

論 文 要 旨

Insulin-like growth factor binding protein-1 levels are increased in patients with IgA nephropathy

IgA 腎症患者の血清中 IGFBP-1 濃度は上昇する

徳 永 公 紀

【序論および目的】

IgA 腎症は原発性慢性糸球体腎炎の中で最も頻度が高く、その約 40%が末期腎不全に至る予後不良な疾患であるが、その発症メカニズムは十分解明されていない。本研究では IgA 腎症モデルマウスの腎組織中に発現する遺伝子を網羅的に解析し、病態の発症および進展に関連する遺伝子を探索した。また、IgA 腎症モデルマウスの腎組織で発現が亢進している insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) について、IgA 腎症患者における臨床的意義を検討した。

【材料および方法】

1. ddy マウスの中で血清 IgA が高く、IgA 腎症のモデルマウスとして確立された IgA 腎症モデルマウスである HIGA マウスとコントロールマウス (ddy マウス) を用いて、それぞれ 16 週齢および 32 週齢の血清学的評価および腎組織の病理組織学的検討を行った。また、腎組織から RNA を抽出し、Affymetrix 社製のマイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子発現を比較検討した。
2. 同意の得られた IgA 腎症患者 58 名の血清中 IGFBP-1 蛋白濃度を ELISA 法により測定し、血清 IGFBP-1 濃度と臨床背景、生化学所見、及び腎組織障害度 (メサンギウム細胞増殖、間質線維化、糸球体硬化) との関連について検討した。

【結 果】

1. 16 週齢および 32 週齢の ddy マウスでは血清 IgA 濃度は変化しなかったが、HIGA マウスでは 16 週齢と比較して 32 週齢時の血清 IgA 濃度は有意に上昇した (平均濃度 ; 498.1mg/dl vs. 203.0mg/dl, $p < 0.05$)。また、HIGA マウスでは 16 週時点で腎のメサンギウム領域への IgA 沈着を認め、32 週齢ではメサンギウム細胞増殖および糸球体硬化像が出現したが、ddy マウスではこのような変化はなかった。
2. 16 週齢と 32 週齢のマウス腎組織の遺伝子発現の比較で、ddy マウスでは 325 個の遺伝子が 2.5 倍以上減少し、逆に HIGA マウス群では 127 個の遺伝子が 2.5 倍以上増加していた。これらの遺伝子の中で、5 つの遺伝子 (IGFBP-1, Acot2, Plau, ACSM2, transcribed locus) は ddy マウスでは減少し、かつ HIGA マウスでは増加していた。さらに、quantitative RT-PCR による IGFBP-1 の遺伝子発現はマイクロアレイと同様の結果であった。

3. IgA 腎症患者の血清 IGFBP-1 濃度は、健常者に比べ有意に高値で ($23.4 \pm 31.1 \text{ ng/ml}$ vs. $6.5 \pm 8.6 \text{ ng/ml}$, $p < 0.001$)、IgA 腎症患者の血清 IGFBP-1 濃度は BUN 値と正に、推定糸球体濾過量 (eGFR) とは負に相関した。また、尿蛋白量が 0.5 g/day 以上の IgA 腎症患者では、 0.5 g/day 以下の IgA 腎症患者と比較し、有意に IGFBP-1 濃度が高値であった。さらに、組織学的には、メサンギウム細胞増殖の程度と IgA 患者の血清 IGFBP-1 濃度は正に相関した。

【結論及び考察】

HIGA マウスでは、病態の進展と関連して腎組織中の IGFBP-1 遺伝子発現は亢進し、IgA 腎症患者血清中の IGFBP-1 蛋白濃度は健常者と比較し高値であった。また、IgA 腎症患者血清中の IGFBP-1 蛋白濃度は、腎機能低下や尿蛋白量と相関し、メサンギウム細胞増殖の程度と関連した。これらの結果から IGFBP-1 は IgA 腎症の病態と関連すると考えられた。

(Biochemical and Biophysical Research Communications Vol.399 2010 年 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 127 号	学位申請者	徳永 公紀
審査委員	主査	中川 昌之	学位
	副査	米澤 傑	副査
	副査	橋口 照人	副査
			堀内 正久

Insulin-like growth factor binding protein-1 levels are increased in patients with IgA nephropathy

(IgA 腎症患者の血清中 IGFBP-1 濃度は上昇する)

血液透析患者が毎年約 1 万人ずつ増加を続ける現在、末期腎不全に至る腎疾患の病態解明は極めて重要である。慢性糸球体腎炎は、末期腎不全に至る腎疾患の中で糖尿病について 2 番目に多い疾患群である。IgA 腎症は慢性糸球体腎炎の中で最も頻度が高く、その約 40% は末期腎不全に至る予後不良な疾患であるが、その発症・進展機序は十分解明されていない。このような背景から、本研究では IgA 腎症モデルマウスの腎組織中に発現する遺伝子を網羅的に解析し、発現亢進する遺伝子の蛋白レベルについて、IgA 腎症患者での臨床的意義を検討した。まず、IgA 腎症モデルマウスである HIGA マウスと対照 (ddY) マウスを用い、それぞれ 16 週および 32 週齢の血清学的評価、腎組織の病理組織学的検討および腎組織に発現した遺伝子の網羅的解析を行った。次に、マウスの解析で発現亢進している Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) の IgA 腎症患者における血清中濃度を ELISA 法により測定し、血清 IGFBP-1 濃度と臨床背景、生化学所見、及び腎組織障害度との関連について検討した。その結果、本研究では以下のような知見が明らかにされた。

- 1) 32 週齢 HIGA マウスでは、ddY マウスや 16 週齢の HIGA マウスと比較して、血清 IgA 濃度が高く、組織学的にはヒト IgA 腎症に類似したメサンギウム細胞増殖および糸球体硬化が出現した。
- 2) 16 週齢と 32 週齢のマウス腎組織の遺伝子発現の比較で、ddY では 325 個の遺伝子が 0.4 倍以下に減少し、逆に HIGA では 127 個の遺伝子が 2.5 倍以上増加した。両者に共通する 5 つの遺伝子のうち細胞増殖に関連する IGFBP-1 に着目し、quantitative RT-PCR により同様の遺伝子発現変化を確認した。
- 3) IgA 腎症患者の血清 IGFBP-1 濃度は、健常者に比べ有意に高値で、推定糸球体濾過量 (eGFR) とは負の相関を示した。また、IgA 腎症患者では尿蛋白 0.5g/day 以下の群と比べ 0.5g/day 以上の群の方が有意に IGFBP-1 濃度は高値であった。さらに、組織学的には、メサンギウム細胞増殖の程度と血清 IGFBP-1 濃度は正に相関した。

本研究では、IgA 腎症モデルである HIGA マウスにおいて、病態の進展と関連して腎組織中の IGFBP-1 遺伝子発現が亢進することを示した。また、IgA 腎症患者の血清 IGFBP-1 濃度は健常者と比較し高値であり、腎機能低下や尿蛋白量、メサンギウム細胞増殖の程度と相関することも示している。これらの結果は IGFBP-1 が IgA 腎症の病態進展と関連する可能性を示唆しており、新しい知見であり、極めて興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 127 号	学位申請者	徳永 公紀
審査委員	主査	中川 昌之	学位 博士 (医学)
	副査	米澤 傑	副査 高嶋 博
	副査	橋口 照人	副査 堀内 正久
<p>主査および副査の 5 名は、平成 23 年 2 月 15 日、学位申請者 徳永 公紀 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問 1) 透析導入患者の原疾患の中で、慢性糸球体腎炎の割合が減少している理由はなぜか？ (回答) 治療法の進歩 (扁桃腺摘出や ARB の積極的投与) により腎不全に至る症例が減少したためと考えられる。</p> <p>質問 2) IgA 腎症における積極的加療とはどういうものか？ (回答) 扁桃腺摘出術+ステロイドパルス療法。</p> <p>質問 3) 16 週齢及び 32 週齢マウスはヒトでは何歳くらいか？ (回答) 平均寿命から推測すると大体 15 歳~25 歳くらいの年齢と考えられる。</p> <p>質問 4) IGFBP-1 が近位尿細管のみ染色される解釈は？他の部位で産生されないのか？ (回答) IGFBP-1 は近位尿細管で産生され、糸球体で濾過されたものが吸収されたと解釈している。ラットでは遠位尿細管やヘンレループでの発現が報告されており、技術的な問題で発現を十分な検出出来なかった可能性はある。</p> <p>質問 5) 糸球体係蹄のみをマイクロダイセクションで単離し、検討している報告はあるか？その結果はどうか？ (回答) IgA 腎症での報告はないが、ループ腎炎や巣状糸球体硬化症での報告がある。しかし、IGFBP ではなく、Th1 関連ケモカイン、補体や TGF シグナルの結果が報告されている。</p> <p>質問 6) マウスのメサンギウムに沈着しているのは免疫複合体か？ヒトと同様のものか？ (回答) IgA-IgG 複合体だけでなく多量体 IgA なども沈着し、ヒトと同様の性質を有していると報告されている。</p> <p>質問 7) 16 週齢および 32 週齢同士の IGFBP-1 の発現を比較するとどうであったか？ (回答) 病態に差がない 16 週齢マウスでは、HIGA より ddY マウスで発現が亢進していた。一方、IgA 腎症様の病態を呈する 32 週齢では、ddY に比べ HIGA での発現量が約 1.3 倍亢進していた。</p> <p>質問 8) メサンギウムに発現する既知の遺伝子の動きはどうか？ (回答) メサンギウム細胞特異発現遺伝子として megsin が知られているが、今回用いたマイクロアレイの chip ではその遺伝子発現を解析出来なかった。他、α-actinin や actin、myosin などは経時的変化を認めなかった。</p> <p>質問 9) 糸球体肥大と糸球体硬化という用語の意味はどうか？ (回答) 糸球体肥大は血管腔の拡張を伴うボウマン嚢の拡大を示し、糸球体硬化はメサンギウム基質の増加や基底膜の重なりによってできる病理所見を示す。</p> <p>質問 10) EMT 作用のある TGF-β と IGFBP-1 の関連はどうか？ (回答) 腎での報告はないが、肝細胞では IGFBP-1 が MMP-9 を介して TGF-β 1 の活性化を抑制することでアポトーシスを制御し、EMT と関連する可能性が報告されている。</p> <p>質問 11) IGFBP-1 は炎症により発現が亢進するか？IGFBP-1 の転写と NF-κB との関連はどうか？ (回答) 炎症との関連については、明らかにされていない。</p>			

最終試験の結果の要旨

質問 12) 血清 C3 濃度は、IgA 腎症患者では高いが、IGFBP-1 高値群では低い。なぜか？

(回答) 血清 C3 濃度は腎炎の程度を反映するものではないため IGFBP-1 との直接的な関連はないと考える。

質問 13) HIGA マウスが IgA 高値となる原因は？機序や原因遺伝子等について

(回答) PDGF-EDG5 シグナリング、Th2 優位の Th2/Th1 アンバランスが関与しているとの報告がある。

質問 14) IGFBP-1 の機能は？血中でどのような形態で存在しているか？

(回答) IGF と結合し、IGF の半減期や活性を調節する。二元あるいは三元複合体で存在すると報告されている。

質問 15) 肥満・BMI との関連は検討したか？

(回答) 検討していない。

質問 16) 低蛋白食にすると IGFBP-1 はどういった変化をするのか？

(回答) 今まで報告はないが、低蛋白状態では肝からの IGFBP-1 発現が亢進し、血清中濃度は上昇する可能性がある。

質問 17) IgA 腎症はなぜアジアや日本に多いのか？

(回答) 人種による相違や腎生検の頻度など様々な要因が考えられるが、詳細は分かっていない。

質問 18) マウス血清中の IGFBP-1 濃度はどうであったか？

(回答) 32 週齢同士で比較したが、HIGA の方が高値を示した。(平均：15.0±6.8 vs 9.3±3.5 ng/ml)

質問 19) IgA と IGFBP-1 は両者ともに高値を示すが、両者にどういった関連がいられているか？

(回答) 現在のところ関連を示唆する報告はなし。我々の検討でも、明らかな関連はなかった。

質問 20) IgA 腎症患者ではなぜ IgA が高値を示すのか？

(回答) 粘膜や骨髄での IgA 産生が亢進することと、IgA のクリアランスが低下することが考えられている。

質問 21) IGFBP-1 はメサンギウム細胞増殖にどのように関与していると考えられるか？

(回答) GH/IGF を介さず、単独あるいは $\alpha 5 \beta 1$ integrin を介して細胞増殖に関与している可能性が考えられる。

質問 22) 32 週齢 HIGA マウスの IGFBP-1 の発現レベルは ddY16 週齢とほぼ同じだが、どう解釈するか？

(回答) IGFBP-1 遺伝子発現が高いだけでなく、経時的に遺伝子発現が高くなることにも病的意義があると考えている。

質問 23) IGFBP-1 のリガンドは IGF のみか？

(回答) IGFBP-1 は IGF-1、IGF-2 と $\alpha 5 \beta 1$ integrin にも結合する。

質問 24) IGFBP-1 が IgA 腎症で上昇しているが、どういった役割を呈していると考えられるか？

(回答) IgA がメサンギウムに沈着した後の細胞増殖に寄与している可能性を考える。

質問 25) 尿中の IGFBP-1 レベルを調べたか？

(回答) 測定したところ、測定感度以下であった。

質問 26) IGFBP-1 高値群では年齢が高いが、罹病期間との関連の可能性は考えられないか？

(回答) 罹病期間と障害の程度に有意な相関はないので、年齢との関連はないと考えられる。

質問 27) IgA 腎症が腎不全に陥るまでの期間はどれくらいか？

(回答) 炎症の強い状態では 5 年以内といわれるが、20 年で約 40% の患者が腎不全に至る。

質問 28) ネフローゼを呈する他の疾患でも IGFBP-1 は上昇するのか、それとも IgA 腎症に特異的か？

(回答) 尿蛋白量との関連も示唆されることから、ネフローゼを呈する疾患でも上昇する可能性はある。

質問 29) 分子量 30kDa というのは糸球体を通過できるレベルなのか？

(回答) 電荷やアルブミンとの親和性も関連するが、分子量 10kDa~70kDa の蛋白は、サイズに応じた透過性を有する。

質問 30) IGFBP-1 の上昇は primary effect か？ feedback effect か？

(回答) IGFBP-1 が糸球体硬化をきたすという報告もあり、primary effect と考える。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。