

IgA 腎症における組織内フィブロネクチン (FN) の意義と IgA (メサンジウム細胞)レセプターについて

東京女子医科大学腎臓病総合医療センター小児科 川口 洋, 鳴海福星, 伊藤克己

IgA 腎症は、腎メサンジウム領域への IgA (IgA 型 Immune Complex) の沈着とメサンジウム細胞の増殖および基質の拡大、硬化を主徴とする慢性糸球体腎炎である。従来、本症は予後良好な疾患とされてきたが、必ずしもそうとは言い切れず、小児科領域においても、腎不全に到る症例が報告されている。

今回、我々は、IgA 腎症の病態を解明する目的で、① IgA 腎症における組織内 FN の動態、② 家兎メサンジウム細胞の免疫グロブリン (IgA) レセプターの有無、③ 家兎培養メサンジウム細胞に対するモノクローナル抗体の作製、の3点について検討したので報告する。

(1) IgA 腎症における組織内 FN の動態について (写真1, 2, 図1, 表1, 2, 3)

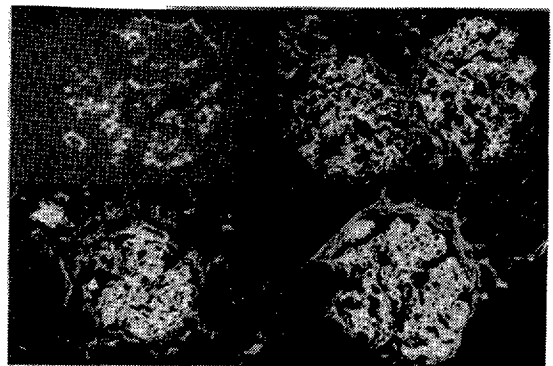
FN は、二つの subunit からなる分子量約45万の α -2 glycoprotein であり、lamimin や collagen とともに腎の非細胞成分を構成する重要な基質成分である。FN は正常腎では、主として腎メサンジウム領域に限局して存在するとされており、そのため一つのメサンジウムマーカーとして知られている。この研究において、我々は、FN の組織内動態が IgA 腎症の臨床像と何らかの関連を有しているのではないかという仮定の下に、その関係を検討し、かつ、腎病態下での FN の意義について考察した。

方法:

従来の報告に示すように、FN の型分類を、type I ; 正常もしくは微少変化型 (FN はメサンジウム領域に軽度みられる), type II ; メサンジウム増殖型 (メサンジウム領域での FN が増量する),

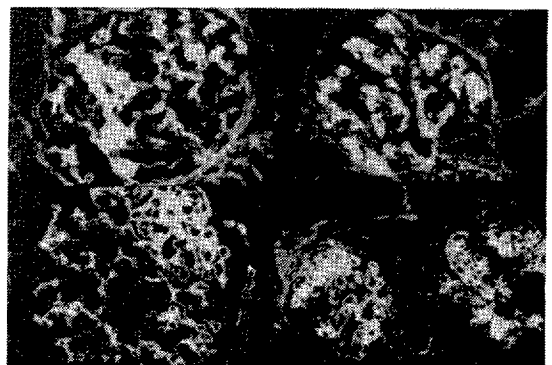
type III ; 膜性腎症型 (メサンジウム領域は正常であるが、糸球体基底膜に沿って diffuse に線、顕粒状にみられる), type IV ; 膜性増殖性腎炎型 (メサンジウム領域に増量のみられ、さらに糸球体基底膜に沿って diffuse に線、帯状にみられる) の

写真1 FN 分布分類型(I)



左上 type I 右上 type III
左下 type II 右下 type IV

写真2 FN 分布分類型(II)



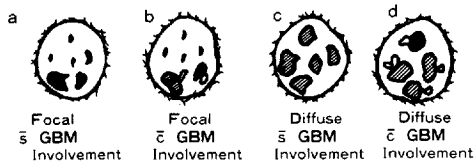
左上 type IIa 右上 type IIc
左下 type IIb 右下 type IId

図1 腎組織内 FN の分布分類

Type I Normal/Minimal



Type II Mesangioproliferative



Type III Membranous



Type IV Membranoproliferative



4型とした。さらに、type IIのメサンジウム増殖型は、①メサンジウム領域での FN 増量の範囲 (segmental か diffuse か)、②糸球体基底膜での染色性の有無を考慮して、type IIa→IId の4型に細分類を行った。

IgA 腎症は27例であり、光顕上、微小変化型の2例と巣状分節型の2例の計4例が type I、微

表2 Fibronectin の腎組織内分布 (86例) (分類型2)に基く)

組織診断	生検数	分類							
		I	IIa	IIb	IIc	IId	III	IV	
正常	1	1							
微小変化型腎炎	28	25	1		2				
微小変化型ネフローゼ症候群	5	5							
巣状分節状腎炎	15	2	12	1					
び慢性増殖性腎炎	21				4	17			
膜性増殖性腎炎	7					4		3	
膜性腎症	2							2	
SLE腎症	3					1		2	
巣状硬化症	1	1							
腎移植後	3	3							
計	86	37	13	1	6	22	4	3	

表3 タイプ分類型2)による Fibronectin 分布と臨床所見

タイプ分類/生検数	蛋白尿 1.0gr/日以下/1.0gr/日以上	腎機能(Ccr.) 80ml/m以上/60ml/m以下
I : 36	31/6 (MCNS:5) (FGS:1)	36/1 (FGS:1)
IIa: 13	13/0	13/0
IIb: 1	1/0	1/0
IIc: 6	6/0	6/0
IId: 22	7/15	7/15 (HSPN:10 IgAN:3(3%血尿遷移:1) AGN:1 SLE:1)
III : 4	0/4 (MN:2) (SLE:2)	4/0
IV : 3	1/2 (MPGN:2)	2/1 (MPGN: type1:1)

正常例を除く

表1 Fibronectin の腎組織内分布 (86例) (分類型1)に基く)

組織診断	生検数	タイプ分類(1)	メサンジウム	基底膜	ポーマン囊	半月体	間質
正常	1	I : 1	+ : 1	0	0	0	0
微小変化型腎炎	28(IgAN:5)	I : 25 II : 3	+ : 25 # : 3 ^F	0	+ : 2 ^F	0	0
〃ネフローゼ症候群	5	I : 5	+ : 5	0	+ : 1 ^F	0	0
巣状分節状腎炎	15(IgA:15)	I : 2 II : 13	+ : 2 # : 13 ^F	+ : 1 ^F	+ : 3 ^F	+ : 2	0
び慢性増殖性腎炎	21 (IgAN:7 HSPN:13 AGN:1)	II : 21	# : 21 ^D	# : 17 ^D	+ : 10 ^F	# : 12	+ : 5
膜性増殖性腎炎	7 (focal:5 diffuse:2)	II : 4 IV : 3	# : 7 ^D	# : 4 ^D # : 3 ^D	+ : 5 ^F	+ : 2	+ : 2
膜性腎症	2	III : 2	+ : 2	# : 2 ^D	+ : 2 ^F	0	0
SLE腎症	3	III : 2 II : 1	+ : 2 # : 1 ^D	# : 2 ^D # : 1 ^D	+ : 2 ^F	+ : 1	+ : 3
巣状硬化症	1	I : 1	+ : 1	0	0	0	0
腎移植後	3	I : 3	+ : 3	0	+ : 1 ^F	0	0

F: Focal. D: Diffuse.

少変化型の3例中1例が type IIa, 2例が IIc, 巣状分節型の13例中12例が type IIa, 1例が type IIb であった。また, ビ慢性増殖型の7例中4例が type IIc, のこり3例が type II d を示していた。

臨床像との関連については, type I, IIa→IIc の症例は, 蛋白尿も軽微(1g/日以下)であり, 腎機能障害はみとめられなかった。一方, type II d に属する3例は, 凡て, ネフローゼ症候群を呈しており, また, 腎機能低下がみられた。さらに, そのうちの1例は, 腎生検約2年後に血液透析に致っている。

考 察:

以上より, IgA 腎症27例中 type II d に属する3例(約11%)は, ネフローゼ症候群を伴う腎機能低下がみられた。これらは, 型分類によると diffuse に, メサンジウム領域での FN の増加および基底膜の FN の染色がみられているものである。IgA 腎症以外の腎炎を含めると type II d に属する22例中15例(約70%)が同様に, 高度の蛋白尿を呈する腎機能低下を示していた。さらに type III, IV に属する SLE 腎症, 膜性腎症, 膜性増殖性腎炎の多くは, ネフローゼ症候群を呈していたことから, メサンジウム領域での FN の増加は腎機能低下と, 一方, 基底膜領域での FN は, 蛋白尿と強い相関があると考えられた。

FN の腎での起源や, その病理学的意味については未だ不明の部分が多いが, 本物質が, 免疫系, 細胞増殖, 血液凝固系など広範囲な分野において多くの生物学的活性を有することから, 今後, 多面的なアプローチが必要であると思われる。

(2) 家兎メサンジウム細胞の免疫グロブリン(IgA)レセプターの有無について

(写真3, 4, 5)

IgA 腎症におけるメサンジウム領域への IgA Ic もしくは polymeric IgA の沈着機序については, ①沈着物質の物理・化学的性質によるもの, ②メサンジウムでの処理, 排泄機構の障害に基づくものなどが考えられている。我々は, この他に, メサンジウム細胞もしくは, メサンジウム基質に IgA

写真3 培養メサンジウム細胞の走査電顕像



写真4 培養メサンジウム細胞中の“マクロファージ様細胞”の走査電顕像

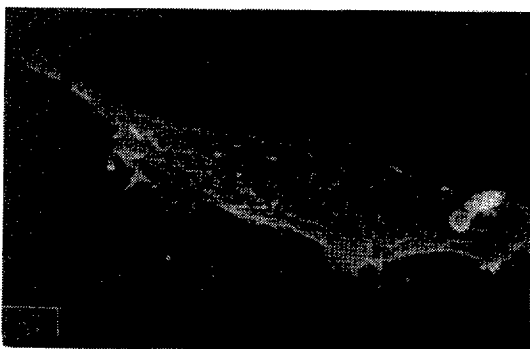
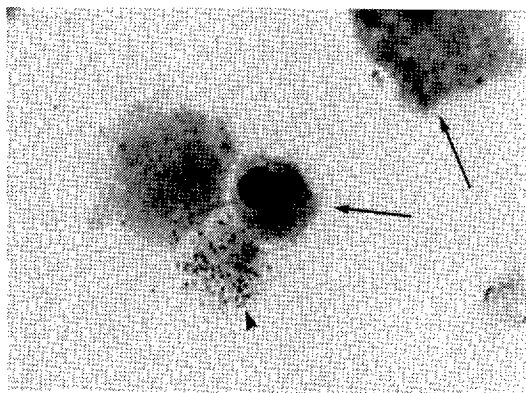


写真5 オートラジオグラフィー像 (IgA・I¹²⁵ 結合を示す)



↑:メサンジウム細胞

▲:マクロファージ様細胞(?)

を結合する機序の存在を推定している。本研究は, このうち, メサンジウム細胞に IgA を結合する能力が存在するか否かを検討する目的で行った。

方 法

ネブタール麻酔下にて, 家兎腎を in situ に

て生食で灌流し、血液細胞の contamination を防止したのち、腎摘出を行った。摘出腎から、Spiro らの変法にて、単離糸球体を得、Foidart らの方法に従って、RPMI 1640+10% FCS + 1 u/mI Insulin 添加の培養液中にて、37°C, CO₂ 5 %下で培養した(初代培養)。約1ヶ月後、継代培養を行いメサンジウム細胞をえた。

ヒト血清 IgA を Duellgast らの方法にて採取し、chloramine T 法にて I¹²⁵ をラベルし、培養メサンジウム細胞との結合を Radioimmunoassay, および光顕 radioautography にて検討した。

結果:

培養メサンジウム細胞は、走査電顕にて多くの細胞突起を有し、また透過電顕にて胞体内に actin filament と思われる microfilament を有していた。その他、2~3%であるが、細胞表面に多くの microwilli を有する血球型細胞 (Macrophage?) がみられた。RIA においては、IgA · I¹²⁵ は、10⁶ケのメサンジウム細胞に、約3100 pg の量で結合がみとめられた。しかし、一方、autoradiography では、光顕上、2種類の細胞がみられ、うち1種は、胞体、核ともに濃染し(ライト染色)、大小不同がみられ、他の1種は円形で、胞体、核も淡く、その数は、全体の数%であった。IgA · I¹²⁵ の dots は、autoradiography 上、この第2種目の細胞表面に顕著にみられた。Heat aggregate した IgA · I¹²⁵ と non-heart aggregate IgA · I¹²⁵ の結合量には大きく差はみとめられず、また cold aggregated IgA を使用した blocking test では、結合が約60%阻止された。

考案:

Autoradiography 上、IgA · I¹²⁵ の結合が強くとめられたのは、全メサンジウム細胞中数%存在する細胞であり、他は、結合がみられてもわずかであった。この細胞の数は、電顕でみとめられた Macrophage 様細胞の数量に一致すると推察され、IgA · I¹²⁵ を強く結合したのは本細胞であると思われた。一方、使用した IgA は intact な IgA であり、Fc, F(ab) portin に分解しておらず、そのため、この結合がどの部位を介して行われたのかは不明である。家兎腎は、完全に灌流

されており、血液中の細胞が混在した可能性はきわめて少ないと考えられることから、本細胞は、メサンジウム細胞の一つの subpopulation とも考えられた。Schreirer と Unanue らは、ラット腎メサンジウム領域に常在する Ia 陽性細胞(おそらく Macrophage) の存立を証明しており、本実験結果は、文献上、彼らの指摘する Ia 陽性細胞と一致するものと考えられた。これに関しては、我々もラット腎糸球体内に Ia 陽性細胞を確認しており、今後我々の IgA 結合細胞と Ia 陽性細胞の異同を確認する必要があると考えられた。一方、Macrophage が IgA の Fc receptor を有するか否かは、文献的には意見の異同がみられる。

家兎ラットの腎糸球体内に常時、免疫グロブリンのレセプターを有する細胞が存在するということは、ヒトの IgA 腎症のみならず、広く腎炎の発症に係る可能性も考えられ、今後、更に検討を加えていきたい。

(3) 家兎培養メサンジウム細胞に対するモノクローナル抗体の作製(写真6, 7)

IgA 腎症の発症および病態の進行の機序に関しては未だ不明の部分が多いが、免疫複合体などの異物の腎、ことにメサンジウムでの処理、排泄障害をひきおこすものと考えている。本研究は、①メサンジウム細胞を認識するモノクローナル抗体を作製し、IgA 腎症におけるメサンジウム細胞の動態を検討すること、②抗メサンジウム細胞モノクローナル抗体を使用して、メサンジウム細胞障害型の実験腎炎を作製することを目的とした。

写真6 モノクローナル抗体(KI-13)の蛍光像

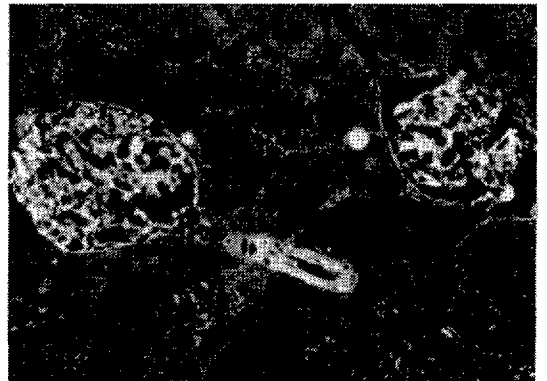


写真7 培養メサンジウム細胞と KI-13
の反応 (蛍光像)



KI-13 はメサンジウム細胞の細胞骨格を認識している。

方法：

前実験にて示した方法にて、家兎から培養メサンジウム細胞を採取した。これを抗原として、Kohler と Milstein らの方法に準じて、Balb/c マウスと本マウス由来の Myeloma 株 (X-63-Ag-8-653) を使用し、Hybridoma を作成した。抗体産生陽性 Hybridoma から 2 回の cloning を得て、モノクローナル抗体を作成した。なお、Screening は、蛍光抗体間接法にて行った。clone 化された Hybridoma を Balb/c マウス腹腔内 (pristane 処理済) に注射し、高力価の腹水を得た。この腹水から硫酸遠析法にて Ig を採取した。これを、家兎腎に灌流し、1~3 hrs 間に腎生検を行い、光顕、蛍光抗体法にて観察した。

結果：

5 種類のモノクローナル抗体を得た。これらは、すべて腎メサンジウム領域と反応していた。うち KI-13 は最も安定した抗体産生能を示していた。KI-13 は、腎メサンジウムの他、心筋や骨格筋の Z band や intercalated disk、動脈や腸管、子宮の平滑筋細胞とも反応していた。また、培養メサンジウム細胞との反応では、胞体内に存在する filamentous structure と反応していた。種々の吸収試験 (actin, myocin, fibroectin, 糸球体、基底膜、血球) から、KI-13 は、メサンジウム細胞の細胞骨格 (cytoskeleton) 蛋白、Desmin を認識していると考えられた。

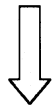
又、in vivo の実験においても、KI-13 は家兎腎のメサンジウム領域と反応しており、光顕像においても、白血球の浸潤がみられた。

考案：

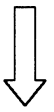
今回の成績から、得られた抗メサンジウムモノクローナル抗体 (KI-13) は、細胞骨格蛋白 (Desmin) を認識していると考えられたが、広くこの細胞骨格蛋白 (別名、intermediate filaments) は、筋肉系由来の細胞に含まれているとされており、一方、細胞内の代謝機能と密接な関係を有すると考えられている。本抗体は、メサンジウム細胞の種々の機能的変化を観察するために貴重な tool となり得ると考えられる。一方、in vivo でも、本抗体はメサンジウムと結合することが証明され、腎炎惹起性の可能性があるものと考えられた。

まとめ

以上、三つの異った研究内容の結果を報告したが、未だ不十分な部分も多く、さらに検討を加える必要があると考えている。我々はメサンジウム細胞に対して、種々の観点から多面的なアプローチを行い、その機能を解明することによって、臨床的な腎炎の病因に近づきたいと思っている。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



まとめ

以上,三つの異った研究内容の結果を報告したが,未だ不十分な部分も多く,さらに検討を加える必要があると考えている。我々はメサンジウム細胞に対して,種々の観点から多面的なアプローチを行い,その機能を解明することによって,臨床的な腎炎の病因に近づきたいと思っている。