における $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の発現を検討した。過去の報告に一致して、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖は、Alport 症候群の腎において全く発現されておらず、また患者皮膚基底膜においても $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖発現の欠損を認めた。

#### (b) IgA 腎症 GBM における $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の発現

21 名の IgA 腎症患者 [年齢 5 歳~17 歳 (平均 11.3 歳)]を対象とした。組織学的重症度別では、WHO 分類で 1 型(微小変化) 8 名、2 型(巣状増殖) 9 名、3 型(びまん増殖)4 名である。IgA 腎症では、電子顕微鏡によって観察される数種の GBM 病変に相当すると考えられる、特徴的な $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖発現パターンを糸球壁に認めた。

i) 増殖メサンギウム領域周囲の糸球壁の wrinkling: 中等度以上の増殖病変をとともなう糸球体では、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖のメサンギウムにおける発現増強とともに、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖発現陽性糸球壁の wrinkling を認めた。また、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の染色強度は、不規則に増減していた。本所見は、局所的な GBM の融解による $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖発現低下あるいは修復機転における代償的な $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の産生亢進を示唆すると考えられた。

ii) 半月体をとともなう糸球体における糸球壁の断裂: 半月体形成は、IgA 腎症において腎予後を左右する重要な因子である。細胞繊維性半月体内部では、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖発現増加を認めたが、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の発現はみられなかった。また糸球体糸球壁の一部で、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の染色性が突如断裂し、間質部からの細胞成分の流入を認め、GBM 断裂が糸球体硬化病変発症の契機となっている事が示唆された。

iii) 糸球壁の肥厚: IgA 腎症では、しばしば上皮下においても激しい免疫複合体の沈着を認め、特徴的な GBM 病変 (garland 型あるいは dome 型肥厚 GBM)を形成する。電子顕微鏡にて同病変を頻回に認めた症例において、本病変に相当すると考えられる特徴的な $\alpha(\text{IV})$ 鎖発現パターン [ $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖陽性の二重糸球壁形成]を認めた。

iv) 虚脱糸球体における糸球壁の攣縮: 虚脱糸球体における攣縮した GBM で、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖発現の増強を観察した。メサンギウム領域の $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖発現は低下していた。

また以上の $\alpha(\text{IV})$ 鎖発現様式の変化は、より高度の蛋白尿を有し、病理学的重症度の高い患者群により頻回に観察された。

### 4. 結論

新鮮凍結標本を用いたペルオキシダーゼ染色を利用して $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の糸球体における発現を、簡便にまた十分な信頼性をもって検討し得た。IgA 腎症において、電子顕微鏡レベルで観察され得る代表的な GBM 病変に相当すると考えられる、特徴的な $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の発現様式の変化を認めた。IgA 腎症において、本染色法を用いて $\alpha(\text{IV})$ 鎖の糸球体発現を検討する事により、本症の GBM 病変の重症度を容易に把握する事が可能となり、腎予後判定に大いに役立つ事が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦  
副 査 教 授 吉 木 敬  
副 査 教 授 小 池 隆 夫

## 学位論文題名

### Glomerular expression of collagen IV $\alpha 1$ , $\alpha 3$ and $\alpha 5$ chains in childhood IgA nephropathy

(小児 IgA 腎症の糸球体における  
IV 型コラーゲン  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  鎖の発現)

学位申請者は、小児期において最も頻度の高い慢性腎炎である IgA 腎症を対象に、電子顕微鏡でしか解析し得なかった糸球体基底膜 (GBM) の変化を、GBM に特異的に存在する IV 型コラーゲン $\alpha$ 鎖に対するモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行うことにより、光学顕微鏡レベルで明らかにすることを試みた。また、21 名の小児 IgA 腎症患者の腎生検検体について IV 型コラーゲン $\alpha$ 鎖発現様式を検討し、臨床病理学的特徴との関連性を解析した。

IgA 腎症は、小児期において最もよくみられる原発性糸球体腎炎であり、発症後 20 年の経過で、その約 20~30%が末期腎不全に進行する。病理組織学的には、IgA のびまん性沈着をともなうメサンギウム細胞および基質の増加を特徴とするが、電子顕微鏡による検討では、GBM の構造変化 (GBM 緻密層の分裂、層状化) が頻回に観察される。また、IgA 腎症における GBM 病変は、局所的な基底膜の融解がその引き金とされ、メサンギウム増殖病変の重症度、細胞性半月体の頻度、腎予後と深く相関するといわれている。基底膜の最も重要な構造蛋白である IV 型コラーゲンは、現在までに 6 種の亜型 ( $\alpha$ 鎖) が知られているが、申請者は、GBM 内皮からメサンギウムに存在する  $\alpha 1$  鎖、GBM 緻密層に存在する  $\alpha 3$  (IV)、 $\alpha 5$  (IV) 鎖の発現を検討した。申請者はまず始めに、微細な GBM 病変を、光学顕微鏡レベルで明らかにするために、新鮮凍結切片を利用したペルオキシダーゼ法による  $\alpha 1$  (IV)、 $\alpha 3$  (IV)、 $\alpha 5$  (IV) 鎖の染色条件を確立した。本法の確立のためには、 $\alpha$  (IV) 鎖抗原の露出を目的とした尿素処理時間の調整、ブロッキング条件の調整が最も重要であった。次に正常、微小変化群、Alport 症候群 [ $\alpha 3$  (IV)、 $\alpha 5$  (IV) 鎖の遺伝子変異により発症する先天性腎疾患] 患者からの生検組織を用いて、本染色条件の特異性を検討した。正常腎糸球体においては、過去の報告に一致した  $\alpha 1$  (IV)、

$\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の分布を認めた。微小変化群の糸球体における発現様式は、正常腎とほぼ同様で、Alport 症候群の腎および皮膚では $\alpha 3(\text{IV})$ または $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の発現欠損を認め、本染色条件の特異性を確認した。次いで、小児 IgA 腎症患者 21 名から得られた腎組織を用いて、IgA 腎症の GBM 病変における $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の発現様式の変化を観察し、臨床病理学的特徴との関連性を検討した。21 名の IgA 腎症患者 [年齢 5 歳～17 歳 (平均 11.3 歳)] は、WHO 分類で 1 型(微小変化) 8 名、2 型(巣状増殖) 9 名、3 型(びまん増殖) 4 名であった。IgA 腎症 GBM で観察される特徴的な $\alpha(\text{IV})$ 鎖発現パターンは大きく 4 種に分類できた。即ち、i) 増殖メサンギウム領域周囲の係蹄壁の蛇行、ii) 半月体をともなう糸球体における係蹄壁の断裂中等度以上の増殖病変、iii) 係蹄壁の肥厚、iv) 虚脱糸球体における係蹄壁の攣縮と、 $\alpha(\text{IV})$ 鎖発現異常がみられる病変、である。蛇行 GBM では、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の染色強度の不規則な増減、断裂 GBM では、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 発現の途絶と細胞成分の間質からの流入、肥厚 GBM では $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ の二重係蹄形成が観察され、過去の報告における電顕的異常を適格に反映した。21 名の対象患者の臨床病理学的特徴と IV 型コラーゲン $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$  鎖の糸球体基底膜における発現異常との関連性を検討すると、蛋白尿の程度、WHO 分類を用いた病理学的重症度と良好に相関し、本染色法が IgA 腎症の腎予後判定に有効であることを見出した。

公開発表に際し、副査の吉木敬教授から、ホルマリン標本を用いた免疫染色の可否について、IV 型コラーゲン $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$  鎖についての検討、成人例における検討、matrix metalloproteinase 発現についての検討の必要性についての質問があった。次いで副査の小池隆夫教授から他のタイプの腎炎における検討、IgA 腎症の成因と糸球体基底膜における IV 型コラーゲン発現異常との関連性について質問があった。主査の小林教授から mRNA レベルでの検討の有無、今後の研究の方向性についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は、申請者自身が行った実験結果に加え、現在進行中の IV 型コラーゲン mRNA 解析の実験結果、過去に報告された腎炎と IV 型コラーゲン $\alpha$ 鎖発現様式や細胞外基質産生、分解に関する報告を引用し、各々の質問に対して的確な解答をした。

この論文は、IgA 腎症の糸球体基底膜異常を容易に光顕レベルで解析する方法を確立し、実際に腎予後の推測に非常に有用であることを示した点が高く評価され、今後の本症の臨床病理学的重症度判定や治療法開発に大いに役立っていく事が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。