

氏名(本籍)	なり まつ よし き 成 松 由 規 (徳島県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 4782 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Immunocytochemical analysis for intracellular dynamics of C1Ga1T associated with molecular chaperone, Cosmc (Cosmc に連携した C1Ga1T の細胞内ダイナミクスの検討)		
主 査	筑波大学教授	博士 (医学)	山 縣 邦 弘
副 査	筑波大学教授	医学博士	長 田 道 夫
副 査	筑波大学准教授	博士 (医学)	工 藤 崇
副 査	筑波大学講師	博士 (医学)	相 田 久 美

論 文 の 内 容 の 要 旨

【目的】

IgA 腎症は腎糸球体メサンギウム領域への IgA の沈着を特徴とする疾患で、最も高頻度な一次性糸球体腎炎であり、日本においては患者の約 40%が 20 年以内に腎不全に移行する。IgA を含む免疫複合体が糸球体沈着物や患者の血清中に認められているものの、この病気における IgA 沈着のメカニズムははまだ解明されていない。近年 IgA 腎症患者において血清 IgA ヒンジ部 O-結合型糖鎖構造は複数の施設から異なる方法で検討され、シアル酸や Gal の数が減少した、いわゆる糖鎖不全の状態であることが示唆されている。そこで本症の発症起因として糖鎖不全構造に着目して、2つの研究目的 1) 発症の成因と考えられる糖鎖不全 IgA 分子の糖鎖構造解析、2) 糖鎖不全 IgA を産生する細胞を検出するためのプローブ作製に対して実験を行った。

【対象と方法】

IgA 分子の糖鎖構造解析についてはレクチン (糖結合タンパク質) をスライドガラス上にアレイ化したシステム「レクチンアレイ」を用いて相互比較を行なった。測定サンプルには各種合成糖ペプチドおよび血清から精製した IgA 分子を用いた。合成糖ペプチドは蛍光標識をおこなったヒンジ部分ペプチド (VPSTPPTPSPSTPPTPSPSK) を基質として、数種類の糖転移酵素を用いて作製した。IgA 分子は IgA 腎症患者 10 検体および健常者 10 検体の血清について抗 IgA1 抗体カラムで精製した。また単クローン性免疫グロブリン血症患者で IgA 腎症を併発しているサンプル (MGUS-IgAN) についても測定を行なった。

プローブ作製では core 1 構造の合成に関与する 2つのタンパク質 C1Ga1T および Cosmc に対するモノクローナル抗体を作製した。ゴルジマーカー GMI130 および ER マーカー calnexin 抗体を用いた多重染色によって、core 1 合成活性のあるヒト大腸がん細胞株 LSB における C1Ga1T および Cosmc の細胞内局在を検討した。さらに、LSB 細胞由来 Cosmc 変異欠失株である LSC 細胞に於ける発現パターンとの比較を行う事によって、シャペロン分子 Cosmc によって調節される core 1 合成活性と連携する C1Ga1T 分子の細胞内ダイナミクスを明らかにした。

【結果】

合成糖ペプチドの実験から Tn 構造特異的に反応するレクチンとして WFA, VVA, SBA, HPA, core 1 構造特異的なレクチンとして PNA, ACA, ST 構造特異的に MAH が挙げられた。次に、この合成糖ペプチドの実験をもとに IgA 分子についてレクチンアレイプロファイリングを行ったが、健常者および IgA 腎症患者間で有意に差の見られるレクチンを見出せなかった。一方で MGUS-IgAN では Tn 認識レクチン (WFA, VVA) と強く、逆に core 1 認識レクチン (ACA, HPA) と弱い相互作用が見られた。

免疫染色の結果から LSB 細胞内では C1GalT は Golgi に Cosmc は ER 局在と考えられた。一方、Cosmc 変異欠失株である LSC 細胞では C1GalT のタンパク質そのものが検出されなかった。Cosmc を導入した LSC 細胞株では C1GalT がゴルジ領域に再度分布したことから LSC 細胞における C1GalT の消失は Cosmc の欠失が原因であると考察された。また proteasome 阻害剤の実験から、C1GalT は転写翻訳されるもののタンパクはプロテアソームですみやかに分解されゴルジへ分布できないこと、そしてこの状態では core 1 合成活性が発揮されない事が明らかとなった。

【考察】

今回レクチンアレイの実験では健常者と患者の IgA について糖鎖構造の違いを見出すことができなかった。このことから、糖鎖不全 IgA は血清中に存在する正常な IgA に対して数%と予想された。一方で、糖鎖不全 IgA を多く産生していると考えられる MGUS-IgAN の IgA では Tn 構造が多く存在することが示唆された。以上より、IgA 腎症患者では Tn 構造のような糖鎖不全構造が起因していることが示唆された。また同時にこれら糖鎖不全 IgA を産生している細胞が存在することが予想される。今回作製した抗体を用いることによって LSC 細胞や Jurkat 細胞などの Cosmc に変異 (異常) が生じている細胞では C1GalT の発現していないことがわかった。IgA 腎症では糖鎖不全が原因であり、患者 B 細胞で core 1 合成活性が低下していることが報告されている。これらの患者では、LSC 細胞で見られた現象と同様に、C1GalT もしくは Cosmc のタンパク質自体の発現が低下することが原因と考えられる。今後 IgA 腎症患者の組織や B cell について、今回作製した C1GalT の抗体を用いて染めることができれば、C1GalT 発現の異常を簡便に検出できる可能性が期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

慢性腎炎症候群の中で最も多い病型である IgA 腎症の発症要因についての検討を行った研究である。現在、世界中の先進国で末期腎不全による透析患者の増加が問題となっており、その中でも IgA 腎症はきわめて重要な地位をしめることから、IgA 腎症の発症機構の解明は社会的にも強く望まれているものである。

IgA 腎症患者糸球体への沈着 IgA の糖鎖異常の報告が他の研究者から既になされており、今回の研究から、この糖鎖異常 IgA の鋭敏な検出法開発が期待される。今後は糸球体沈着物中の IgA での同様の検討、ならびに糸球体沈着 IgA の産生部位とされる扁桃において、異常 IgA 産生細胞の同定などの臨床検体を使用した研究への発展が望まれる。あわせて、糖鎖異常 IgA の自己凝集や糸球体メサンギウムへの沈着は知られるものの、この糖鎖異常 IgA 凝集物が糸球体内において、細胞増殖、炎症招来機構の解明、さらに糖鎖異常を来す基となる酵素異常発現機構の解明などの基礎的検討を加わることが期待される。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。