

学位論文題名

ループス腎炎における tumor necrosis factor α (TNF α) に関する検討
— 遺伝子多型性と TNF α 産生能について —

学位論文内容の要旨

I 目 的

Tumor necrosis factor (TNF) α は、炎症反応、免疫反応に関して多様な生物活性を有するサイトカインで、ヒトTNF α 遺伝子は第6染色体短腕上のHLA遺伝子のクラスI領域とクラスII領域の間に位置している。今回、日本人SLE患者のTNF α 遺伝子のrestriction fragment length polymorphism(RFLP)と臨床症状およびHLAの比較、さらに末梢血単核球(PBMC)のTNF α 産生能、腎のTNF α mRNAの発現を検討し、ループス腎炎におけるTNF α 、HLAの関与につき考察した。

II 方 法

ARA分類基準を満たすSLE患者を対象とした。患者末梢血白血球からDNAを抽出し、その10 μ gを制限酵素NcoIで切断後、0.8%アガロースゲルでTBE-bufferを用いて35Vで約18時間電気泳動した。ナイロン膜にtransfer後、³²PでラベルしたヒトTNF α のcDNAをhybridizeし洗浄後1.5~7日間X線フィルムにexposeし、RFLP bandを得た。HLAタイピングは、lymphocyte microcytotoxicity testにより行った。患者単核球のTNF α 産生能を検討する目的で、10⁶/mlのPBMCをLPS

5 μ g/ml、LPS 10 μ g/ml、LPS 10 μ g/mlおよびConA 10 μ g/ml、無添加の群に分け、5% CO₂、37°Cで2-60時間培養し、上清を回収した。TNF α は、ヒトTNF α ELISAキット (ENDGEN社、Boston、USA) を用いて測定した。

腎におけるTNF α のmRNAの発現は、SLE患者5例、重症感染症患者1例の凍結腎よりmRNAを抽出し、Dot blot hybridizationにより検討した。

尿蛋白は、全経過中もっとも多量の時期のデータを用いた。

Ⅲ 結 果

制限酵素Nco I によって2種類のTNF α RFLP band(10.5kb、5.5kb)が得られた。SLE群、RA群、および健常人群の間にはTNF α RFLP bandのphenotypeの頻度およびそれぞれのRFLP bandの出現頻度は、3者間に有意差はなかった。しかし、SLEの臨床症状とTNF α RFLP bandの相関を検討したところ、5.5kb band陽性群では、0.5g/日以上持続性蛋白尿の陽性率は48.7%(19/39)であり、5.5kb band陰性群の20.0%(7/35)に比べて有意に高かった($\chi^2=5.96:p<0.05$)。さらに、尿蛋白量とそれぞれの5.5kb band陽性率の関係では、尿蛋白0.5g/日以下の群では5.5kb band陽性率は41.7%(20/48)、0.5-3.5g/日の群では61.5%(8/12)、3.5g/日以上群では84.6%(11/13)であり、尿蛋白が増えるほど5.5kb bandの陽性率が上昇していた。腎生検の組織型分類とTNF α RFLP bandの関係についても検討したが、両者に相関は認めなかった。次に、SLE患者のTNF α 5.5kb RFLP bandとHLAとの関係を検討したところ、5.5kb bandとHLA B44-DRw13-DQw1ハプロタイプとの間には正の相関が認められた($p=0.017$)。このHLAハプロタイプをもつ6例は全例TNF α 5.5kb bandを有しており、さらにこのうち66.7%(4/6)がネフローゼ症候群で、このハプロタイプをもたない群のネフローゼ症候群陽性率17.1%(6/35)に比べて極めて高率であった($\chi^2=12.1:p<0.01$)。

次に、健常人のPBMC培養の結果、LPS10 μ g/ml+ConA10 μ g/ml添加群のTNF α 産生量が最も多く、約24時間でプラトーとなった。そこでこの条件下で健常人17人およびSLE患者57人のPBMCを培養し、上清中のTNF α 濃度を測定した。健常人の培養上清TNF α 濃度平均は870 \pm 299pg/ml、SLE患者群では902 \pm 531pg/mlであり、SLE患者と健常人の

間にはTNF α 産生能には差がなかった。また、TNF α 5.5kb RFLP bandとTNF α 産生能の関係では、健常人群では相関を認めなかったがSLE群では、5.5kb band陽性者21人では $1,103 \pm 533$ pg/ml、陰性者16人では 773 ± 446 pg/mlで、5.5kb band陽性者のTNF α 産生能は陰性者に比べて亢進している傾向が見られた。さらに、SLE群について、各臨床症状とPBMCのTNF α 産生能との相関を検討した。培養上清のTNF α 濃度が、SLE患者の平均値である902pg/ml以上の群をHigh TNF α inducibility群（H群:n=22）、902pg/ml未満をlow TNF α inducibility群（L群:n=32）と定義し、それぞれの群と臨床症状の有無とを比較したところ、0.5g/日以上持続性蛋白尿の頻度は、L群にくらべてH群が有意に高かった($\chi^2=5.08$: $p<0.05$)。CH50、抗DNA抗体価、prednisolone投与量については、L群とH群との間には有意差は認めなかった。また、HLA B44-DRw13-DQw1ハプロタイプ陽性者4人中3人はH群に属していた。

腎におけるTNF α 遺伝子の発現では、重症感染症例では腎にTNF α mRNAの発現がみられたが、ループス腎炎においてはいずれの症例でもTNF α mRNAの発現は認めらなかった。

IV 考 案

制限酵素Nco I 処理にて、10.5kbと5.5kbの2種類のヒトTNF α RFLP bandが得られ、SLE群では、持続性蛋白尿の陽性例で5.5kb bandが有意に多く出現しており、尿蛋白の程度に相関して5.5kb bandの出現率が高くなっていた。さらに、HLA B44-DRw13-DQw1とTNF α 5.5kb RFLP bandは、日本人SLE患者では強く連鎖していることが示されB44-DRw13-DQw1ハプロタイプとTNF α 5.5kb bandをもつSLE患者には非常に高率に多量の尿蛋白を伴うループス腎炎の発症がみられた。すなわち、HLA B44-DRw13-DQw1、およびTNF α 5.5kb bandをもつ一群が、ループス腎炎発症および重篤化のhigh risk groupであると考えられた。

次にSLE患者のPBMCのTNF α 産生能を調べ、その結果、統計学的に有意差は認めなかったが、5.5kb band陽性者のTNF α 産生能は陰性者に比べて亢進している傾向が見られた。さらに、SLE患者をTNF α 産生能に応じてH群、L群にわけ、SLEの各臨床症状との相関を調べたところ、H群はL群に比べて0.5g/日以上蛋白尿陽性者が有意に多く

さらにHLA B44-DRw13-DQw1陽性者4人中3人がH群に属していた。

以上より、ループス腎炎がTNF α を含めたハプロタイプと関係している可能性が考えられた。ループスマウスにおいても腎炎とTNF α の関係につき多く報告されているが、TNF α の動態については相反する報告もあり、いまだ一定の見解は得られていない。従って、ループス腎炎においては、TNF α が単純に欠乏あるいは過剰であるという関係ではなく、TNF α が複雑なサイトカインネットワークの一部を担っており、TNF α 、HLAを含めた多くの因子が腎症の発症や重症化に関与していると推定された。また、TNF α RFLPと蛋白尿の相関は、TNF α の産生量あるいは生物活性と関係している可能性、またTNF α 遺伝子と連鎖して存在している他の因子の遺伝子の影響を反映したものの可能性も考えられた。

V 結 語

日本人SLE患者では、Nco I TNF α 5.5kb RFLP bandは、HLA B44-DRw13-DQw1とハプロタイプを形成していた。さらに、5.5kb band陽性者のPBMCによるTNF α 産生能は陰性者に比べ亢進している傾向がみられ、TNF α 産生亢進群には尿蛋白陽性者が多かった。5.5kb band陽性率は尿蛋白量と相関しており、以上より、ループス腎炎の発症、重症化にはHLA、TNF α が関与している可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 中川 昌一
副査 教授 葛巻 暹
副査 教授 大河原 章

学位論文題名

ループス腎炎における tumor necrosis factor α
(TNF α) に関する検討
— 遺伝子多型性とTNF α 産生能について —

Tumor necrosis factor(TNF) α は、炎症反応、免疫反応に関して多様な生物活性を有するサイトカインで、ヒトTNF α 遺伝子は第6染色体短腕上のHLA遺伝子のクラスI領域とクラスII領域の間に位置している。今回申請者は、日本人SLE患者のTNF α 遺伝子の restriction fragment length polymorphism(RFLP)と臨床症状およびHLAの比較、さらに末梢血単核球(PBMC)のTNF α 産生能、腎のTNF α mRNAの発現を検討し、ループス腎炎におけるTNF α 、HLAの関与につき考察した。

その結果、

- (1) 制限酵素Nco Iによって2種類のTNF α RFLP band(10.5kb、5.5kb)が得られた。SLE群、RA群、および健常人群の間には、TNF α RFLP bandのphenotypeの頻度およびそれぞれのRFLP bandの出現頻度には有意差はなかった。
- (2) SLEの臨床症状とTNF α RFLP bandの相関の検討では、5.5kb bandの出現頻度が尿蛋白の程度と相関していた。すなわち、尿蛋白0.5g/日以下の群では5.5kb band陽性率は41.7%(20/48)、0.5-3.5g/日の群では61.5%(8/12)、3.5g/日以上群では84.6%(11/13)であり、尿蛋白が増えるほど5.5kb bandの陽性率が上昇していた。
- (3) 次に、SLE患者のTNF α 5.5kb RFLP bandとHLAとの関係を検討したところ、5.5kb bandとHLA B44-DRw13-DQw1ハプロタイプとの間には正の相関が認められた($p=0.017$)。このHLAハプロタイプをもつ6例は全例TNF α 5.5kb bandを有しており、さらにこのうち66.7%(4/6)がネフローゼ症候群で、このハプロタイプをもたない群のネフローゼ症候群陽性率17.1%(6/35)に比べて極めて高率であった($\chi^2=12.1$; $p<0.01$)。

(4) 健常人のPBMC培養では、LPS10 μ g/ml+ConA10 μ g/ml添加群のTNF α 産生量が最も多く、約24時間でプラトーとなったので、この条件下で健常人17人およびSLE患者57人のPBMCを培養し、上清中のTNF α 濃度を測定したところ、SLE患者と健常人の間にはTNF α 産生能には差がなかった。

(5) TNF α 5.5kb RFLP bandとTNF α 産生能の関係では、健常人群では相関を認めなかったが、SLE群では、5.5kb band陽性者21人では1,103 \pm 533pg/ml、陰性者16人では773 \pm 446pg/mlで、5.5kb band陽性者のTNF α 産生能は陰性者に比べて亢進している傾向が見られた。

(6) さらに、SLE群について、培養上清のTNF α 濃度がSLE患者の平均値以上の群をHigh TNF α inducibility群(H群:n=22)、それ未満をlow TNF α inducibility群(L群:n=32)と定義し、それぞれの群と臨床症状の有無とを比較したところ、0.5g/日以上持続性蛋白尿の頻度は、L群にくらべてH群が有意に高かった($\chi^2=5.08$: $p<0.05$)。CH50、抗DNA抗体価、prednisolone投与量については、L群とH群との間には有意差は認めなかった。また、HLA B44-DRw13-DQw1ハプロタイプ陽性者4人中3人はH群に属していた。

(7) 腎におけるTNF α 遺伝子の発現では、重症感染症例では腎にTNF α mRNAの発現がみられたが、ループス腎炎においてはいずれの症例でもTNF α mRNAの発現は認められなかった。

以上の結果、

日本人SLE患者では、NcoI TNF α 5.5kb RFLP bandは、HLA B44-DRw13-DQw1とハプロタイプを形成していた。さらに、5.5kb band陽性者のPBMCによるTNF α 産生能は陰性者に比べ亢進している傾向がみられ、TNF α 産生亢進群には尿蛋白陽性者が多かった。5.5kb band陽性率は尿蛋白量と相関しており、ループス腎炎の発症、重症化にはHLA、TNF α が関与している可能性が示唆された。

ループス腎炎においては、TNF α が単純に欠乏あるいは過剰であるという関係ではなく、TNF α が複雑なサイトカインネットワークの一部を担っており、TNF α 、HLAを含めた多くの因子が腎症の発症や重症化に関与していると推定された。

試問に際し、

葛巻教授よりTNF α RFLPの疾患特異性について、SLEと健常人のHLA B44-DRw13-DQw1ハプロタイプの出現頻度の違いについて、またTNF α の腎症への関与の機序についての質問、大河原教授よりTNF α 5.5kb RFLP bandと生命予後との関係、治療上の指針となるかどうかの可能性についての質問、吉木教授より健常人におけるTNF α 5.5kb RFLP bandと連鎖するハプロタイプについて、またTNF α 5.5kb RFLP bandとHLAを含めたハプロタイプ上の腎症と関係している要素について質問・意見があったが、申請者は概ね適切な答弁をした。

以上により、本論文は学位授与に値するものと判定した。