



Inhibitory Effect of Lysozyme on the Intrglomerular Immune Complex Formation in Lupus Mice

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山本, 龍夫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/899

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 46号	学位授与年月日	昭和62年 3月26日
氏名	山本 龍夫		
論文題目	Inhibitory Effect of Lysozyme on the Intraglomerular Immune Complex Formation in Lupus Mice (ループスマウスにおける糸球体免疫複合体形に対する Lysozyme の抑制効果)		

医学博士 山本 龍夫

論文題目

Inhibitory Effect of Lysozyme on the Intraglomerular Immune Complex Formation in Lupus Mice

(ループスマウスにおける糸球体免疫複合体形成に対する Lysozyme の抑制効果)

論文の内容の要旨

糸球体基底膜 (glomerular basement membrane: GBM) は "size barrier" として高分子蛋白の透過を規制するとともに、そこに分布する陰荷電物質は "charge barrier" として蛋白の透過を制御している。一方、腎炎を惹起する免疫複合体 (immune complex: IC) の GBM への沈着にも荷電の関与が指摘されており、外因性の荷電物質が GBM での IC 沈着に影響する可能性も考えられる。本研究では陽荷電蛋白である lysozyme (Ly) が全身性エリテマトーデスのモデルである New Zealand Black/White (NZB/W) F₁ マウスの糸球体への IC 沈着、及び、同マウスでの沈着抗原のひとつと思われる DNA の GBM 結合に与える影響を調べた。

〔方法〕

1) *in vivo* 実験: 7月齢の雌 NZB/W F₁ マウスを片側腎摘し、2.5% Ly 溶液投与群 (A群)、生理食塩水投与群 (B群)、コントロールとして、片側腎摘 ICR マウスを、Ly 溶液 (C群)、又は、生理食塩水 (D群) を1日2回、0.5 ml ずつ連日腹腔内投与した群に分け、9日後に屠殺して腎病変を比較した。A群とB群では屠殺直前に血中抗DNA抗体価をラジオイムノアッセイ法にて測定した。

2) *in vitro* 実験: Phosphate buffered saline (PBS) 溶液に懸濁した単離 GBM に ¹²⁵I でラベルした DNA を加え、PBS のみ、または、加熱不活化した血清、血漿、fibronectin 除去血漿、fibronectin の各々の存在下にて、37℃ でインキュベートし、遠心洗浄後の GBM を γ-カウンターで計測して GBM への DNA 結合率を求めた。次いで Ly 及び他の陽荷電物質である hexadimethrine (HDM) 添加による DNA 結合率の変化を調べた。

〔結果〕

1) NZB/W F₁ マウスでは片側腎摘後、糸球体病変が急激に悪化し、主に GBM への IgG、C₃ の沈着が増加したが、Ly 投与群 (A群) では Ly 非投与群 (B群) に比し変化は軽度であった。また、両群では血中抗DNA抗体価に有意差はなかった。ICR マウスの C群、D群では糸球体に変化はみられなかった。

2) DNA は血清、血漿、fibronectin の存在下で GBM に結合し、PBS 及び fibronectin 除去血漿中では GBM に結合しなかった。また、Ly や HDM はこの DNA の GBM への結合を抑制した。

〔考案〕

NZB/W F₁ マウスの腎炎発症には DNA-抗DNA 複体の関与が示唆されている。近年、DNA-抗DNA 複体自体は GBM に結合し難いのに対し、DNA 単独では GBM に親和性を呈することより、GBM 上での "in situ" 免疫複合体形成の可能性が考えられており、この DNA の GBM への結合には荷電が関与している可能性も指摘されている。本実験では、陽荷電蛋白である Ly は NZB/W F₁ マウスで片側腎摘後の GBM への急激な IC 沈着を血中抗DNA抗体価を変化させることなく抑制した。また、*in vitro* 実験では DNA は陰荷電蛋白の fibronectin を介して GBM に結合し、陽荷電の Ly や HDM はこの機序による DNA の GBM への結合を抑制した。以上より、Ly は NZB/W F₁ マウスの糸球体沈着抗原のひとつである DNA と GBM との fibronectin を介した結合を静電的に抑制することにより GBM への IC 沈着を軽減する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

腎糸球体における蛋白の透過を規制する機構は糸球体毛細血管基底膜 (glomerular basement membrane, GBM) にある。GBMは蛋白透過に対して size barrier として働くとともに陰性荷電物質の存在により charge barrier としての機能があり、糸球体腎炎を起こす免疫複合体 (immune complex, IC) のGBM内沈着にも荷電の関与があると考えられている。申請者はICのGBM沈着に対する外来性荷電物質の影響をみるために全身性エリテマトーデス (SLE) のモデル動物である New Zealand Black/White (NZB/W) F₁ マウスと陽性荷電物質としての lysozyme (Ly) を用い in vivo 及び in vitro の実験を行った。in vivo 実験では光顕及び蛍光抗体法で Ly の腎に対する影響を観察するとともに血中抗DNA抗体価を測定した。in vitro 実験では単離GBMに対する ¹²⁵I 標識二本鎖DNAの結合性とこれを支配する因子を検討した。

その結果、in vivo 実験では NZB/W F₁ マウス (7月齢雌) は片腎摘出により急激に糸球体病変が悪化しGBMへのIgG、C3の沈着が増加したが、Ly投与群では非投与群に比して病変、IgG及びC3の沈着とともに軽度であった。血中抗DNA抗体価にLy投与の有無において変化はなかった。

in vitro 実験では、DNAは血清、血漿又は fibronectin の存在下でGBMに結合し、fibronectin では濃度依存性であった。fibronectin 除去血漿や緩衝生理的食塩水中では結合は起こらなかった。Lyおよび他の陽性荷電物質 hexadimethrine (HDM) はDNAの結合を抑制した。

以上の結果から、DNAのGBMへの沈着は fibronectin を介するものであることが判明した。他方、DNA-抗DNA複合体はGBMに結合し難いのに対し、DNAは単独ではGBMに親和性を持ち、DNA-抗DNA複合体のGBMへの沈着はDNAがまずGBMに結合し、二次的に抗DNAが結合して形成されると考えられている。したがって、LyのGBM内IC沈着軽減効果はLyが陰性荷電物質である fibronectin を介するDNAのGBMへの結合を静電的に抑制することにあると推定された。

上記の論文は委員会において、実験条件において適切であり、ループス腎炎の病理発生解明に資するとともに、治療方針に対する示唆も含むものと高く評価された。なお審査の過程で以下のような問題が論議された。

1. 片腎摘出が腎炎を悪化させる理由。
2. 抗Ly抗体産生の状態およびこれによる腎炎修飾の可能性。
3. GBMの荷電状態は単離の作業により影響されないか。
4. Ly投与による延命効果の有無。
5. in vitro 系において無 fibronectin 血漿中でDNAのGBMへの結合がわずかながら認められるのは何によるか。
6. LyによるIC沈着抑制効果にはイオン強度だけでなく他の因子の関与する可能性はないか。

これらに対する申請者の応答は適切であり、本審査委員会は本論文が医学博士の学位授与に値する十分な内容を備えているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	白澤春之	副査	教授	西村頭治
	副査	教授	櫻井信夫	副査	講師	池田靖
	副査	教授	吉見輝也	副査		