

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08588

研究課題名(和文) IgA腎症モデルマウスにおけるIgA沈着後の糸球体障害進展機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of the glomerular injury after IgA deposition on mesangial cells in IgA nephropathy model mice

研究代表者

金子 佳賢 (Kaneko, Yoshikatsu)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：80444157

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腎症は腎糸球体メサンギウム領域へのIgA1の沈着を特徴とする糸球体腎炎である。マウスへのB cell activation factor of the TNF family (BAFF) 遺伝子発現ベクターの静注投与による遺伝子導入にて、高IgA血症および腎糸球体メサンギウム領域へのIgAの沈着が誘導され、12カ月後にはメサンギウム細胞増多、メサンギウム基質増加、15カ月後にはメサンギウム融解などの高度の糸球体障害が認められた。単離糸球体から抽出したRNAを用いて発現遺伝子を経時的に比較検討した結果、Baff遺伝子導入後に共通して発現上昇している遺伝子として、遺伝子Xを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgA腎症は最も頻度の高い原発性糸球体腎炎であり、発症後約20～30年で20%から50%の患者に腎機能低下を認め、末期腎不全に至る主要な原疾患のひとつである。メサンギウム領域にIgA1が沈着する現象は同じでありながら、患者個々により組織学的重症度、臨床学的重症度は大きく異なり、腎予後に大きな差が生じる。経時的、網羅的解析により、糸球体障害進展の鍵となる分子が新たに同定されることにより、ヒト腎生検組織における新たな予後予測因子が確立することが期待される。

研究成果の概要(英文)：IgA nephropathy is a primary glomerulonephritis characterized by deposition of IgA1 in the glomerular mesangial region. Gene transfer by intravenous administration of the B cell activation factor of the TNF family (BAFF)-gene expression vector into mice induced elevated level of serum IgA and deposition of IgA in the renal glomerular mesangial region. Mesangial cell hyperplasia and mesangial matrix increase were observed 12 months later, and severe glomerular injuries such as mesangial lysis were demonstrated 15 months later. As a result of comparing the expressed genes over time using RNA extracted from isolated glomeruli, gene X was identified as one of the genes whose expression was commonly increased after Baff gene transfer.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：IgA腎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は腎系球体メサンギウム細胞の増殖性変化とメサンギウム領域への IgA1 の沈着を特徴とする、最も頻度の高い原発性系球体腎炎であり、発症後約 20~30 年で 20% から 50% の患者に腎機能低下を認め、末期腎不全に至る主要な原疾患のひとつである。糖鎖異常を持つ IgA1 が、扁桃を主体とする上気道感染に伴い産生され、単独で、もしくは糖鎖異常 IgA1 に対する IgG または IgA1 型自己抗体あるいは可溶性 Fc α 受容体と複合体を形成し、メサンギウム細胞に沈着し、メサンギウム細胞の増殖および細胞外基質の増生を促して腎炎を発症する、多段階発症メカニズムが提唱されている。メサンギウム細胞上の IgA1 の受容体候補として研究代表者はインテグリン α 1/ β 1 および α 2/ β 1 を同定し、報告した(科学研究費補助金若手 (B)(平成 21~23 年)「IgA 腎症におけるメサンギウム細胞への IgA 沈着メカニズムの解明と治療への応用」研究代表者 金子佳賢、Yoshikatsu Kaneko, et al. *Int Immunol* 24, 219-232, 2012)。IgA1 がメサンギウム細胞に沈着してからの系球体障害の進行機序については、メサンギウム細胞の活性化による TNF- α 、IL-6、IL-8、TGF- β 、マクロファージ遊走阻止因子、血小板活性化因子などの液性因子の自己分泌や、VEGF-A の発現低下、一酸化窒素の増加、可溶性 NO 合成酵素亢進、アポトーシスの誘導、レニン・アンジオテンシン系の亢進や、補体活性化の関与がこれまで報告されている(エビデンスに基づく IgA 腎症診療ガイドライン 2020)。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで、IgA1 がヒト培養メサンギウム細胞に反応してインテグリン α 1 および α 2 の発現を増強させることを見出し、さらに特異的 siRNA を用いてヒト培養メサンギウム細胞にインテグリン α 1/ β 1 または α 2/ β 1 の発現をノックダウンさせた条件での検討により、インテグリン α 2 が IgA との結合により細胞外基質産生などの病的状態を引き起こす一方、インテグリン α 1 は保護的に働いている可能性を示した(科学研究費補助金基盤 (C)(平成 28~30 年)「腎系球体メサンギウム細胞と IgA1 の相互作用および関連分子による修飾機構」研究代表者 金子佳賢)。そこで研究代表者は、IgA 腎症の発症、進展におけるインテグリン α 1 および α 2 の役割を含め、IgA 沈着後のメサンギウム細胞の反応およびその後進展する系球体障害の機序を明らかにするため、IgA 腎症モデルマウスを作成し、系球体を単離し、RNA を抽出して RNA シーケンスにより発現遺伝子の違いを経時的、網羅的に比較検討することにより、IgA 腎症の系球体障害進展機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

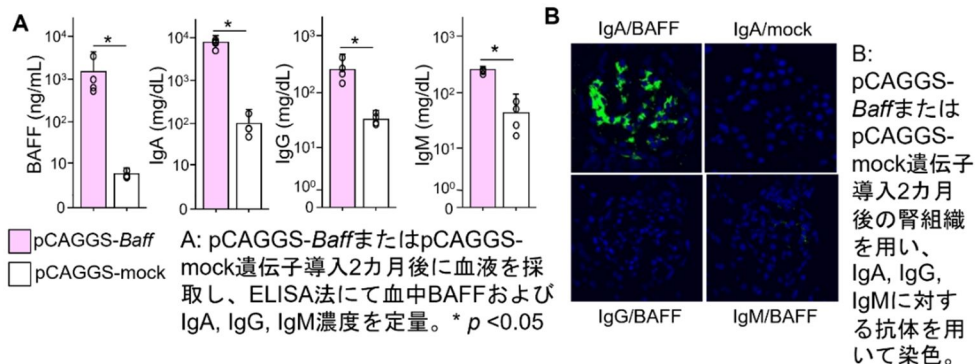
IgA 腎症のモデルマウスとして、肝特異的 α 1-antitrypsin をプロモーターとして B cell activation factor of the TNF family (BAFF) 遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスにおいては、血中 BAFF 濃度および IgA、IgM 濃度の上昇と共に腎系球体に IgA の沈着を認め、生後 6~8 カ月でアルブミン尿および系球体硬化を認めることが報告された。このトランスジェニックマウスにおいては無菌状態では血中 IgA の増加を認めず、IgA の沈着および系球体障害は引き起こされない。すなわち系球体障害は BAFF の直接作用ではなく、SPF 環境下の腸内細菌依存性の IgA を介しており、BAFF の直接作用は最小限である(Douglas D McCarthy, et al. *J Clin Invest* 121, 3991-4002, 2011)。また、研究代表者の予備実験では系球体に BAFF 受容体の発現は認められなかった。そこで研究代表者は、pCAGGS ベクターに BAFF 遺伝子を組み込んだ発現プラスミドベクター(pCAGGS-*baff*)を hydrodynamics 法にてマウス肝細胞に導入した、高 BAFF 血症マウスを

作成した。pCAGGS ベクターはチキン β -actin プロモーターにサイトメガロウイルス IE エンハンサーを有しており (Hitoshi Niwa, et al. *Gene* 108, 193-199, 1991) プロモーター下流に組み込んだ遺伝子を生体内で高発現させる発現ベクターとして多くの研究に使用されている。オリジナルの pCAGGS ベクターは mock ベクターとして使用した。それぞれのプラスミド DNA10 μ g を環状のままリン酸緩衝生理食塩液 2mL に溶解して、マウス尾静脈より 10 秒以内に全量を静注し、静水圧によりマウス肝細胞内にプラスミドベクターを導入し、静注 2 週間後に ELISA 法により血中 BAFF 濃度ならびに血中 IgA 濃度の上昇を確認した。また、pCAGGS-*baff* 静注後 1 か月半、3 か月、4 か月半で数匹ずつ麻酔下にて両腎にビーズを灌流し、マグネットを用いて糸球体の単離を行い、単離糸球体における発現遺伝子を RNA シークエンシングで網羅的に解析し、IgA と結合した際のメサンギウム細胞におけるインテグリン α 1 および α 2 を含めた、糸球体内での IgA とメサンギウム細胞の反応について比較検討し、どのような機序でメサンギウム細胞増多および基質増加が生じ、糸球体硬化へ進展していくのかを、組織学的所見とともに経時的に検証した。

4. 研究成果

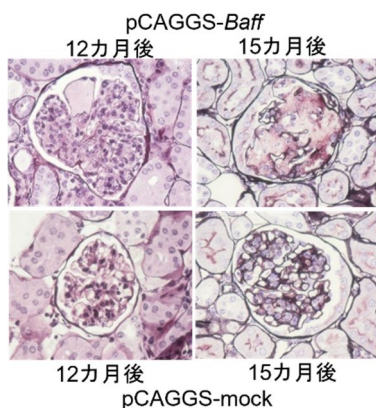
本研究では 11 週齢の C57BL/6 マウスに上記ベクターの静注投与による遺伝子導入を行い、ベクター静注 2 週間後に血中 BAFF 濃度の上昇を認め、2 か月後には高 BAFF 血症、高 IgA 血症が引き起こされた。また、血中 IgG および IgM 濃度の上昇も認められた。また、遺伝子導入 2 か月後には、腎糸球体メサンギウム領域への IgA の沈着を誘導することができた (図 1)。

図 1 BAFF 遺伝子導入 2 か月後の血中濃度および腎の組織学的評価



さらに 12 か月後にはメサンギウム細胞増多、メサンギウム基質増加を認め、15 か月後にはメサンギウム融解が生じるなど、高度の糸球体障害が認められた (図 2)。そこで、pCAGGS-*baff* 遺伝子静注後 1 か月半、3 か月、4 か月半にそれぞれ腎組織から糸球体を尿管・間質成分から分離し、磁石で捕獲することにより糸球体単離を行い、抽出した RNA を用いて発現遺伝子を経時的に比較検討した結果、*Baff* 遺伝子導入後に共通して発現上昇している遺伝子として、遺伝子 X を同定した。当初想定していた、インテグリン α 1 および α 2 の発現増強は、どの段階でも確認できなかった。この実験法を用いることにより、さまざまな遺伝的背景を持つマウスや、各種遺伝子欠損マウスを用いた IgA 腎症モデルを容易に作成することが可能となった。

図 2 BAFF 遺伝子導入後の腎の組織学的変化



pCAGGS-*Baff* または pCAGGS-mock 遺伝子導入 12 か月後および 15 か月後の腎組織の PAM 染色。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Ito Toru, Yamamoto Suguru, Yamaguchi Keiichi, Sato Mami, Kaneko Yoshikatsu, Goto Shin, Goto Yuji, Narita Ichiei | 4. 巻 295 |
| 2. 論文標題 Inorganic polyphosphate potentiates lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory response | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 4014 ~ 4023 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011763 | 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 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 Miyazaki Satoru, Iino Noriaki, Koda Ryo, Narita Ichiei, Kaneko Yoshikatsu | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Brain derived neurotrophic factor is associated with sarcopenia and frailty in Japanese hemodialysis patients | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Geriatrics & Gerontology International | 6. 最初と最後の頁 27 ~ 33 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ggi.14089 | 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 Wakamatsu Ayako, Sato Hiroe, Kaneko Yoshikatsu, Cho Takamasa, Ito Yumi, Kurosawa Yoichi, Hasegawa Eriko, Kobayashi Daisuke, Nakatsue Takeshi, Kuroda Takeshi, Suzuki Yoshiki, Uchiyama Toshio, Narita Ichiei | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 Association of coexisting anti-ribosomal P and anti-dsDNA antibodies with histology and renal prognosis in lupus nephritis patients | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Lupus | 6. 最初と最後の頁 448 ~ 458 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0961203320983906 | 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 Cho Takamasa, Sato Hiroe, Wakamatsu Ayako, Ohashi Riuko, Ajioka Yoichi, Uchiumi Toshio, Goto Shin, Narita Ichiei, Kaneko Yoshikatsu | 4. 巻 206 |
| 2. 論文標題 Mood Disorder in Systemic Lupus Erythematosus Induced by Antiribosomal P Protein Antibodies Associated with Decreased Serum and Brain Tryptophan | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Immunology | 6. 最初と最後の頁 1729 ~ 1739 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2000260 | 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0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|