

氏名	こうだ たかゆき 神 田 貴 行
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第490号
学位授与年月日	平成16年 9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	High nephritogenicity of monoclonal antibodies belonging to IgG2a and IgG2b subclasses in rat anti-GBM nephritis (ラット抗 GBM 抗体腎炎における IgG2a と IgG2b の モノクローナル抗体の高腎炎惹起性)
学位論文審査委員	(主査) 村 脇 義 和 (副査) 林 一 彦 神 崎 晋

## 学位論文の内容の要旨

抗糸球体基底膜抗体腎炎 (抗 GBM 抗体腎炎) は腎臓の糸球体基底膜 (GBM) に対する自己抗体により発症する腎炎である。約半数の症例で肺出血を合併し、臨床的には Goodpasture 症候群と言われる。患者血清中には GBM の構成成分である IV 型コラーゲンの NC1 領域に対する抗体が存在している。IV 型コラーゲンの  $\alpha$  鎖には 6 種類のアイソフォームが存在し、 $\alpha 1$  鎖から  $\alpha 6$  鎖と名づけられている。患者血清中では 6 種類の  $\alpha$  鎖のうち、特に  $\alpha 3$  鎖の NC1 領域に対する抗体が高値を示す。ヒトの 6 種類の  $\alpha$  鎖のアミノ酸配列はすでに明らかにされており、これらのアイソフォーム 3 本が三重らせん構造をとり、1 個のコラーゲン分子を形成している。現在までに  $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$  と  $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$  と  $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$  の 3 種類の組み合わせがあることが確認されている。 $\alpha 3$  鎖と  $\alpha 4$  鎖の NC1 領域を含む精製抗原や組換え蛋白をアジュバントと共に投与することによってラットに能動型抗 GBM 抗体腎炎が惹起できることも報告されている。近年ラットにおいて多数のモノクローナル抗体を作製する方法が開発された。我々はこの方法を用いて、ラットの IV 型コラーゲン  $\alpha$  鎖の NC1 領域に対する同種モノクローナル抗体を多数作製し、ラット抗 GBM 抗体腎炎における自己抗体のサブクラスと腎炎重症度の関連ならびに抗体投与量と腎炎重症度の関連を検討した。

### 方 法

雌の WKY/NCrj ラットを木くずの入ったプラスチック製の飼育箱に入れ、自由に食物や水分を摂取できる環境にした。ラットリンパ節法 (抗原をラットに投与し、反応性に腫大した腸骨リン

パ節の B 細胞と不死化したミエローマ細胞を細胞融合して多数の抗体を作製する方法) を用いてラットの抗 GBM 抗体を多数作製し、ELISA とウエスタンブロットと間接蛍光抗体法により抗体を選別した。サブクラス IgG1 と IgG2a と IgG2b の自己抗体をそれぞれ 8 種類選択し、全ての抗体を 4 匹の WKY ラットを 1 組として 1 回量 300  $\mu$ g/ラットで腹腔内投与してサブクラス別腎炎重症度を調べた。また、投与した抗体の投与量と腎炎重症度の関係を調べるために、それぞれの抗体の投与量を 0 から 300  $\mu$ g/ラットまで変えてラットの腹腔内に投与した。腎炎の重症度の評価は検尿、組織診断、直接蛍光抗体法で行った。検尿は抗体投与翌日から隔日に 11 日まで採取し、血尿と尿中タンパク量の定量を、組織診断は H. E. 染色を基本にし、腎組織については PAM 染色を、肺組織についてはヘモジデリン含有マクロファージの存在を確認するためベルリンブルー染色を追加した。直接蛍光抗体法は OTC コンパウンドで包埋した切片を薄切し、ラット IgG に対する蛍光色素標識抗体で染色した。

## 結 果

IgG1 の自己抗体を投与したラットは全て軽度の腎炎を発症した。IgG2a と IgG2b の自己抗体を投与したラットは中等度から重症の腎炎を発症した。IgG2a と IgG2b の自己抗体のなかには肺出血を引き起こしたのもあった。これらの自己抗体は IV 型コラーゲンの  $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$  鎖の NC1 領域に対するものであった。腎炎を発症させるのに必要な最少抗体量はサブクラスにより異なり、IgG1 では 30  $\mu$ g/ラット、IgG2a では 3  $\mu$ g/ラット、IgG2b では 1  $\mu$ g/ラットであった。投与した抗体量が 30  $\mu$ g/ラット以下では抗体の沈着は GBM に限定されていた。投与した抗体量が 100  $\mu$ g/ラット以上では抗体の沈着は GBM ばかりではなく尿細管基底膜に広がっていた。肺出血は肺出血性の自己抗体を大量に投与したときのみ観察された。

## 考 察

IgG1 の自己抗体を投与したラットは全て軽度の腎炎を発症し、一方 IgG2a と IgG2b の自己抗体を投与したラットは中等度から重症の腎炎を発症した。また、同じサブクラスの抗体の場合標的の  $\alpha$  鎖が異なっても腎炎の程度はあまり変わらないことから、標的の  $\alpha$  鎖の違いよりも腎炎の重症度においては抗体のサブクラスの違いがきわめて重要であることが明らかとなった。腎炎と肺出血の程度は投与した抗体量に依存していた。腎炎の発症には数  $\mu$ g/ラットと少量で十分であった。しかし、肺出血性の自己抗体の少量投与では腎炎のみで肺出血は起こらず、大量投与した場合腎炎のみならず肺出血も生じた。したがってこれらの抗体は優先的に GBM に結合し、GBM が飽和状態になった後に肺胞基底膜に結合し肺出血を起こすと考えられる。GBM に自己抗体が沈着した後の炎症のメカニズムに関して、補体系の活性化と免疫系細胞表面上に存在し IgG の Fc 部に結合するレセプター[Fcレセプター (Fc $\gamma$ R)] の関与が考えられる。本研究では腎炎の組織においては補体の沈着は認められないことから Fc $\gamma$ R の関与が示唆された。

## 結 論

- 1) ラット抗 GBM 抗体腎炎の重症度に関与するのは、抗体の標的（抗原）があるラット IV 型コラーゲンの  $\alpha$  鎖の差異よりも、抗 GBM 抗体のサブクラスの違いが重要で、IgG2a、IgG2b の方が IgG1 より重症となる。
- 2) 自己抗体投与量と腎炎重症度は投与量に相関し、腎炎を惹起する最少抗体量が抗体のサブクラスによって異なり、IgG1、IgG2a、IgG2b はそれぞれ  $30\mu\text{g}$ /ラット、 $3\mu\text{g}$ /ラット、 $1\mu\text{g}$ /ラットであった。
- 3) GBM に自己抗体が沈着した後の炎症のメカニズムに関して、この腎炎の組織においては補体の沈着は認められないことから Fc レセプターの関与が示唆された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究はラットリンパ節法により大量に作成したモノクローナル抗体を利用したラット抗 GBM 抗体腎炎実験モデルにおいて、自己抗体のサブクラスと腎炎重症度の関係ならびに抗体投与量と腎炎重症度の関係を検討したものである。その結果、腎炎の重症度は抗体の標的があるラット IV 型コラーゲンの  $\alpha$  鎖の違いより、自己抗体のサブクラスの違いと投与量に依存することが判明した。また GBM に自己抗体が沈着した後の炎症のメカニズムに関して、この腎炎の組織においては補体の沈着は認められないことから Fc レセプターの関与が示唆された。本論文の内容は、単に抗 GBM 抗体腎炎の発症メカニズムを研究していくうえだけでなく、多くの自己免疫疾患の発症メカニズムについて有用な情報を提供するものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。