

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19621

研究課題名(和文) Henoch-Shonlein紫斑病における血管内皮細胞と自然免疫系の関わり

研究課題名(英文) Relationship between vascular endothelial cells and innate immune system in Henoch-Shonlein purpura

研究代表者

西山 慶(Nishiyama, Kei)

九州大学・大学病院・医師不足分野教育指導者

研究者番号：60645422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：Henoch-Shonlein紫斑病患者では正常対象と比較しA20発現が増加していた。紫斑病性腎炎の有無でA20の発現を比較したが差は認めなかった。一方で、腹痛のある症例、多数の症状を持つ症例ではA20発現が増加しており、血管炎の重症度とA20発現が逆相関していることがわかった。ヒト腎系球体血管内皮細胞に自然免疫リガンドを作用させたが、特異的なサイトカインの増加は認めなかった。

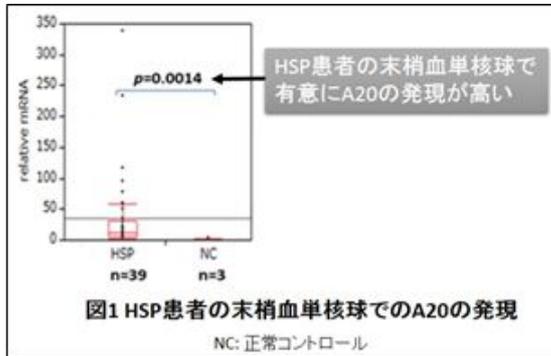
研究成果の概要(英文)：In patients of Henoch-Shonlein purpura, A20 expression was increased compared with normal controls. Expression of A20 was compared in the presence or absence of purpura nephritis but no difference was observed. On the other hand, in cases with abdominal pain and cases with multiple symptoms, A20 expression increased, indicating that the severity of vasculitis and A20 expression are inversely correlated. Human renal glomerular vascular endothelial cells were treated with several innate immunity ligands, but no specific cytokine increase was observed.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：Henoch-Shonlein紫斑病 自然免疫 A20

1. 研究開始当初の背景

(1) Henoch-Shönlein 紫斑病(以下 HSP)は紫斑、腹痛、関節痛を主とした症状とする、血管性紫斑病の1つである。原因については未だ不明であるが、A 群溶連菌、ブドウ球菌、ウイルス、マイコプラズマなどの先行感染の関与が知られている。多くは自然軽快し予後良好とされるが、約 30%が腎炎(紫斑病性腎炎、以下 HSPN)を合併し、その約 1%は腎不全に至る。当教室では HSP での自然免疫制御因子の1つである A20 (TNFAIP3) の関与について検討してきた。まず、マイクロアレイによる網羅的解析結果をもとに、定量 PCR でリンパ球細胞表面の A20 発現を測定し、HSP における A20 の役割を解析した。その結果、HSP 患者全体と正常コントロール群では、A20 の mRNA 発現に違いが認められた(図 1)。一方、腎炎発症に関わる既知の危険因子との関係を検討したところ、男児例と腹痛を有した HSP 症例では有意に A20 の発現が低く、その違いが腎炎発症にも影響している可能性が示唆された。



この A20 (TNFAIP3) は、ヒト臍帯血内皮細胞においてサイトカインを誘導する遺伝子として 1990 年に初めて報告され (J Biol Chem. 1990)、自然免疫と獲得免疫の重要な制御因子として考えられている。

(2)当教室において、ヒト冠動脈内皮細胞に対して自然免疫レセプターである Toll-like receptor (TLR) や Nod-like receptor (NLR) のリガンドを用い刺激することで、IL-8 などのサイトカイン産生が増加することを報告し(図 2)、さらにマウスにおいて Nod1 リガンドを皮下あるいは口腔内投与することにより、川崎病類似の冠動脈炎が発症することを報告した。このことから自然免疫系リガンドが直接作用することで臓器特異的血管炎が発症することが示され、HSP においても同様の自然免疫系の関与が予想される。

(3)HSP の発症に様々な先行感染の関与が報告されていること、血管炎が主たる病態であり臓器特異的な血管炎を起こすこと、さらに、自然軽快する疾患であることなど、川崎病と共通点が多数あり、川崎病同様に HSP も自然免疫疾患である可能性が高い。さらに、糖尿病性腎症と ANCA 関連腎炎では糸球体血管内皮細胞に TLR の発現が亢進しているこ

とが報告されており、腎疾患の発症に血管内皮細胞を介した自然免疫系が関与していることが示されている。また、紫斑病性腎炎において、糸球体の病変形成には IgA-CIC によって誘導されたメサンギウム細胞由来のサイトカイン、ケモカインが重要であり、管内増殖病変はそれに付随した変化ととらえられている。しかし紫斑病性腎炎は IgA 腎症より管内増殖病変や半月体といった血管炎を示唆する所見が強く出現することから血管内皮細胞の関与はより重要と考えられる。

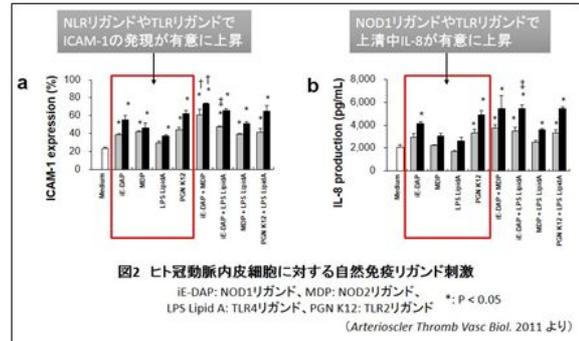


図2 ヒト冠動脈内皮細胞に対する自然免疫リガンド刺激
IE-DAP: NOD1リガンド、MDP: NOD2リガンド、LPS Lipid A: TLR4リガンド、PGN K12: TLR2リガンド *; P < 0.05

(Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 より)

2. 研究の目的

細菌構成物質である自然免疫系リガンドによりヒト腎系球体微小血管内皮細胞を刺激し、その反応を解析し、さらに A20 との関連性を調べることで HSP の病態形成における自然免疫系の関わりについて検討する。これにより、HSP の発症機序や病因だけでなく、約 30%に合併する紫斑病性腎炎の病態形成についても考察できると考える。

3. 研究の方法

当施設および関連施設で加療を行った HSP 症例を集積し、インフォームドコンセントの得られた HSP 症例の末梢血を採取する。HSP 群および正常コントロール群において、末梢血単核球を分離し、その A20 の発現を定量 PCR で測定する。HSP 症例をさらに、腎炎発症群と腎炎非発症群に分け、A20 の発現について検討を行う。さらに、発症危険因子(紫斑、関節痛、腹痛)との A20 の相関についても検討を行う。

ヒト腎系球体微小血管内皮細胞 (HGMEC) を 3200/well で培養し、ヒト冠動脈内皮細胞実験と同様に、自然免疫リガンド、つまり NOD1 リガンド (FK565)、NOD2 リガンド (MDP)、TLR4 リガンド (LPS Lipid A)、TLR2 リガンド (ペプチドグリカン K12) を 1 および 10 μg/mL の濃度で投与する。24 時間培養した上で、上清のサイトカイン濃度をサイトカインビーズアレイにて測定する。

4. 研究成果

HSP 患者 (発症時) の PBMC の mRNA を用いて A20 の定量 PCR を行い、正常コントロールとの比較および臨床症状との関連を検討した。対象は HSP 急性期患者 67 名、平均年齢は 6.0 ± 2.8 歳と正常コントロール 24 名、平均年齢は 4.9 ± 3.1 歳であった。

HSP 急性期と NC の A20 発現を比較した。予備実験同様に HSP 急性期では有意に A20 発現が

増加していた(図3)。関節痛の有無および腎炎の有無で A20 発現に違いがあるかを評価した(図4)が、いずれも有意差をみとめなかった。

図3: HSPとNCのA20発現

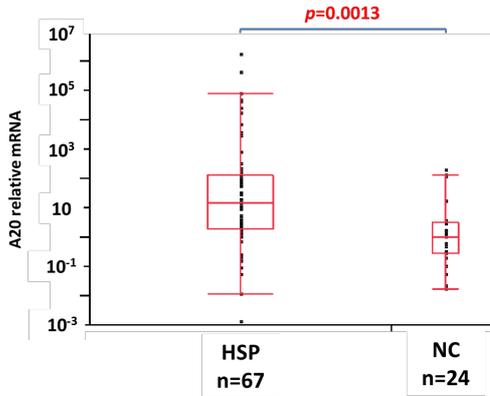
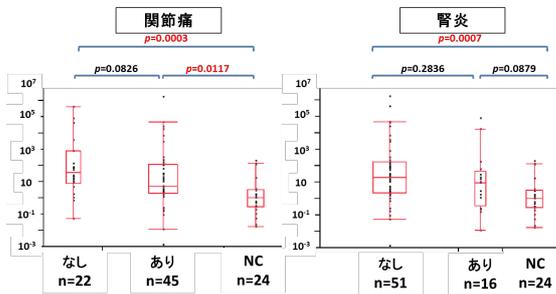


図4: 関節炎および腎炎とA20発現の関連



次に、腹痛の有無で比較したところ、腹痛ありの群は有意に A20 の発現が低値であった(図5)。さらに三主徴(紫斑、腹痛、関節痛)に腎炎を加えた4症状のうちいくつかの症状を有するかによって群をわけた(図6)。紫斑は67症例(100%)で認め、以下関節痛45例(67%)、腹痛42例(63%)、腎炎16例(24%)の順で認めた。これは既報と同様の頻度であった。4症状のうち1つのみの症例は5例、2つの症例は30例、3つの症例は23例、4つすべてを持つ症例は9例であった。各群での A20 の発現を比較した(図7)。症状を多く持つ群では A20 の発現が低値であった。

図5: HSP症例の各症状の内訳

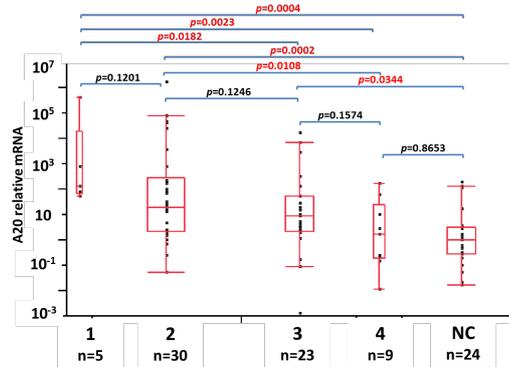
症状	n	症状数	内訳	n
紫斑	67 (100%)	1	紫斑	5
関節痛	45 (67%)		紫斑+関節痛	14
腹痛	42 (63%)	2	紫斑+腹痛	15
腎炎	16 (24%)		紫斑+腎炎	1
Proportion of patients				
Purpura	100%	3	紫斑+関節痛+腹痛	17
Arthritis	75%		紫斑+関節痛+腎炎	3
Abdominal pain	65%		紫斑+腹痛+腎炎	3
Nephritis	40%	4	紫斑+関節痛+腹痛+腎炎	9

Saulsbury FT. Lancet. 2007.

これらの結果から、HSP では NC に比べ A20 の発現が高く、腹痛および多数の症状を呈する重症例ではその発現が低いことがわかった。

A20 は TNF- α や TLR などにより誘導され、NF- κ B のシグナルを抑制して過剰な活性化を起こさないよう調節している。A20 ノックアウトマウスでは全身の臓器で炎症が収まらず生後 6 週で死に至ると報告されている。HSP においても A20 が過剰な炎症を抑制している可能性が示唆された。

図5: 症状の数とA20発現の比較



次いで、ヒト腎系球体微小血管内皮細胞(HRVEC)を 3200/well で培養し、ヒト冠動脈内皮細胞実験と同様に(Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011)、各種自然免疫リガンド 0.3~10 μ g/mL の濃度で投与した。今回は Pam3CSK4(TLR1/2 ligand)、LTA-SA(TLR2 ligand)、PolyI:C(TLR3 ligand)、LipidA(TLR4 ligand)、LPS(TLR4 ligand)、FLA-ST(TLR5 ligand)、Imiquimod(TLR7 ligand)、ssRNA/LyoVec(TLR8 ligand)、ODN2216(TLR9 ligand)、C12-iE-DAP(NOD1 ligand)、MDP(NOD2 ligand)のリガンドを使用した。24 時間培養した上で、上清のサイトカイン濃度をサイトカインビーズアレイで測定した(図6,7)。

図6: HRVECのIL-6産生

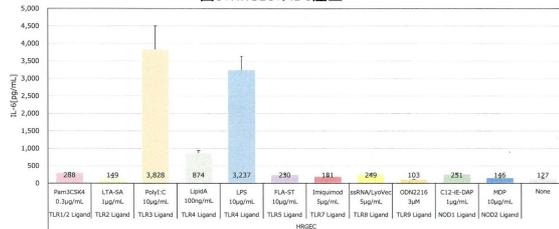
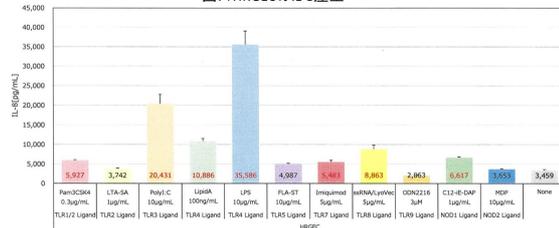


図7: HRVECのIL-8産生



PolyI:C と LPS のみで IL-6、IL-8 が検出された。しかし TNF を含む他の炎症性サイトカインは検出されなかった。我々は TNF を介

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

した臓器特異的炎症から A20 の発現亢進につながる系を予測していたが、今回の結果からは仮説を証明することはできなかった。今回有意なサイトカイン上昇を得られた PolyI:C と LPS については、HRGCE の実験を追加し、A20 発現の直接亢進がみられるかどうかを検証する。また、他種の細胞(ヒトメサンギウム細胞、腎系球体内皮細胞)に作用させ、炎症性サイトカインの測定および A20 の発現を mRNA レベルで確認することを考えている。また、A20 の発現が腎組織外由来という可能性から、HSP および NC から得られた末梢血単核球と糸球体内皮細胞の共培養系での自然免疫リガンド作用により特定の炎症性サイトカイン発現がみられるかの確認も予定している。

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号:

(4) 研究協力者
なし ()

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 慶 (HISHIYAMA, Kei)
九州大学医学研究院
周産期・小児医療学助教
研究者番号: 60645422

(2) 研究分担者