

機関番号：17102

研究種目：若手研究 B

研究期間：H21 ～ H22

課題番号：21790994

研究課題名（和文）ヘノホ・シェーンライン紫斑病発症における自然免疫の関与

研究課題名（英文）Contribution of innate immune systems to the pathogenesis of Henoch-Schölein Purpura

研究代表者

（ 堤 康 ）

研究者番号：80419564

研究成果の概要（和文）：なし

研究成果の概要（英文）：なし

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
21年度	1800000	540000	2340000
22年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
年度			
総 計	3000000	900000	3900000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：免疫学、腎臓病学、自然免疫、腎炎

## 1. 研究開始当初の背景

Henoch-Schönlein（ヘノホ・シェーンライン）紫斑病（以下HSP）は主に小児に見られる細小血管を中心とした血管炎であり、多くにA群β溶血性連鎖球菌の先行感染を認めるがウイルス感染とHSP発症との関連も指摘されている。またHSPの発症機序として感染等を契機としたIgA産生能の亢進等の免疫応答異常が推察されている。近年自然免疫系特にToll-like receptor(以下TLR)の発見を通じて大きな進展が見られ、TLRの一部がウイルスに対する免疫応答を行い、またB細胞にも発現し直接TLRを

介して微生物を認識し活性化することも明らかになっている。同じ全身性血管炎である川崎病の急性期において自然免疫、特にNK細胞の活性化が病態に強く関与している可能性が示唆されている。さらに我々は、HSPに紫斑病性腎炎（以下、HSPN）を合併する症例としない症例が存在することから、この相違を明確に規定する分子の存在を解明するため、正常集団（age-matched control）とHSP群（腎炎合併なし）、正常集団とHSPN群の各々についてマイクロアレイを用いた各遺伝子発現量の解析を

行い、GNLYおよびGZMBの発現量が、腎炎非合併例に比して腎炎合併例において高いことを示した。GNLY, GZMBはいずれもNK細胞、細胞傷害性T細胞(CTL)が産生する細胞傷害性顆粒蛋白で、NK細胞、CTLの機能発現に重要な役割を果たしていることが知られている。

また定量PCR法で患者末梢血単核球上の同分子の発現量を解析を行った結果でGNLYの遺伝子発現が非腎炎発症群に比して、腎炎発症群で高い傾向が示されており、HSP患者の腎炎発症にNK細胞の活性化が関与している可能性が示されている。以上より、我々はHSPの発症、およびその後の腎炎合併に、ウイルスDNAに特異的なTLRを介したB細胞活性化及びそれに伴うIgAを中心とした抗体産生亢進や、NK細胞の活性化が関与している可能性を考えた。本研究により自然免疫系がHSPおよびHSPN発症に及ぼす影響を明らかにし、その発症メカニズムの解明を目指したい。DNAウイルス感染によるTLRを介したB細胞やNK細胞の活性化が、HSPおよびHSPN発症に関与しているとする報告はこれまでなく、その発想は独創的である。またそれが証明された場合、HSPの発症予防・治療に貢献できるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究課題では指定された期間内にHSP症例の集積を行い、HSPと自然免疫との関連についてマイクロアレイ解析を進め、発症メカニズムの解明を行う。本研究課題では指定された期間内にHSP症例の集積を行い、HSPと自然免疫との関連について解析を進め、発症メカニズムの解明を行う。その結果をHSP患者の治療に役立てたいと考えている

## 3. 研究の方法

平成21年度：HSP症例の集積を行った。全例HSP発症時の末梢血をヘパリン加スピッツに2mlほど採取し、得られた検体は以下の方法にて解析を進めた。

①TLR刺激なしの検体を用いて、以下の実験を行う。検体に蛍光抗体を添加し処理を行った後、溶血試薬、自動溶血機を用いて溶血する。①CD69陽性B細胞、②CD69陽性NK細胞の各比率をフローサイトメーターで測定する。CD69発現を正常集団と比較することで、HSP患者でのB細胞、NK細胞の活性化を確認する。

②続いて検体のTLR刺激を以下の手順で行う。

1. HSP患者全血2mlから得られた検体を96well plateに入れ、TLR3およびTLR9に対するLigandをそれぞれ添加する。

2. インキュベータで20時間静置した後、各種蛍光抗体をこれに添加し、30分暗所で常温静置する。

・溶血後、フローサイトメーターを用いて、各TLRリガンド刺激での①CD69陽性B細胞、②CD69陽性NK細胞の各比率を測定する。CD69発現を比較することで、HSP患者におけるTLR刺激前後でのB細胞およびNK細胞の活性化の有無を確認する。活性化B細胞、NK細胞のHSP発症への関与を明らかにする目的で、以下の実験を行う。

・Cell sorterを用いてHSP患者の末梢血中のB細胞およびNK細胞をsortingする。

・各細胞を用いて、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を正常集団、HSP群、HSPN群の各群間で行うため以下の実験を計画した。

以下の手順にてB細胞表面免疫グロブリン(smlgA)の測定を行う。

1. HSP患者検体を処理後、FITC標識 IgA、PE標識 anti-human-CD69、PC5標識 anti-

human-CD19を添加する。

2. 溶血試薬および自動溶血機で溶血後、フローサイトメーターを用いてsmIgA陽性CD19陽性細胞を測定する。

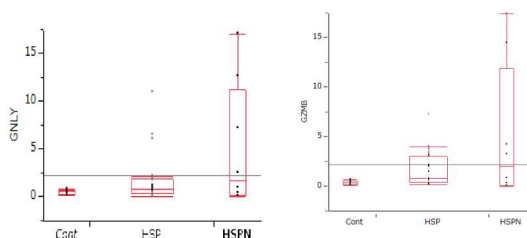
⑤ IgA産生B細胞のHSP,HSPN発症への関与を明らかにする目的で、以下の実験を行う。

・HSP患者の末梢血中のIgA産生B細胞をcell sorterでsortingする。

・各細胞を用いて、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を正常集団、HSP群、HSPN群の各群間で行う。

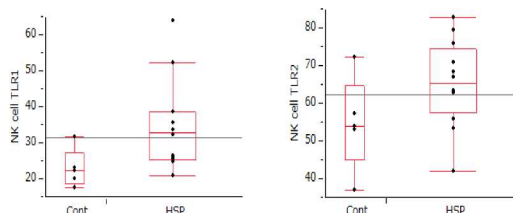
#### 4. 研究成果

我々の研究室の実験結果から、同じ全身性血管炎の川崎病急性期において自然免疫、特にNK細胞の活性化が病態に強く関与している可能性が示唆されている。さらに我々は、HSPに紫斑病性腎炎（以下、HSPN）を合併する症例としない症例が存在することから、この相違を明確に規定する分子の存在を解明するため、正常集団とHSP群（腎炎合併なし）、正常集団とHSPN群の各々についてマイクロアレイを用いた各遺伝子発現量の解析を行い、GNLYおよびGZMBの発現量が、腎炎非合併例に比して腎炎合併例において高いことを示した。



また、これまでの研究結果から、HSP患者由来の末梢血にTLR1-4および7-9に対するリガンドを添加し短期培養のちに、flow cytometryでCD69+NK細胞

およびCD69+B細胞を測定したところ、HSP発症群では健常群に比し、TLR1,2,4,9に対するリガンドによりNK細胞が活性化され、TLR1,4に対するリガンドではB細胞が活性化される傾向を示した。



#### 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◇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 ( )

研究者番号：

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：