

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08234

研究課題名(和文) IgA腎症の発症に関与する共生細菌の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of commensal microbiota involved in the development of IgA nephropathy

研究代表者

後藤 眞 (Goto, Shin)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00463969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：IgA腎症の発症には共生細菌と粘膜免疫の相互作用が重要であると考えられている。IgA腎症の治療で扁桃摘出は有効であるが、本研究では扁桃深部陰窩での細菌叢に対する粘膜免疫反応を詳細に検討した。IgA腎症患者の扁桃ではコントロールとした習慣性扁桃炎患者に比較して、バクテロイデス門細菌群にIgAがより多く付着し、また扁桃IgAの種類としては、IgA腎症患者でIGHV3-30およびIGHV3-38が増加していた。IgA腎症患者の血中でもバクテロイデス門細菌群に結合するIgAが増加していた。IgA腎症の発症に扁桃細菌叢に対する粘膜免疫異常が関係していることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究からIgA腎症患者の粘膜免疫異常について、特に扁桃組織において細菌叢に対するIgAの反応性が明らかとなった。IgA腎症は指定難病であり、治療として扁桃摘出術およびステロイド治療が広く行われている。扁桃摘出の理論的根拠として局所の粘膜免疫異常を示したことは実際の臨床診療に意義があると思われる。さらに治療ターゲットとなるメカニズムの解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：The interplay between mucosal immunity and microbiota in patients with IgA nephropathy (IgAN) is considered to underlie disease pathogenesis. We conducted this study to elucidate the mechanisms underlying the mucosal immune response to microbiota at the tonsillar crypts and its role in the development of IgAN.

Expression of immune cell activating factor in tonsillar crypts was elevated in patients with IgAN, correlating with the expression of the distinct IgA repertoire in IgA1 at the tonsillar crypts. Bacteria from the phylum Bacteroidetes were highly coated with IgA at the tonsillar crypts of IgAN patients, correlating with the tonsillar expression of the repertoire in IgA1. Serum polymeric IgA, comprising high levels of galactose-deficient IgA1, exhibited considerable binding to Bacteroidetes strains cultured from the tonsils of IgAN patients. This study strengthens the role of the mucosal immune response to microbiota in the pathogenesis of IgAN.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：IgA腎症 扁桃 IgA-SEQ IgAレパトア マイクロバイオーーム 糖鎖不全IgA1

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は腎糸球体に IgA 分子の沈着と補体活性化を伴うメサンギウム増殖性糸球体腎炎である。世界で最も頻度が高く、末期腎不全に至る主要な慢性腎疾患の原因でもある。原因は遺伝背景と環境因子による複合的な要因が想定されている (マルチヒット仮説)。IgA 腎症は上気道感染などに伴い尿所見が増悪することからその発症機序に細菌感染の関与が強く疑われ、腎糸球体に沈着している IgA 分子は粘膜免疫異常に由来することが想定されている。過去の研究では、IgA 腎症患者の腎糸球体に IgA の沈着と一致して細菌構成成分 (*H. parainfluenzae*, *S. aureus*) が認められること、患者血清中にこれらの細菌菌体成分に対する抗 IgA 抗体価が上昇していることが報告された。しかし、これらの報告は断片的であり、細菌群集を包括的に解析した研究はなく、IgA 腎症に関与するヒト共生細菌の役割は不明である。

一方、IgA 腎症の全ゲノム関連解析からは、HLA 領域を含む複数の感受性遺伝子座が同定され、中でも *TNFSF13* は、B 細胞における IgA クラススイッチに関与するサイトカイン、APRIL をコードする。過去、血清 APRIL 値は IgA 腎症で有意に上昇していることが報告されたが、私たちは扁桃深部陰窩の組織ホモジェネートを用いた ELISA で、IgA 腎症患者では習慣性扁桃炎患者に比して有意に APRIL が高値であることを見出した。動物モデルでは、BAFF トランスジェニックマウスは、共生細菌依存性に多価 IgA が上昇し、腎糸球体に IgA の沈着が観察される。共生細菌に親和性を有する IgA を産生するリンパ球が末梢組織へ分布し、いわゆる粘膜ファイアウォールの破綻が推定されている。以上から、ヒトに共生する細菌と生体が相互作用し、粘膜免疫で誘導されたリンパ球・形質細胞から産生された IgA が IgA 腎症を惹起することが想定された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、IgA 腎症の発症においてヒト共生細菌の関与を明らかにすることである。私たちは IgA 腎症の発症機序を探索する中で、扁桃深部陰窩に存在する細菌叢に着目し、16S-rRNA 解析により網羅的解析を行った (Nephrol Dial Transplant 2016)。この解析では IgA 腎症患者の扁桃細菌叢は習慣性扁桃炎患者に比較して有意な差は検出されなかったが、粘膜免疫異常として細菌に対する IgA の反応性が亢進している可能性が考えられた。本研究では、扁桃組織を用いて IgA-SEQ および IgA レパトア解析を行い、また IgA 腎症患者の血清 IgA と細菌株の親和性を解析することで、IgA 腎症患者の粘膜免疫と血中 IgA における病態の関連を明らかにすべく計画した。

3. 研究の方法

(1) 扁桃深部陰窩組織を用いた IgA-SEQ 解析

IgA 腎症患者と習慣性扁桃炎患者から治療のために摘出された口蓋扁桃の深部陰窩組織を切離し、組織ホモジェネートに抗 IgA 抗体を加えた。MACS で抗 IgA 抗体に結合する陽性フラクションを分離した後、さらに FACS で IgA 陽性フラクションを回収した。IgA 陽性フラクションから DNA を抽出し、16S-rRNA 解析を行なった。IgA 陰性フラクションも同様に 16S-rRNA 解析を行い、細菌に対する IgA 結合度の指標として IgA-index を算出し、二群間で比較した。

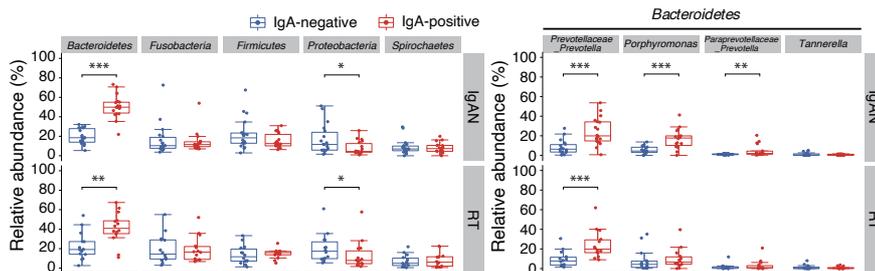


図1 扁桃組織のIgA-SEQ解析 (IgAN, IgA腎症 ; RT, 習慣性扁桃炎)

(2) 扁桃深部陰窩組織を用いた BCR (IgA) レパトア解析

上記と同様に口蓋扁桃の深部陰窩組織から RNA を抽出し、cDNA ライブラリを作成した。アダプターを結合し、IgA の定常領域を対象としたプライマーを用いて PCR を行い、シークエンス解析を行なった。IgA 分子の可変領域に存在するレパトアの相対存在比について IgA 腎症患者と習慣性扁桃炎患者の二群間で比較した。IgA 腎症患者で有意に多く存在するレパトアについては扁桃組織中の APRIL や BAFF、また細菌に結合する IgA の割合を示した IgA index とも検討した。

(3) IgA 腎症患者血清を用いた細菌 FACS 解析

IgA 腎症患者の血清をゲル濾過で分画し、多量体 IgA 分画と単量体 IgA 分画に含まれる糖鎖不全 IgA1 を測定した。また、摘出扁桃組織から単離された細菌株 (*Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, コントロールとして *Escherichia coli*)

と各分画を反応させ、FACS で IgA に結合する細菌の割合を定量化した。二群間で比較した。

4. 研究成果

(1) 扁桃組織の IgA-SEQ 解析

扁桃組織中に存在する IgA 結合細菌は、IgA 腎症患者および習慣性扁桃炎患者の両群において *Bacteroidetes* 門細菌群で有意に多く認められた。*Bacteroidetes* 細菌群の中では、IgA 腎症患者において *Prevotella* 属、*Porphyromonas* 属で有意に IgA 結合細菌が多く認められ、習慣性扁桃炎患者では、*Prevotella* 属のみで有意であった（前ページ 図 1）。IgA index による比較では、*Porphyromonas* 属において IgA 腎症患者で有意に高値であった。これらの解析から IgA 腎症患者の扁桃免疫では、*Bacteroidetes* 門（*Porphyromonas* 属）細菌群に対する免疫反応が亢進していることが示唆された（図 2）。

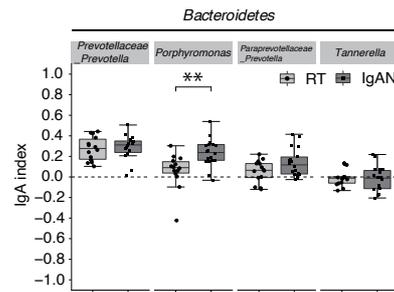


図2 扁桃組織のIgA index

(2) 扁桃組織の IgA レパトア解析

シーケンス解析により可変領域においてアミノ酸に変換可能なシーケンス配列が、サンプルあたり平均 10 万リード数が得られた。IgA レパトアの多様性は、IgA1 が IgA2 より有意に高値であったが、IgA 腎症と習慣性扁桃炎では差はなかった。IgA1 の重鎖レパトアの比較では、IgA 腎症患者で IGHV3-30 および IGHV3-38 の使用頻度が有意に高かった（図 3）。IGHV3-30 の CDR3 配列長の分布は歪みは認められなかった。IGHV3-30 は APRIL 高値群で、IGHV3-38 は BAFF 高値群で有意に使用頻度が高かった。さらに IGHV3-30 は *Bacteroidetes* 門細菌群における IgA index と有意な相関関係を示した（図 4）。以上の結果から、IgA 腎症患者の扁桃では、B 細胞における IgA クラススイッチに関わるサイトカインの発現増加に伴って、特定の IgA レパトアが使用されること、またそのレパトアを通じて、扁桃細菌叢への IgA の免疫反応が生じることが示唆された。

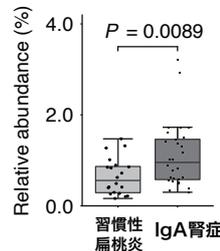


図3 IGHV3-30の相対存在比

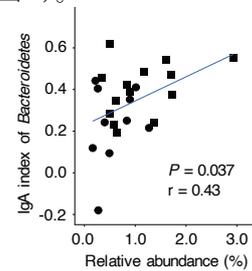


図4 IGHV3-30とIgA indexの相関関係

(3) IgA 腎症患者の血清多量体 IgA と糖鎖不全 IgA1

IgA 腎症患者の血清をゲル濾過で分画し、多量体 IgA を含むフラクション（F4）と単量体 IgA を含むフラクション（F9）を確認した。F4 には IgA を結合し 2 量体とする J 鎖が含まれていた。また、F4 と F9 における Gd-IgA1 を測定すると、IgA 腎症患者の F4 において Gd-IgA1 および Gd-IgA1/IgA が習慣性扁桃炎患者に比較して有意に高値であった。また、F4 において、IgA 腎症患者の IgA-IgG 複合体は習慣性扁桃炎患者に比して有意に高値を示した。これらの結果から多量体 IgA を形成する粘膜型 IgA が IgA 腎症患者の血中で上昇し、それは Gd-IgA1 の上昇に関与する可能性が考えられた。

(4) IgA 腎症患者の血清多量体 IgA の細菌結合能

IgA 腎症患者の血清をゲル濾過で分画した F4 と F9 を扁桃培養から単離した細菌株との結合を評価した。FACS で IgA 結合細菌を定量化すると、F4 において *Bacteroidetes* 門の細菌株（*Porphyromonas gingivalis* と *Prevotella intermedia*）に結合する IgA は F9 よりも有意に高値であり、また F4 の結合量は IgA 腎症患者では習慣性扁桃炎よりも有意に高値を示した（図 5）。さらに IgA 腎症患者の F4 の細菌結合量は F4 の Gd-IgA1 と有意の正の相関関係を示した（図 6）。一方、*Fusobacterium nucleatum* や *Escherichia coli* には F4 は親和性を示さなかった。以上より、IgA 腎症患者の血清には扁桃と同様の細菌親和性を有する多量体 IgA が増加し、これは粘膜型 IgA や Gd-IgA1 である可能性が考えられた。IgA 腎症において粘膜免疫機構・免疫細胞のホーミング異常などが背景に存在するのか、今後の研究課題である。

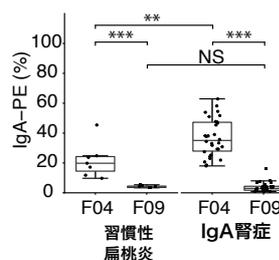


図5 多量体IgAとP. gingivalisの結合 (F4, 多量体IgA分画; F9, 単量体IgA分画)

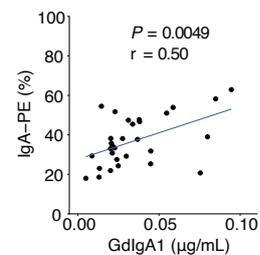


図6 P. gingivalisに対する多量体IgAの結合度と血清Gd-IgA1

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi Hiroki, Goto Shin, Takahashi Nao, Tsuchida Masafumi, Watanabe Hirofumi, Yamamoto Suguru, Kaneko Yoshikatsu, Higashi Koichi, Mori Hiroshi, Nakamura Yukio, Horii Arata, Kurokawa Ken, Narita Ichiei	4. 巻 36
2. 論文標題 Aberrant mucosal immunoreaction to tonsillar microbiota in immunoglobulin A nephropathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 75 ~ 86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ndt/gfaa223	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山口浩毅、後藤眞、山本卓、金子佳賢、成田一衛。
2. 発表標題 IgA腎症患者の口蓋扁桃陰窩におけるIgA結合細菌群と糖鎖不全IgA1.
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Yamaguchi, Shin Goto, Masafumi Tsuchida, Hirofumi Watanabe, Suguru Yamamoto, Yoshikatsu Kaneko, Ichiei Narita.
2. 発表標題 28. Aberrant Immune Response to Periodontopathic Microbiota in Patients with IgA Nephropathy.
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Yamaguchi, Shin Goto, Masafumi Tsuchida, Hirofumi Watanabe, Suguru Yamamoto, Yoshikatsu Kaneko, Ichiei Narita.
2. 発表標題 Galactose-deficient IgA1 expressed in tonsillar crypts correlates with the severity of glomerular injury in patients with IgA nephropathy
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Yamaguchi, Shin Goto, Masataka Yonezawa, Masafumi Tsuchida, Hirofumi Watanabe, Suguru Yamamoto, Yoshikatsu Kaneko, Ichiei Narita
2. 発表標題 Immune Response to Tonsillar Microbiome Are Perturbed in the Development of IgA Nephropathy
3. 学会等名 2018 Kidney Week (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口浩毅、後藤 眞、山本 卓、金子佳賢、成田一衛
2. 発表標題 IgA腎症患者の扁桃陰窩におけるIgAレパトアとIgA結合細菌叢の関連
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020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	成田 一衛 (Narita Ichiei) (20272817)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------