

論文内容の要旨

氏名	宮崎 紘平
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医第1078号
学位授与の日付	平成24年3月22日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	GSTT1 Gene Abnormality in Minimal Change Nephrotic Syndrome with Elevated Serum Immunoglobulin E (高IgE血症をともなう微小変化型ネフローゼ患児におけるGSTT1遺伝子異常)
論文審査委員 (主査)	教授 竹村 司
(副主査)	教授 高橋 英夫
(副主査)	教授 東田 有智

【背景】

近年、ネフローゼ症候群 (NS) の発症には、oxidant と antioxidant のバランスの異常が関与することが報告されている。Free radical である reactive oxygen species (ROS) の増加は、各種細胞に対して障害的に作用する。ROS の産生と除去の不均衡は、oxidative stress の原因となり、腎を含めた種々の臓器における炎症を引き起こす。一方 ROS の分解には、enzyme system ならびに non-enzymatic scavenger が関与する。Glutathione S-transferase (GST) supergene family に属する遺伝子は ROS を分解し、その障害から細胞や臓器を防御する役割を持つ。これらの null genotype では、種々な刺激による allergic response が増強しており、wild type と比較して血清 IgE の著明な増加をきたすことが知られている。我々はこの研究で、ROS の分解とアレルギー反応と血清 IgE の制御の両方に関連する GST supergene family の GSTT1 遺伝子 (GSTT1) の変異について、血清 IgE の増加と種々なアレルギー疾患を合併する微小変化型 NS (MCNS) 患児で検討した。

【対象と方法】

近畿大学小児科で、MCNS にて加療もしくは経過観察中の患者 63 名の中で、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性皮膚炎などのアレルギー症状を少なくとも 1 つ以上有する小児は、全部で 29 名であった。その中で、免疫抑制薬の不投薬の状態でも完全寛解が維持されている 16 名であり、その中の 1 例では、高 IgE 症候群の責任遺伝子である STAT3 に異常を認めるものであり、副論文として報告した。この 1 例を除いた 15 例を今回の研究の対象とした。方法は、Comparative genomic hybridization 法を用い、upregulation または downregulation を示す遺伝子をスクリーニングした。GSTT1 の欠失は、最終的には polymerase-chain reaction (PCR) 法で確定した。また、ROS の測定は、既報のごとく、末梢血多核球を用いた黄色ブドウ球菌菌体抗原刺激による H2O2 産生能で評価した。同時に ROS の分解産物 (d-ROMs) の測定を、市販の d-ROMs test で実施し、FRAS4 analyzer を用いて解析し、d-ROMs/ROS 比として表現した。

【結果】

15 名中、血清 IgE 値が、2000 IU/L 以上の症例が 2 例、500 ~ 1000 IU/L が 6 例、295 IU/L 以下が 7 例存在した。GSTT1 の downregulation は、15 例中 2 名の患児で認められ、いずれも血清 IgE 値が 2000 IU/L を超え、かつ高度な複数のアレルギー症状を有するものであった。これらに PCR を実施し、GSTT1 の欠損が確認された。d-ROM/ROS 比は、この 2 症例で、それぞれ 2.07 と 2.48 であり、正常コントロール (median value:3.47) および GSTT1 に異常のない MCNS 13 例 (median value:3.54) と比較して低値であり、ROS 産生と分解のアンバランスが認められた。IgE 産生刺激性に働く interleukin-4 は高値を示し、産生抑制的に働く interferon (INF)- γ は、2 症例ともに正常範囲であった。この GSTT1 に異常を有する 2 例の臨床学的特徴は、再発回数がいずれも 10 回を超える頻回再発性 MCNS であり、ステロイド療法に対し、反応性と抵抗性を繰り返し、種々な他の免疫抑制薬の投与を必要とする難治性 NS であった。一方、GSTT1 に異常のない 13 例では、その大部分がステロイド薬感受性であり、平均再発回数も、2.74 (median value) であった。この 2 例においては、高 IgE 症候群の責任遺伝子である STAT3 および Tyk2 の異常はなかった。

【考察】

これまでの研究により、MCNS 患者の白血球では、oxidative stress の状態が亢進していることが明らかとなっている。MCNS 発症にかかわる ROS の作用については、まだ不明な点が多いが、特発性 MCNS を有する小児やネフローゼモデル動物において、ROS の産生が亢進しており、直接的に細胞膜に傷害を与えることが証明されている。すなわち MCNS 患者では、増加した ROS の作用により、糸球体基底膜の透過性が亢進し、蛋白尿が漏出する機序が推察される。また、この状態は、antioxidant の投与により改善されることから、NS 患者における蛋白尿の出現に、ROS が強い影響を与えることが推察される。ROS に対する耐性は各個人で様々であり、その理由の一つとして、GSTT1 異常がその一端を担っている可能性がある。

【結論】

今回の我々の検討により、著明な高 IgE 血症を呈し、種々な高度なアレルギー疾患を合併する MCNS 患児の一部には、GSTT1 の異常を有し、その結果 ROS の分解抑制、IL-4 の増加による Th1/Th2 imbalance を引き起こし、NS を発症する症例が存在する機序があることが示唆された。このような症例では、生涯にわたる NS の持続が懸念されるため、GSTT1 に異常のない NS 患者とは異なった免疫抑制療法を実施する必要がある。すなわち、risk-benefit balance を考慮した生涯にわたる継続した治療を考慮すべきである。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2012年 月 日 公表予定	出版物名 Clinical Nephrology
	公 表 内 容	
	全 文 と 要 約	2012年 月 日 発行予定

【研究の背景】

近年、ネフローゼ症候群 (NS) の発症には、oxidant と antioxidant のバランスの異常が関与することが報告されている。Free radical である reactive oxygen species (ROS) の増加は、各種細胞に対して障害的に作用する。ROS の産生と除去の不均衡は、oxidative stress の原因となり、腎を含めた種々の臓器における炎症を引き起こす。一方 ROS の分解には、enzyme system ならびに non-enzymatic scavenger が関与する。Glutathione S-transferase (GST) supergene family に属する遺伝子は ROS を分解し、その障害から細胞や臓器を防御する役割を持つ。これらの null genotype では、種々な刺激による allergic response が増強しており、wild type と比較して血清 IgE の著明な増加をきたすことが知られている。

我々はこの研究で、ROS の分解とアレルギー反応と血清 IgE の制御の両方に関連する GST supergene family の GSTT1 遺伝子 (GSTT1) の変異について、血清 IgE の増加と種々なアレルギー疾患を合併する微小変化型 NS (MCNS) 患児で検討した。

【対象と方法】

近畿大学小児科で、MCNS にて加療もしくは経過観察中の患者 63 名の中で、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性皮膚炎などのアレルギー症状を少なくとも 1 つ以上有する小児は、全部で 29 名であった。その中で、免疫抑制薬の不投薬の状態で完全寛解が維持されている 16 名であり、その中の 1 例では、高 IgE 症候群の責任遺伝子である STAT3 に異常を認めるものであり、副論文として報告した。この 1 例を除いた 15 例を今回の研究の対象とした。

方法は、Comparative genomic hybridization 法を用い、upregulation または downregulation を示す遺伝子をスクリーニングした。GSTT1 の欠失は、最終的には polymerase-chain reaction (PCR) 法で確定した。また、ROS の測定は、既報のごとく、末梢血多核球を用いた黄色ブドウ球菌菌体抗原刺激による H₂O₂ 産生能で評価した。同時に ROS の分解産物 (d-ROMs) の測定を、市販の d-ROMs test で実施し、FRAS4 analyzer を用いて解析し、dROMs/ROS 比として表現した。

【結果】

15名中、血清IgE値が、2000 IU/L以上の症例が2例、500～1000 IU/Lが6例、295 IU/L以下が7例存在した。CGH法により、*GSTT1*の null-functioning genotypeは、15例中2名の患児で認められ、いずれも血清IgE値が2000 IU/Lを超え、かつ、高度な喘息やアレルギー性皮膚炎などの複数のアレルギー症状を有するものであった。これらにPCRを実施し、*GSTT1*の欠損が確認された。dROM/ROS比は、この2症例で、それぞれ2.07と2.48であり、正常コントロール (median value: 3.47) および *GSTT1* に異常のない MCNS 13例 (median value: 3.54) と比較して低値であり、ROS産生と分解のアンバランスが認められた。IgE産生刺激性に働く interleukin-4 は高値を示し、産生抑制的に働く interferon (INF)- γ は、2症例ともに正常範囲であった。

この *GSTT1* に異常を有する2例の臨床学的特徴は、再発回数がいずれも10回を超える頻回再発性 MCNS であり、ステロイド療法に対し、反応性と抵抗性を繰り返し、種々な他の免疫抑制薬の投与を必要とする難治性 NS であった。一方、*GSTT1* に異常のない13例では、その大部分がステロイド薬感受性であり、平均再発回数も、2.74 (median value) であった。この2例においては、高IgE症候群の責任遺伝子である *STAT3* および *Tyk2* の異常はなかった。

【考察】

これまでの研究により、MCNS患者の白血球では、oxidative stressの状態が亢進していることが明らかとなっている。MCNS発症にかかわるROSの作用については、まだ不明な点が多いが、特発性MCNSを有する小児やネフローゼモデル動物において、ROSの産生が亢進しており、直接的に細胞膜に傷害を与えることが証明されている。すなわちMCNS患者では、増加したROSの作用により、糸球体基底膜の透過性が亢進し、蛋白尿が漏出する機序が推察される。また、この状態は、antioxidantの投与により改善されることから、NS患者における蛋白尿の出現に、ROSが強い影響を与えることが推察される。ROSに対する耐性は各個人で様々であり、その理由の一つとして、*GSTT1*異常がその一端を担っている可能性がある。

【結論】

今回の我々の検討により、著明な高IgE血症を呈し、種々な高度なアレルギー疾患を合併するMCNS患児の一部には、*GSTT1*の異常を有し、その結果ROSの分解抑制、IL-4の増加によるTh1/Th2 imbalanceを引き起こし、NSを発症する症例が存在する機序があることが示唆された。このような症例では、生涯にわたりNSの持続が懸念されるため、*GSTT1*に異常のないNS患者とは異なった免疫抑制療法を実施する必要がある。すなわち、risk-benefit balanceを考慮した生涯にわたる継続した治療を考慮すべきである。

以上の研究結果は、MCNSの活性酸素に関連する新たな発症機序とその遺伝子的素因を明らかにしたものであり、今後の本症患児の診断や治療法に大きく貢献するものと思われる。また最終試験にも合格しており、博士論文としての価値を十分有すると思われる。