

学位論文題名

小児糸球体疾患における尿中

Terminal Complement Complex (TCC)測定の意義

学位論文内容の要旨

【はじめに】

1980年 Salant らの報告以来、糸球体腎炎における組織障害あるいは尿蛋白の出現に関与する因子の一つとして補体後半成分である C5b-9 complex ; MAC (Membrane attack complex) が注目されてきた。MAC には膜障害活性を持つ膜結合型 MAC と、膜障害活性を持たない可溶性 SMAC があり、両者は terminal complement components (TCC) と総称される。申請者はこれまでの報告から、糸球体腎炎組織病変部に TCC の沈着がみられる点、尿中 TCC が巣状糸球体硬化症、糖尿病性腎症の疾患活動性を反映するという点に着目し、小児期発症の各種糸球体疾患を対象に TCC の尿中排泄を測定し、臨床的意義について検討した。また、腎炎組織への TCC 沈着と、同時に補体制御因子である vitronectin(VN), clusterin の局在を観察し、腎炎組織での TCC の役割を考察した。

【対象と方法】

小児期発症の腎疾患患者 129 例〔特発性ネフローゼ症候群(INS)ステロイド反応群 (A 群) 30 例, INS ステロイド抵抗群(B 群)10 例, IgA 腎症(IgAN)48 例, 膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN)16 例, ループス腎炎(LN)16 例, 特発性膜性腎症(MN)4 例, 紫斑病性腎炎(HSPN)5 例〕を対象とし、A 群は蛋白尿陽性時 [A 群(UP+)] , 陰性時 [A 群(UP-)] について検討した。

1. TCC の測定 : Kusunoki らにより作成された TCC を構成する C9 ポリマー上の neoantigen に対するモノクローナル抗体 1B4 を一次抗体とする ELISA の sandwich 法で行なった。検体は、発症から 8 週以降または腎生検から 3 ヶ月以内の新鮮尿、血液を、EDTA を入れて採取し、遠心した上清を用いた。検体中の TCC の濃度は、zymosan activated serum を作成し、これに含まれる TCC を 200AU/ml として算出した。正常範囲は、血中 TCC 0.75 AU/ml 以下、尿中 TCC 0.06AU/ml 以下とした。

2. 蛍光抗体法による TCC, VN, clusterin の染色 : 4 μ の凍結切片を風乾後 4 $^{\circ}$ C エタノールで固定し、PBS で洗浄後、一次抗体として抗 TCC 抗体は 1B4 を、抗 VN 抗体は国立がんセンターの矢追先生にご提供頂いたものを、抗 clusterin 抗体はアルツハイマー患者脳ホモジネイトより高丸らが作成したモノクローナル抗体 Az172/4 を使い、二次抗体として FITC 標識抗マウス IgG (Cappel 社)を用いた。

【結果】

1. 血中 TCC 値 : A 群(UP-)5/30 例, A 群(UP+)6/30 例, B 群 2/10 例が軽度高値, IgAN 9/48 例, MPGN 10/16 例, LN 10/16 例が高値を示し、平均値は MPGN と LN が高値であった。

2. 尿中 TCC 値 : B 群では 9/10 例が高値で、平均 \pm SD は 0.824 \pm 0.935AU/ml と最も高かった。A 群(UP+)では 2/30 例が軽度高値, IgAN で 13/48 例, MPGN で 5/16 例, LN で 7/16 例, MN で 1/4 例, HSPN で 2/5 例が高値であった。

3. 血中 TCC 値と尿中 TCC 値との関連 : MPGN で正の相関関係 ($r=0.7, p=0.0025$) が得られた。

4. 尿中 TCC 高値症例の検討 : 最も高値を示した B 群の組織像は、巣状糸球体硬化症 (FSGS) 2 例、微小変化群 (MCNS) 4 例、focal global obsolescence 1 例であった。経時的に尿中 TCC 値を測定した B 群の症例では尿中 TCC が持続高値であったが、A 群の症例では、治療に反応する時期に尿中 TCC の正常化がみられた。IgAN では組織障害が高度の症例、MPGN では血中 TCC 高値と低補体血症を示す症例が多かった。IgAN と MPGN では、尿中 TCC 値と尿蛋白量の間に関係 (IgA: $r=0.411, p=0.0037$, MPGN: $r=0.632, p=0.0086$) が得られた。MN と HSPN では、100mg/dl 以上の蛋白尿がみられた。

5. TCC, VN, clusterin 沈着の検討 : A 群 1 例、B 群 3 例、IgAN 16 例、MPGN 11 例、LN 7 例、MN 2 例に蛍光抗体法染色を施行し、-, tr, +, 2+, 3+ の 5 段階の強度で示した。正常腎組織と A 群では、TCC は糸球体では殆ど染色されず、小血管壁や尿細管基底膜の一部に tr 程度の顆粒状の沈着が認められた。VN と clusterin は糸球体基底膜、ポウマン囊、血管壁や尿細管基底膜の一部に tr で沈着が認められた。B 群では 3/3 例で糸球体硬化部位に TCC の沈着が強く認められ、尿細管間質への沈着も強く認められた。他群では TCC は、IgAN では 12/16 例でメサンギウム領域を中心に +~2+ で粗顆粒状に、MPGN では 10/11 例で糸球体基底膜に沿って +~3+ で、LN では 7/7 例で +~2+ で糸球体基底膜、メサンギウム領域を中心に、MN では 2/2 例で糸球体基底膜に沿って細顆粒状の沈着がみられ、いずれも免疫染色の局在とほぼ同様であった。VN と clusterin は TCC とほぼ同様の局在で、TCC より弱い沈着がみられた。

【考察】

健常児では、血中 TCC 値、尿中 TCC 値とも低値であった。

尿中 TCC 値は B 群で最も高値を示し、A 群 (UP+) では低値であった。小児期ステロイド抵抗性 INS では、MCNS と FSGS の鑑別診断が問題となるが、B 群の症例の様に尿中 TCC が持続高値を示す場合は、ステロイド治療に抵抗性であり MCNS 以外の組織像を呈する可能性が高いと考えられた。尿中 TCC 高値の症例は、IgAN では、組織傷害の重症度を反映している可能性が、MPGN では、低補体血症や蛋白尿など疾患活動性との関連が予測された。

腎組織への TCC の沈着は、IgAN, LN, MPGN では immune deposits とほぼ同じ分布に認められ、FSGS では糸球体硬化部位に強く認められた。腎炎組織での TCC の沈着機序は、immune complex (IC) の関与により補体系が活性化され、膜結合型 C5b-9 が局所で形成される可能性や、流血中の SC5b-9 が VN receptor 等を介して糸球体へ沈着することなどが考えられた。一方、硬化性病変を含む組織障害の強い部位では、組織傷害による補体活性化や、傷害部位に補体成分が non-specific trapping されることも考えられた。VN, clusterin の沈着は、TCC と同様の分布を示したことから、腎組織傷害部位では、補体とその制御因子が組織攻撃と防御に関わっていることが推測された。

TCC の分子量は約 1,000,000 またはそれ以上と大きく、等電点は 5.8 と陰性であることから、TCC が通常の糸球体基底膜を通過するのは非常に困難である。TCC の尿中排泄に関して、糸球体局所で形成された TCC が細胞内輸送を介する機序や、糸球体障害により漏出した分子量の大きな補体成分の尿細管腔での活性化などが考えられる。組織障害部位に TCC 沈着が認められ、血中 TCC 値に殆ど差のみられない群間において、尿中 TCC 値に明らかな差が認められたことは、尿中 TCC が糸球体あるいはそれ以降の過程で形成されると考えられた。In vitro では TCC は細胞融解に至らない濃度で、ヒト糸球体上皮細胞での IV 型コラーゲン産生の増加などをはじめとする種々の生物学的活性が報告されており、TCC はメサンギウム細胞や、上皮細胞を刺激して組織障害や糸球体硬化の機序に関与する可能性が考えられた。

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

小児糸球体疾患における尿中

Terminal Complement Complex (TCC)測定の意義

近年、糸球体腎炎における組織障害あるいは尿蛋白の出現に関与する因子の一つとして補体後半成分である terminal complement components (TCC)が注目されてきた。今回、小児期発症の各種糸球体疾患を対象に尿中 TCC を測定し臨床的意義について検討するとともに、組織への TCC 沈着と補体制御因子である vitronectin (VN), clusterin の局在を観察し、腎炎組織での TCC の役割を考察した。

対象は小児期発症の腎疾患患者 129 例〔特発性ネフローゼ症候群(INS)ステロイド反応群(A 群) 30 例, INS ステロイド抵抗群(B 群) 10 例, IgA 腎症(IgAN) 48 例, 膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN) 16 例, ループス腎炎(LN) 16 例, 特発性膜性腎症(MN) 4 例, 紫斑病性腎炎(HSPN) 5 例〕とし、A 群は蛋白尿陽性時 : A 群(UP+)、陰性時 : A 群(UP-)各々について測定した。TCC の測定は Kusunoki らにより作成された TCC を構成する C9 ポリマー上の neoantigen に対するモノクローナル抗体 1B4 を一次抗体とする ELISA の sandwich 法で行なった。正常範囲は、血中 TCC 0.75 AU/ml 以下, 尿中 TCC 0.06AU/ml 以下とした。TCC, VN, clusterin の染色は、二次抗体に FITC 標識抗マウス IgG を用いた蛍光抗体間接法で行った。

尿中 TCC 値は、INS では B 群が最も高値で、A 群(UP+)では殆ど低値であり、両群の血中 TCC は低値であった。経時的に尿中 TCC 値を測定した B 群の症例では尿中 TCC が持続高値であったが、A 群の症例では、治療に反応する時期に尿中 TCC の正常化がみられた。B 群の組織像には巣状糸球体硬化症 (FSGS) 2 例が含まれていた。腎炎群では、IgAN では組織障害が高度の症例が、MPGN では血中 TCC 高値と低補体血症を示す症例が多かった。LN では低補体などとの明らかな関連はみられなかった。

TCC, VN, clusterin 沈着の検討では、正常腎組織と A 群では、TCC は糸球体では殆ど染色されず、VN と clusterin は糸球体基底膜の一部などにわずかな沈着が認められた。B 群では糸球体硬化部位に TCC の沈着が強く認められ IgAN、MPGN、LN、MN ではいずれも免疫染色の局在とほぼ同様であった。VN と clusterin は TCC と同様の局在で、TCC より弱い沈着がみられた。

尿中 TCC の測定結果から、INS ではステロイド治療反応性の指標として臨床的に有用であり、尿中 TCC の持続高値は微少変化以外の組織像を呈する可能性が考えられた。IgAN では組織傷害の重症度を反映している可能性が、MPGN では低補体血症や蛋白尿など疾患活動

性との関連が予測された。

腎組織への TCC の沈着は、IgAN, LN, MPGN では immune deposits とほぼ同じ分布に認められ、糸球体硬化部位を含む組織傷害の強い部位に認められた。Clusterin, vitronectin の沈着は、TCC と同様の分布を示すことから、病変部では、補体とその制御因子が組織攻撃と防御に関わっていることが推測された。TCC の組織への沈着機序は、組織傷害の強い部位での cell debris や、immune complex による補体の活性化、傷害部位に補体成分が non-specific trapping される可能性が考えられた。TCC の分子量は約 1,000,000 またはそれ以上と大きく糸球体局所の TCC が全てそのまま尿中に排泄されることは考えにくい、細胞内輸送を介する機序も報告されている。組織傷害の強い部位では size barrier の破綻により TCC がそのまま、あるいは漏出した分子量の大きな補体成分の尿細管腔での活性化なども推測された。

今後、腎での補体成分の局所産生の詳細や、血中および腎組織構成細胞上に存在する補体制御因子についての検討がより進むことにより、糸球体障害、間質障害の両面において、補体と補体調節蛋白の役割に注目した特異的治療にも発展していくと考えられた。

公開発表に際し、副査の吉木教授から、糸球体疾患における TCC の生成部位と形成される機序について、TCC を実際に治療のマーカーとして用いた場合の有用性、補体制御因子の治療への応用についての知見などに関する質問があった。次いで副査の小池教授から、分子量の大きい TCC が尿中に排泄される機序について、他の分子量の大きい物質ではなく TCC を測定する意義について、免疫学的機序の関与が考えにくい腎炎での TCC の役割、測定法の簡便化の可能性について質問があった。次いで主査の小林教授から液相中と膜上での TCC 形成、糖尿病性腎症などでの血管内皮傷害と TCC 形成の関連についての質問があった。申請者はいずれの質問に対しても実験結果や他の研究者の報告を引用し妥当な回答を行った。

本研究は、小児の糸球体疾患患者を対象に血中尿中 TCC を測定し、特に尿中 TCC 値測定の臨床的有用性（ステロイド反応性、疾患活動性、重症度の判定）を明らかにし、さらに組織上における TCC の役割とその制御因子との関わりを推察したもので、今後の臨床面における応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。