

ヒト免疫抑制遺伝子と腎炎

笹 月 健 彦

九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門

序言腎疾患の中でも、急性溶連菌感染後糸球体腎炎は、発症に関与する環境要因が明らかであることから、この環境要因と直接作用する遺伝要因を解明することにより、急性溶連菌感染後糸球体腎炎の病因が明らかになると期待される。そこで急性溶連菌感染後糸球体腎炎発症に遺伝要因が寄与していることの証明として遺伝標識との相関、ここではHLAとの相関を検索し、HLA-B12-Dw 19との強い相関を証明した。他方、溶連菌に対するヒト免疫応答の遺伝的統御の解析から、HLAと連鎖した免疫抑制遺伝子の存在を証明した。ここでは、(1)急性溶連菌感染後糸球体腎炎とHLAとの相関の証明、(2)HLAに連鎖した免疫抑制遺伝子の存在の証明、(3)急性溶連菌感染後糸球体腎炎の病因論についての考察、(4)今後の研究の方針についてのべる。

対象急性溶連菌感染後糸球体腎炎患者のHLA抗原系の検索：非血縁関係の患者46名を対象とした。

溶連菌細胞壁抗原(SCW抗原)に対する免疫応答性：健康人家系として18才から60才までの28家系130名を対象とした。また健康人集団として、血縁関係を認めない18才から40才までの健康人149名を対象とした。

方法SCW抗原：急性糸球体腎炎の咽頭より分離されたA群12型溶連菌ss 95/12株をLancefieldとPerlmannの変法に従って粗精製したものをSCW抗原として用いた。

末梢リンパ球(PBL)、T細胞およびマクロ

ファージの分離：静脈穿刺によりヘパリン採血した静脈血より、Ficoll-Conray比重遠心法により、PBLを分離した。PBLを37℃1時間ディッシュにて培養し、ディッシュ付着細胞をラバポリスマンにてはく離してMφソースとし、ディッシュ非付着細胞をナイロン・ウールカラム通過細胞をHLA-DRフレームワーク抗体(HU-4)と家兔補体で処理したものをT細胞とした。

T細胞サブセットの分離：panning法にてヒトサブレッサーT細胞サブセットのマーカーである1eu2に対する単クローン抗体あるいは、ヒトヘルパーT細胞サブセットのマーカーである1eu3に対する単クローン抗体を用いて、T細胞を1eu2陽性細胞、1eu2陰性細胞あるいは1eu3陽性細胞、1eu3陰性細胞に分画した。

SCW抗原に対する免疫応答： 1×10^5 個のPBLを、10%非働化AB型ヒト男子血清、100μ/mlペニシリン、100μg/mlのストレプトマイシン、2mM/Lグルタミン添加RPMI-1640液0.2mlに浮遊し、SCW抗原と共に5%CO₂、37℃飽和水蒸気圧下で6日間培養した。さらに1μCiの³H-チミジンを各ウェルに加え、16時間培養後グラスフィルター上に細胞を回収した。これを液体シンチレーションカウンターにて、³H-チシジンの芽球内とり込みを測定した。

T細胞とMφの相互作用を検討する実験では、 7×10^4 個のT細胞に、 7×10^3 個、 3.5×10^3 個 1.75×10^3 個のautologous、あるいはallogeneic Mφを加え、平底マイクロタイタープレート中で1μgのSCW抗原と共に培養しT細胞分裂を観察した。

Table 1

HLA Type	Patients with Acute PG	Control Subjects	Relative Risk	χ^2
HLA-Aw19	37.0% (17/46)	22.2% (33/150)	2.1	4.14
HLA-B12	34.8% (16/46)	12.9% (20/150)	3.5	10.80
HLA-Dw19	35.7% (10/28)	5.8% (4/69)	9.0	14.44

Association between Acute Poststreptococcal Glomerulonephritis (PG) and HLA Specificities.

HLA タイピング: HLA-A, B, C ・ タイピングは PBL を用いて NIH 標準法により HLA-DR タイピングは PBL より トロンビン・ナイロン・ウールカラム変法で精製した B 細胞を用いて, 第 8 回国際組織適合性ワークショップ (1980 Los Angeles) 標準法にて行った。HLA-D タイピングは HLA-Dw1~Dw12, Dw15, Dw19 の HLA-D ホモ接合体タイピング細胞をマイトマイシン処理により刺激細胞とした one way mixed lymphocyte culture により行なった。

データ解析: in vitro T 細胞分裂の実験は, SCW 抗原添加時の cpm 値より抗原非添加時の cpm 値を差し引いたデルタ (Δ) cpm 値を求め, その自然対数値 ($\ln \Delta$ cpm) を分析の対象とした。

免疫応答性の遺伝様式の検定は, Morton の最尤法に従い, HLA と免疫応答性との連鎖は, Morton の逐次検定法 (lod score 法) により行なった。

成績) I 急性溶連菌感染後糸球体腎炎患者の HLA 抗原の検索: HLA-A 抗原では HLA-Aw19 が患者群で抗原頻度 37.0% と健康対照群の抗原頻度 22.2% に比して, 相対危険度 2.1, χ^2 値 4.14 と有意な増加を示した (Table 1), HLA-B 抗原では HLA-B12 が患者群で抗原頻度 34.8% であり, 健康対照群の抗原頻度 12.9% に比べて相対危険度 3.5 χ^2 値 10.80 と有意な増加を示した。

HLA-D 抗原では HLA-Dw19 の抗原頻度 35.7% で, 健康対照群の抗原頻度 5.8% と比べ

て有意の増加であった¹⁾。

II SCW 抗原に対する免疫応答性の遺伝的研究

1) 家系調査による免疫応答性の遺伝様式の検討: 対象とした 18 家系 84 名の家系構成員の免疫応答性の分布は $\ln \Delta$ cpm 値 9.6 (約 15,000 cpm) を境界として高応答群と低応答群にわかれた。

18 家系における免疫応答性の分離の状況を Table 2 にまとめた。免疫応答性と性別は特に関係は認められなかった。

免疫応答性の遺伝様式を Morton の最尤法に従い検討した。両親が高応答者と低応答者の家系で低応答性が劣性遺伝であるという仮説を検定したが, この仮説は棄却された ($p < 0.05$)。一方高応答性が劣性であるという仮説を両親共低応答者の家系と, 両親が高応答者と低応答者の家系を用いて検定したが, この仮説は棄却できなかった。これらのことから, 免疫応答性の遺伝様式は免疫低応答性が優性遺伝形質, あるいは高応答性が劣性遺伝形質であることが明らかにされた。

実験動物において明らかにされている免疫応答 (Ir) あるいは免疫抑制 (Is) 遺伝子はともに常染色体優性遺伝子であるため SCW 抗原に対する免疫低応答性は常染色体優性遺伝子により規定されていることが考えられた²⁾。

2) SCW 抗原に対する Is 遺伝子と HLA の連鎖: 免疫応答性の遺伝様式の検討に用いた 18 家系を用いて, Morton の逐次検定法により SCW 抗原に対する免疫低応答性と HLA の連鎖の検定をおこなった。その結果, lod score は

Table 2

Summary of the observed phenotypes of immune responsiveness to SCW antigen in 23 families

Phenotypes of parents	Phenotypes of children	Numbers of the families
H × H	(H,H)	1
	(H,H,H)	4
	(H,H,H,H)	1
H × L	(H)	1
	(H,H)	1
	(H,L)	1
	(L,L)	1
	(H,H,L)	1
	(H,L,L)	1
	(L,L,L)	2
	(H,H,H,L)	1
	(L,L,L,L)	1
L × L	(H,H)	1
	(H,L)	2
	(L,L)	1
	(L,L,L)	1
	(H,L,L,L)	1
		2

H = high responder, L = low responder.

組み換え率(θ)が0.00において最高値3.709を示し、SCW抗原に対する免疫抑制遺伝子とHLA Aとの密な連鎖が証明された。

3) SCW抗原に対する免疫抑制遺伝子の遺伝子頻度およびHLA Aとの連鎖不平衡：血縁関係を認めない健康人149名のうち高応答者は43名(28.9%)であり、低応答者は106名(71.1%)であり、SCW抗原に対する免疫抑制遺伝子の頻度は $0.462 (= 1 - \sqrt{0.289})$ と推定された。このうち97名のHLA-A, B, Cをさらに62名に関してHLA-DR, DQを決定した。この結果、SCW抗原に対する免疫抑制遺伝子はHLA-A 9, DQw1およびDRw52と正のHLA-DR 4およびDRw53と負の連鎖不平衡にあることが明らかになった。

Ⅲ SCW抗原に対する免疫低応答性の発現機序

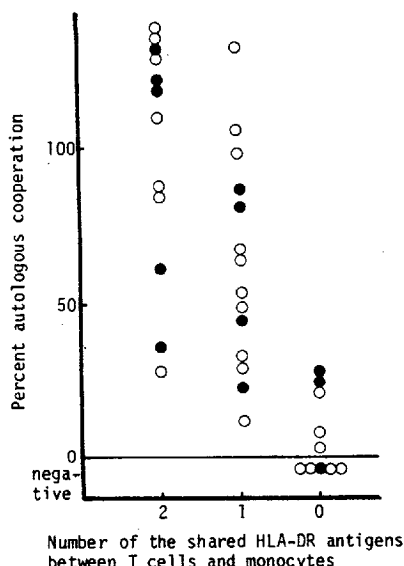
1) T細胞増殖反応のMφ依存性：PBLより分離してT細胞およびMφを単独でSCW抗原と培養しても増殖反応は認められなかったが、

T細胞はその2%以上の自己Mφの存在下に増殖反応を示した。このことからPBLのSCW抗原に対する増殖反応はMφ依存性であることが明らかにされた。

2) T細胞-Mφ相互作用における遺伝的制約：MLRがおこさない条件下でallogeneicなT細胞とMφの組み合わせにおけるSCW抗原に対する免疫応答性を検討した。Fig1に示すように、HLA-DR抗原を2ヶ共有する組み合わせでは免疫応答が観察されたが、HLA-DRを1も共有しない場合はほとんど免疫反応は認められなかった。したがってMφによるSCW抗原のT細胞への提示にはHLA-DRによる制約が存在することが明らかにされた。

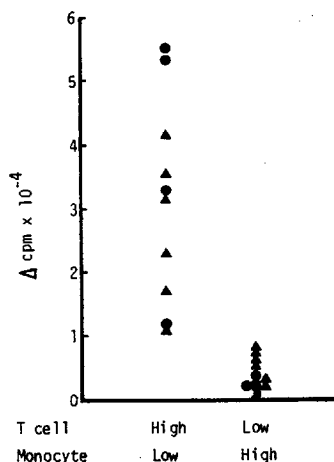
3) SCW抗原に対する免疫低応答性のT細胞レベルにおける発現：少なくとも1個のHLA-DRが共有されたT細胞とMφの組み合わせで、低応答者由来のT細胞あるいはMφと高応答者由来のMφあるいはT細胞との相互作用を検討した。Fig2に示すように、T細胞が高応答者由来であればたとえMφが低応答者であろうとも免疫応答が観察されたが、逆にT細胞が低応答者由来であると高応答者由来のMφと組み合わせても免疫応答は観察されなかった。これにより低応答者由来のMφも十分にSCW抗原提

Figure 2



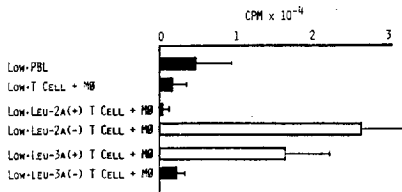
Genetic restriction by HLA-DR antigen in the cooperation between T cells and allogeneic monocytes in the immune response to SCW antigen *in vitro*. allogeneic monocytes from high responders (○) or from low responders (●).

Figure 1



Low responsiveness to SCW antigen was determined at T cell level. one HLA-DR antigen (▲) or two HLA-DR antigens (●) shared.

Figure 3



Evidence for the existence of helper T cells to SCW antigen in low responder.

示の能力を備えており SCW 抗原に対する低応答性は T 細胞レベルにより規定されている事が明らかにされた。

4) SCW 抗原に対する免疫低応答者におけるサプレッサー T 細胞の証明：低応答者 PBL よりサプレッサー T 細胞分画を除いた 1eu2 陰性ないし 1eu3 陽性のヘルパー T 細胞分画に著明な免疫応答を示した (Fig 3)。さらにこの 1eu2 陽性 T 細胞分画を HLA-DR を 1 個共有する高応答者由来 PBL に加えると免疫応答が著明に抑制された。すなわち低応答者の PBL には SCW 抗原に対するヘルパー T 細胞が存在するがサプレッサー T 細胞が存在するために SCW 抗原に対して低応答性を示すことが明らかとなった³⁾。

考察) 急性溶連菌感染後腎炎が class II 抗原である HLA-Dw19 と最も強い相関を示したことは、SCW 抗原に対する免疫応答性の遺伝的統御機構で示された如く、HLA クラス II 領域にマップされる Is 遺伝子とその発症に関与している可能性を示唆した。急性溶連菌感染後糸球体腎炎の原因となる抗原に対して高応答を示し、その結果免疫複合体が沈着し急性溶連菌感染後糸球体腎炎を発症させる機序と、逆に免疫応答を示さないため、免疫複合体が沈着し、この腎炎を発症させる機序が考えられる。前者の場合、HLA-Aw19-B12-Dw19 と Is 遺伝子は負の連鎖不平衡にあり、Is 遺伝子は疾患の発症を阻止するように働いていることになり、スギ花粉症⁴⁾

あるいは日本住血吸虫性肝硬変⁵⁾にて証明されている Is 遺伝子と同じ機能をもつことになる。後者の場合は HLA-Aw19-B12-Dw19 と Is 遺伝子は正の連鎖不平衡にあり、疾患の発症に働いていることになる。

今後、急性溶連菌感染後糸球体腎炎の遺伝要因を更に明らかにするために、HLA-DR, DQ 抗原のタイピング、HLA-Aw19-B12-Dw19 ハプロタイプの免疫応答性の解析、および免疫複合体の抗原性の検索をおこなう予定である。

結論) (1) 急性溶連菌感染後糸球体腎炎と HLA-Aw19-B12-Dw19 との相関を明らかにした。

(2) SCW 抗原に対する免疫低応答性は HLA に連鎖した Is 遺伝子により遺伝的に統御されていることを明らかにした。

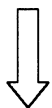
文献)

- 1) Sasazuki, T., Hayase, R., Iwamoto, I., and Tsuchida, H.: HLA and acute poststreptococcal glomerulonephritis. *N. Engl. J. Med.* 301:1184-1185, 1979.
- 2) Sasazuki, T., Kaneoka, H., Nishimura, Y., Kaneoka, M. and Ohkuni, H.: An HLA-linked immune suppression gene in man. *J. Exp. Med.* 152:297s-313s, 1980.
- 3) Nishimura, Y., Sasazuki, T.: Suppressor T cells control the HLA-linked low responsiveness to streptococcal antigen in man. *Nature.* 301:67-69, 1983.
- 4) Sasazuki, T., Nishimura, Y., Muto, M., Ohta, N. HLA-linked genes controlling the immune response and disease susceptibility. *Immunol. Rev.* 70:51-75, 1983.
- 5) Ohta, N., Minai, Sasazuki, T. Antigen-specific suppressor T lymphocytes (Leu-2a⁺ 3a⁻) in human schistosomiasis japonica. *Journal of Immunology,* 131:2524-2528 (1983)



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



結論)(1)急性溶連菌感染後糸球体腎炎と HLA-Aw19-B12-Dw19 との相関を明らかにした。

(2)SCW 抗原に対する免疫低応答性は HLA に連鎖した Is 遺伝子により遺伝的に統御されていることを明らかにした。