

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09713

研究課題名(和文) IgA腎症における、口蓋扁桃胚中心B細胞によるAPRILを介した免疫異常の解明

研究課題名(英文) Elucidation of APRIL-mediated immune abnormalities by tonsillar germinal center B cells in the pathogenesis of IgA nephropathy

研究代表者

鈴木 祐介 (Suzuki, Yusuke)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70372935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究で、IgA腎症患者の腎には糖鎖修飾異常のあるIgA抗体が沈着していることが明らかにされてきた。近年IgA腎症の病因に、形質細胞の分化・延命に関わるサイトカインであるa proliferation inducing ligandの関与することが示唆され始めているが、その詳細は不明であった。B細胞は、CD40LとBAFFを安定発現する線維芽細胞株上で培養すると効率的に増殖することが知られている。本研究にて我々は、この細胞株を用いて、ナイーブB細胞からIgA陽性B細胞を誘導する新規培養系を確立した。これにより、APRILが糖鎖異常IgA抗体を産生する機序を解析することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgA腎症の治療において、a proliferation inducing ligand(APRIL)をターゲットとした分子標的治療薬の国際治験が開始され、近年注目されているが、その理論的根拠の詳細は明らかにされていなかった。本研究結果は、口蓋扁桃摘出術、更にはAPRILをターゲットとした分子標的治療薬の理論的根拠や治療適応基準の基礎データ提供につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have revealed that IgA antibodies with abnormal glycosylation deposited in the glomerular mesangium in kidney of patients with IgA nephropathy. In recent years, the involvement of a proliferation inducing ligand (APRIL), which is a cytokine involved in the differentiation and survival of plasma cells, has been suggested to be involved in the pathogenesis of IgA nephropathy, however the details have not been clarified. In the present study, we established a culture system that efficiently induces IgA-positive B cells from naive B cells. Using this new culture system, it has become possible to analyze the detailed mechanism by which APRIL produces abnormal glycosylated IgA antibodies.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：IgA腎症 APRIL 糖鎖異常IgA 口蓋扁桃 B細胞 免疫異常

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は世界で最も多い原発性糸球体腎炎であり、20 年で約 40%が末期腎不全に至る予後不良の疾患であるが、その病因は未だ不明であり、確立された分子レベルの治療は存在しない。多くの IgA 腎症患者は扁桃炎を始めとする上気道炎後に血尿や蛋白尿が増悪することから、IgA 腎症の病因に粘膜免疫異常の関与が議論されてきた。事実、扁桃摘出術が IgA 腎症の長期予後を改善させる報告が相次いでおり、近年本邦では IgA 腎症の根治治療として多施設で口蓋扁桃摘出術ステロイドパルス療法(扁桃摘パルス)が行われ、一定の治療成績が示されている。しかし、その理論的根拠は明らかにされていない。

我々を含む多くのグループが、IgA 腎症患者の血中および糸球体沈着 IgA には、IgA1 ヒンジ部の O-結合型糖鎖の Gal が欠損した糖鎖異常 IgA1 が増加していることを報告している(J Clin Invest. 2008, Kidney Int. 2007)。また、我々は、患者血中で糖鎖異常 IgA1、および糖鎖異常 IgA1-IgG 免疫複合体が増加しており、この免疫複合体形成が、腎糸球体への親和性ならびに炎症細胞の活性化増強につながり、IgA 腎症の最終的障害進展に必要であることも報告した(J Clin Invest. 2009)。

IgA 腎症患者の扁桃で糖鎖異常 IgA が産生されていることが報告されているが(Am J Kid Dis, 2003)、我々は粘膜・自然免疫で中心的役割を担う Toll-like receptor (TLR)、特に TLR9 のある一塩基多型(SNP)が、ヒト IgA 腎症の病理学的予後に有意に相関すること(J Am Soc Nephrol 2008, Nephrol Dial Transpl 2010)、さらに扁桃における TLR9 活性化を介した免疫異常が、糖鎖異常 IgA 産生に関わっている可能性を報告してきた(Nephrol Dial Transpl. 2011)。

我々はヒト IgA 腎症に病態および遺伝制御の点で極めて類似した自然発症モデルマウスの系を確立し(J Am Soc Nephrol. 2005)、IgA 腎症の病態解明を行ってきた。この IgA 腎症発症モデルマウスの骨髄を正常マウスに移植することで、IgA 腎症が再構築できることを確認した(Kidney Int, 2007)。また、TLR9 のリガンドである CpG DNA でこのマウスの気道粘膜を刺激することで、腎症が急性増悪することを確認しており(J Am Soc Nephrol. 2008)、IgA 腎症の病因における TLR9 を介した innate immunity の異常が示唆されている。

一方で、近年 IgA 腎症の病因に、形質細胞の分化・延命に関わるサイトカインである a proliferation inducing ligand (APRIL)の関与が示唆され始めているが、APRIL 産生臓器や、APRIL の細胞分子レベルの免疫異常の詳細は明らかにされてこなかった。いわゆる Mucosa-Bone Marrow Axis の異常 (図 1 参照)が IgA 腎症の本態であり(Contrib Nephrol. 2007)、扁桃での責任 B 細胞の粘膜感作、および扁桃から全身へ播種した腎炎惹起性 IgA 陽性 B 細胞が分子標的治療のターゲットになると考えられているが、TLR9 や APRIL がこの B 細胞、もしくは糖鎖異常 IgA 抗体の産生どのような関わりをもつか、その全容解明には至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、IgA 腎症における APRIL を介した免疫異常の詳細を解明し、APRIL をターゲットとし

た分子標的治療薬の理論的根拠を構築することを目的とする。

3．研究の方法

IgA 腎症患者の腎系球体には Gd-IgA1 が沈着していることが証明されている。この一部は、IgA 腎症患者の扁桃で誘導されることが示唆されているが、その詳細についての基礎研究は十分とはいえない。そこで、まず Gd-IgA1 に対するモノクローナル抗体である KM55 抗体を用いた免疫染色により、Gd-IgA1 が、IgA 腎症患者扁桃で確かに産生されていることを確認する。次に、Gd-IgA1 の産生における APRIL の関与を明らかにするために、患者扁桃 B 細胞を用いた *in vitro* の実験を行う。ナイーブ B 細胞を IgA 陽性 B 細胞に効率的に分化させる培養系は未だ報告されていないことから、扁桃ナイーブ B 細胞を IgA 陽性 B 細胞に分化させる培養条件を検討する。その後 IgA 陽性 B 細胞を APRIL で刺激することで、産生される IgA の糖鎖修飾に及ぼす影響を明らかにし、そのメカニズムにも解析していく。さらに、IgA 腎症患者の口蓋扁桃胚中心の B 細胞が、糖鎖異常 IgA や糖鎖異常 IgA に対する内因性抗体産生に関わっているか *in vitro* の実験で検証する。

4．研究成果

KM55 抗体を用いた免疫染色により、Gd-IgA1 が、IgA 腎症患者扁桃で産生されていることを確認した。IgA 腎症患者では、慢性扁桃炎患者と比較して、扁桃胚中心に Gd-IgA1 が偏って存在する傾向にあった(図 2)。今後、扁桃胚中心における APRIL 陽性の B 細胞が Gd-IgA1 を産生している可能性について検証し、その産生機序についても明らかにしていきたい。

B 細胞は、CD40L と BAFF を安定発現する線維芽細胞株(40LB)上で培養すると効率的に増殖する。本研究にて我々は、この 40LB を用いて、マウスナイーブ B 細胞から IgA 陽性 B 細胞を誘導する新規培養系を確立した。この培養系で、我々が確立した IgA 腎症自然発症モデルより単離したナイーブ B 細胞を、IgA 陽性 B 細胞にクラススイッチさせることが可能となった。さらには、この培養上清中に IgA 抗体が産生されていることを ELISA 法によって確認した。今後この培養系を用いて、APRIL が糖鎖異常 IgA 抗体を産生する詳細なメカニズムについて解析を行っていく予定である。

図1. IgA腎症における“Mucosa-Bone Marrow Axis”の異常

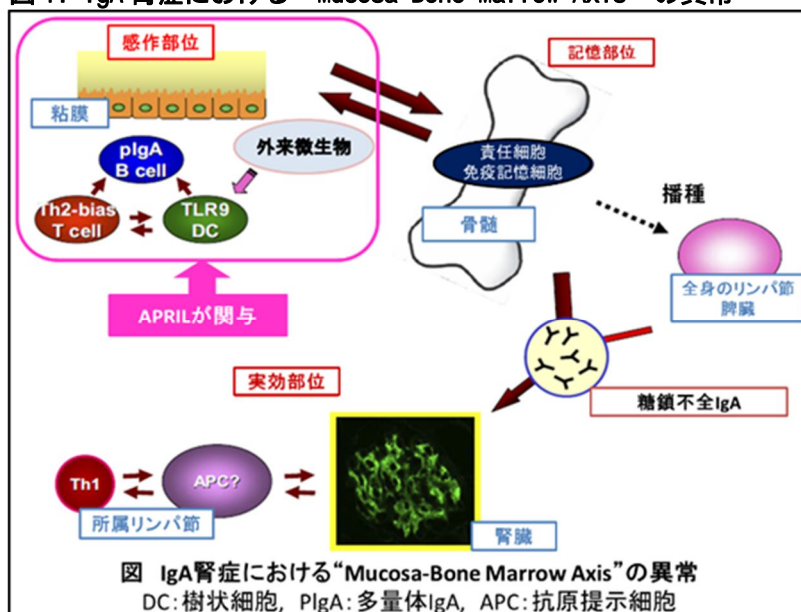
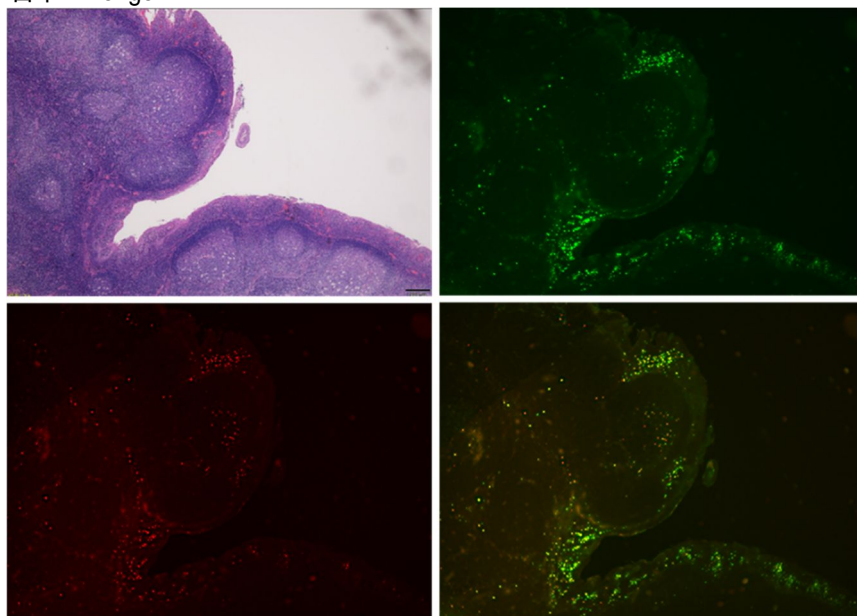


図2. IgA腎症患者扁桃の蛍光免疫染色

- 左上: Hematoxylin-Eosin 染色
- 右上: 抗 IgA 抗体を用いた蛍光染色
- 左下: 抗 Gd-IgA1 抗体を用いた蛍光染色
- 右下: Merge



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Muto Masahiro, Manfroi Benoit, Suzuki Hitoshi, Joh Kensuke, Nagai Masaaki, Wakai Sachiko, Righini Christian, Maiguma Masayuki, Izui Shozo, Tomino Yasuhiko, Huard Bertrand, Suzuki Yusuke	4. 巻 28
2. 論文標題 Toll-Like Receptor 9 Stimulation Induces Aberrant Expression of a Proliferation-Inducing Ligand by Tonsillar Germinal Center B Cells in IgA Nephropathy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 1227 ~ 1238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2016050496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Hitoshi, Yasutake Junichi, Makita Yuko, Tanbo Yuki, Yamasaki Kohei, Sofue Tadashi, Kano Toshiki, Suzuki Yusuke	4. 巻 93
2. 論文標題 IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis have a shared feature involving galactose-deficient IgA1-oriented pathogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 700 ~ 705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2017.10.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nihei Y, Haniuda K, Higashiyama M, Suzuki Y, Kitamura D.
2. 発表標題 Characteristics of naive B cells in murine IgA Nephropathy
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nihei Y, Haniuda K, Suzuki H, Kano T, Fukao Y, Kitamura D, Suzuki Y
2. 発表標題 Characteristics of Germinal Center B Cells in Murine IgA Nephropathy
3. 学会等名 The 15th International Symposium on IgA Nephropathy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nihei Y
2. 発表標題 Aberrantly glycosylated IgA is produced by TLR9 activation through APRIL mediated pathway in IgA nephropathy.
3. 学会等名 ISN FRONTIERS meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	武藤 正浩 (Muto Masahiro) (30790076)	順天堂大学・医学部・助教 (32620)	
研究協力者	二瓶 義人 (Nihei Yoshihito)		