

ヒト腎尿細管抗原の同定

柴田 整一、名取 泰博

国立病院医療センター 臨床研究部

序 言

膜性腎炎が免疫複合体病であることは、抗体や補体が腎基底膜の上皮下に沈着していることから広く信じられているが、その抗原となっているものが何なのか、B型肝炎ウイルスなどの二次的な場合を除けば全く分かっていない。

Heymann腎炎はラット腎尿細管抗原(通常F_x1Aと呼ばれる)をラットに免疫して惹き起こす実験腎炎であり、形態学的・臨床的な類似から、ヒト膜性腎炎のモデルとして広く用いられている^{1,2)}。1982年、Heymann腎炎を起こしたラットの糸球体溶出抗体と結合する抗原として、ラット腎尿細管刷子縁膜から分子量33万の糖蛋白(gp330)が単離された³⁾。単離したgp330をラットに投与すると、係蹄壁に沿ってラットIgGの顆粒状の沈着が観察された。一方我々は、ラットF_x1Aから分子量10万8千の糖蛋白(gp108)を単離し、ウサギ抗gp108抗体をラットに投与すると、速やかに高度の蛋白尿を伴ったHeymann腎炎が起こることを報告した⁴⁾。

ラットF_x1AのかわりにヒトF_x1Aをラットに投与してもラットF_x1Aの場合と同様のHeymann腎炎が起きること⁵⁾から、ヒトF_x1AにもHeymann腎炎を惹起し得る抗原が存在すると考えられ、この抗原がヒト膜性腎炎に関与する可能性も有り得る。しかしながら、これまで同定されたラット抗原に対する異種または同種の抗体を用いた検索では、ヒト腎組織にはこれらの抗原と免疫学的に交差する抗原は検出することができなかった⁶⁾。

本研究では、ヒト膜性腎炎の病因抗原を探索

するためのひとつの方法として、ヒトF_x1A中のHeymann腎炎関連抗原を同定することを試みた。そのために、ヒトF_x1Aを投与して惹き起こしたHeymann腎炎ラットの血清や腎溶出抗体を用いて、これらの抗体の特異性を明かにするとともに、対応するヒト抗原の同定を行った。

方 法

ラットF_x1AはEdgingtonらの方法¹⁾によりラット腎皮質から調製し、1% Triton X-100にて可溶化した。ヒト腎皮質は腎の腫瘍摘出時の正常部分を用い、ラットF_x1Aの方法に準じてヒトF_x1Aを調製した。gp108はTriton可溶化ラットF_x1Aから精製した⁴⁾。gp330はラットF_x1Aから1% sodium deoxycholateにて可溶化し、ゲルろ過・硫酸分画により部分精製を行った。

Heymann腎炎は等量の Freund 完全アジュバントと混和したヒトF_x1A 6mgを、ラット(ウィスター系雄130-150g)の足蹠内に投与して作製した。経時的に血清及び尿を採取し、24週後に屠殺、腎臓を摘出し、蛍光抗体法及び抗体の溶出実験に用いた。コントロールラットには、生食をアジュバントと混ぜたものを投与した。

酵素抗体(ELISA)法はTriton X-100で可溶化したラットまたはヒトF_x1Aを用いて、マイクロプレートにて行った。

SDS-polyacrylamideゲル電気泳動は5-15%のグラディエントゲルを用いて非還元条件下で行い、nitrocellulose膜へ電氣的に転写し、たんぱく染色、または種々の抗体希釈溶液、酵素標識ヤギ抗ラットIgG抗体希釈液、

基質溶液と順次反応させ発色させた。

成績

ヒトF_x1Aを投与した5匹のラットはいずれも投与後12-20週の間には蛋白尿が出現した(図1)。蛍光抗体直接法による腎組織の検索の結果、糸球体係蹄壁に沿ってラットIgGが顆粒状に沈着しているのが観察された(図2)。

血清及び腎溶出液中の抗体価とその特異性をELISA法にて検討したところ、ヒトF_x1A投与ラットの血清中には抗ヒトF_x1A抗体ばかりでなく、抗ラットF_x1A抗体も観察された(図3)。一方腎溶出液中にも両抗体活性とも検出されたが、その抗ラットF_x1A抗体活性は血清に比べ高い活性を示した(図4)。

血清中及び腎溶出液中の両種のF_x1Aに対する抗体活性が同一抗体によって担われているか否

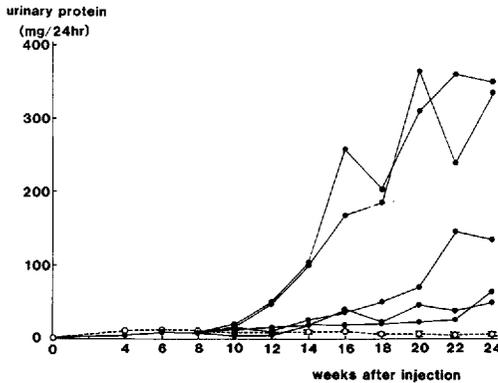


図 1

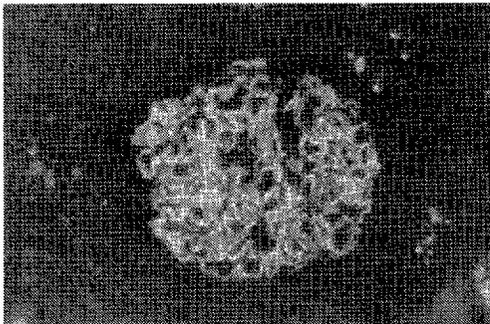


図 2

Anti-Human F_x1A (A) and Anti-Rat F_x1A (B) Ab in Sera of Human F_x1A-injected Rats

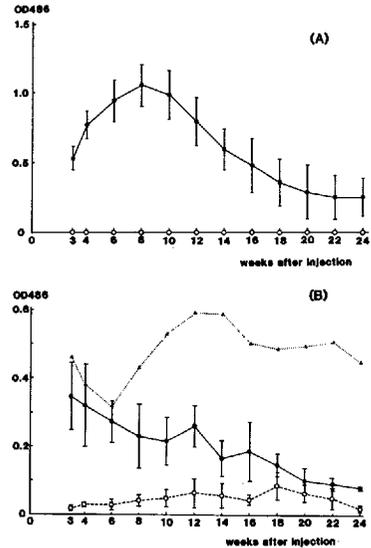


図 3

かを確かめるために、ELISA法の阻害実験を行った。図5(A)に示すように、ヒトF_x1Aと血清抗体(投与後3週目の血清)との反応は、ヒトF_x1Aではほぼ完全に阻害されるが、ラットF_x1Aではその一部しか阻害されなかった。一方ヒトF_x1Aと溶出抗体の反応は、ラットF_x1Aによってその大部分(約90%)が阻害され、さらにラットgp330によっても阻害された(B)。ラットgp108にはほとんど阻害活性は見られなかった。またラットF_x1Aと溶出抗体との反応はヒト、ラットどちらのF_x1Aによっても阻害された(図略)。これらの結果から、腎溶出液中の同一抗体がヒト及びラットの抗原と反応すること、ラットの抗原はおそらくgp330であることが示された。またこの交差反応性を有する抗体がHeymann腎炎を惹き起こすのに主要な役割を担っていることが示唆された。

ヒトF_x1A投与ラットの血清及び腎溶出抗体と反応する抗原を、免疫ブロット法にて同定した(図6)。ヒトF_x1Aを抗原とすると、両抗体とも

Anti-Human and Anti-Rat Fx1A Antibodies in Eluate from Glomeruli (A) and Sera (B) of Human Fx1A-injected Rats

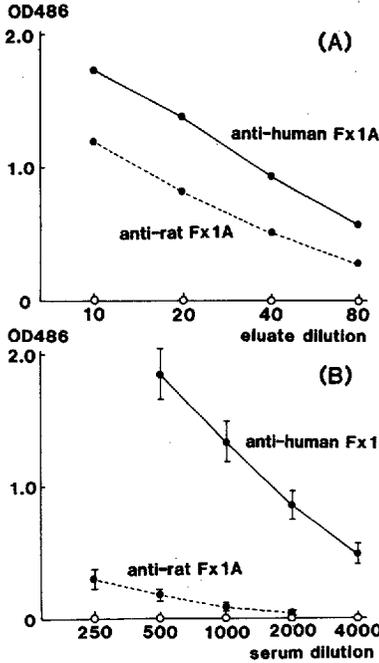


図 4

主に分子量約44万のバンドと反応し(レーン3、5)、更にこのバンドはラットgp330(レーン7)と同じ移動度を示した。またラットFx1Aを抗原として反応させると、両抗体はラットgp330と反応した。これらの結果から、ヒトFx1A投与ラットの血清及び腎溶出液中の抗体は、主にヒト分子量44万の抗原とラットgp330とに反応することが分かった。この分子量44万のヒト抗原はコンカナバリンAに結合することから、糖蛋白であることが示された(図略)。

考 察

ヒト腎尿細管膜画分のHeymann腎炎の病因抗原として分子量44万の糖蛋白(以下440kd抗原と略す)が同定された。440kd抗原は免疫学的にラットgp330と交差し、電気泳動上でgp

Inhibition Activities of Crude and Purified Renal Tubular Antigens on ELISA

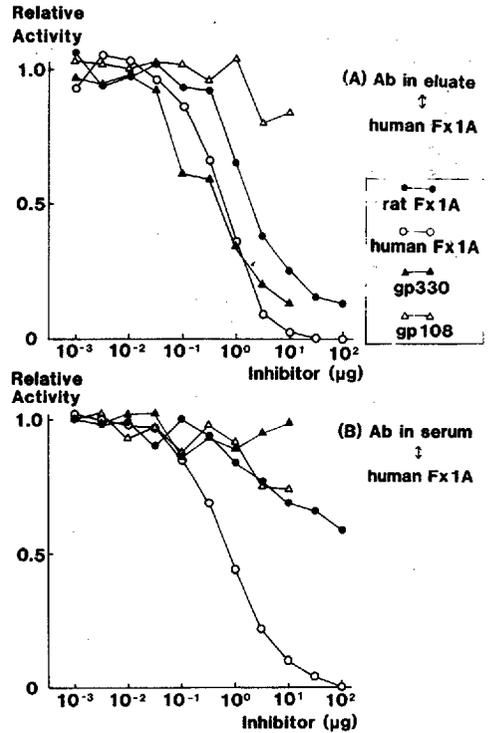
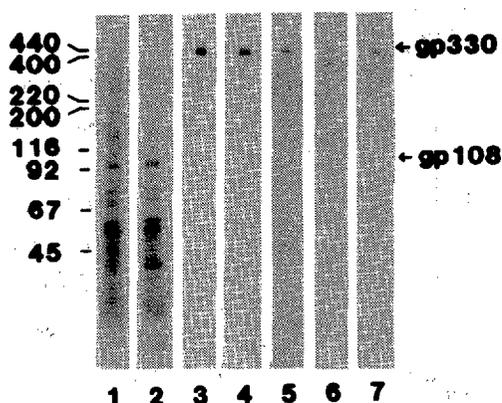


図 5

330と同じ移動度を示した(すなわちラットgp330は我々の実験系では、非還元型フィブロネクチンと同じ分子量の44万を示した)。ヒトFx1Aを投与してHeymann腎炎を起こしたラットの血清及び腎溶出液中の抗体が主にこの440kd抗原と反応したことから、この抗原がヒト尿細管抗原中のHeymann腎炎病因抗原であることが示唆された。

また腎溶出抗体は、ヒト440kd抗原ばかりでなくラットgp330とも結合することが、ELISA阻害実験及び免疫プロット法により示された。血清中の抗体とヒトFx1Aとの結合は、ラットFx1Aにより部分的にしか阻害を受けないことから、血清抗体にはヒト及びラットの両抗原と反応する抗体と、ヒト抗原に特異的な抗体の2種類の抗体が存在すると考えられた。すなわち、

SDS-PAGE及び免疫ブロット法



抗原：1、3、4＝ヒト Fx1A
 2、5-7＝ラット Fx1A
 抗体：3、5＝ヒト Fx1A 投与ラット血清抗体
 4、6＝同ラット腎溶出抗体
 7＝ラット Fx1A 投与ラット腎溶出抗体
 1、2＝全たんぱくを染色

図 6

これらの特異性の異なる2種類の抗体のうち、両抗原に反応する抗体が選択的に糸球体に沈着したことが示唆された。

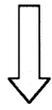
ヒト膜性腎炎に尿管抗原が関与するか否かのこれまでの研究の殆どは未精製抗原に対する抗体を用いて行われており、明確な結論は得られていない。今後ヒト440kd抗原の精製を行い、精製標品に対する抗体を用いて、440kd抗原が膜性腎炎に関与するかどうか検討する予定である。

結 論

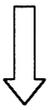
能動Heymann腎炎の病因抗原として同定された糖蛋白 gp330と免疫学的・生化学的に類似した抗原(440kd)が、ヒト腎尿管にも存在することが示された。

参 考 文 献

- 1) Heymann W., Hackel D.B., Harwood J., Wilson S.G.F. and Hunter J.L.P.: Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvant and rat kidney suspensions. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100;660-664, 1959.
- 2) Edgington T.S., Glasscock R.J., Watson J.I. and Dixon F.J.: Characterization and isolation of specific renal tubular epithelial antigens. J. Immunol. 99; 1199-1210, 1967.
- 3) Kerjaschki D. and Farquhar M.G.: The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79;5557-5561,1982.
- 4) Natori Y., Hayakawa I. and Shibata S.: Passive Heymann nephritis with acute and severe proteinuria induced by heterologous antibody against renal tubular brush border glycoprotein gp108. Lab. Invest. 55;63-70, 1986.
- 5) Edgington T. S., Glasscock R.J. and Dixon F.J.: Autologous immunocomplex pathogenesis of experimental allergic glomerulonephritis. Science 155;1432-1434, 1967.
- 6) Goodyer P.R., Mills M. and Kaplan B.S.: Analysis of Heymann nephritogenic glycoprotein in rat, mouse, and human kidney. Biochem. Cell Biol. 64;441-447, 1986.



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

能動 Heymann 腎炎の病因抗原として同定された糖蛋白 gp330 と免疫学的・生化学的に類似した抗原(440kd)が、ヒト腎尿細管にも存在することが示された。