

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08286

研究課題名(和文) IgA腎症のMHC class II の遺伝子多型による発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenic mechanism of IgA nephropathy by MHC class II gene polymorphisms

研究代表者

柳川 宏之 (Yanagawa, Hiroyuki)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：60722759

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)：MHC class II 遺伝子多型のIgA腎症の病態への関与を明らかにするために、IgA腎症自然発症モデルマウスのddYを用いた。ddYマウスはMHC class II のハプロタイプにより3つに分類でき、ハプロタイプ間の表現型を評価した。予想に反してddYマウスにおいて、ハプロタイプ間で腎系球体へのIgA沈着や表現型の相違を認めなかった。加えて、IgA腎症において病原性が示唆されている糖鎖異常IgAや腎メサンギウムタンパクに対する自己抗体についても検討したが、病原性の主座を特定することはできなかった。以上より、本研究でIgA腎症の発症とMHC class II の関連性を明らかにすることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノムワイド関連解析により、IgA腎症におけるMHC class II 遺伝子変異と病態の関与が示唆されている。ddYマウスのMHC class II のハプロタイプが3つに分類できること、さらにddYマウスの発症様式が週齢に応じて3つに分類できることから、病態とMHC class II に着目して検討をおこなった。本研究ではこれらの関連を明らかにすることはできなかったが、IgA腎症の動物モデルを用いて検証した研究というのは皆無あり、今後のIgA腎症のMHC class II の遺伝子多型による研究において新たな知見を与えうると考える。

研究成果の概要(英文)：To clarify the involvement of MHC class II gene polymorphisms in the pathogenesis of IgA nephropathy (IgAN), we used ddY mice, a spontaneous model of IgAN. DdY mice can be divided into three categories according to MHC class II haplotypes. Phenotypic differences between haplotypes were evaluated, however, no differences in IgA deposition on glomeruli or phenotype were observed. In addition, although galactose-deficient IgA and autoantibodies against renal mesangial proteins, which have been suggested to be pathogenic in IgAN, were also examined, there are question whether galactose-deficient IgA or autoantibodies were pathogenic in IgAN could not be identified. Thus, we were unable to determine the association of MHC class II with the development of IgAN in this study.

研究分野：腎臓

キーワード：IgA腎症 MHC class II 糖鎖異常IgA IgA型自己抗体

1. 研究開始当初の背景

何故、IgA 腎症は MHC class の遺伝子多型により発症するのか？近年の全ゲノム関連解析 (genomic-wide association study; GWAS) により、MHC class 領域の遺伝子多型が、本症の疾患と強く相関を持つことが明らかにされている。

IgA 腎症は、腎系球体メサンギウム細胞への IgA の優位な沈着とメサンギウム細胞増殖を疾患定義とする世界で最も罹患頻度の高い原発性系球体腎炎である。血尿と蛋白尿を伴う緩徐な腎機能障害の進行を呈することが多いが、未治療の場合 30-40%の患者は 10-20 年の経過で末期腎不全に至る予後不良の疾患である。その詳細な病因病態は完全には解明されておらず、疾患特異的な治療法も確立されていないことから、現在本邦では指定難病に認定されている。

本症患者の腎系球体に沈着する IgA は、そのヒンジ部の O-結合型糖鎖にガラクトースが欠損した IgA1 (Galactose deficient-IgA1; Gd-IgA1)であることが明らかにされている。IgA 腎症の病態において、まずこの Gd-IgA1 が血中で増加し (1st hit)、そのヒンジ部糖鎖異常部位を認識する IgG または IgA 型の自己抗体が産生される (2nd hit)、これらの抗体が、血中で高分子量の免疫複合体を形成することで (3rd hit)、肝でのクリアランスが遅延し系球体メサンギウム細胞への沈着により腎炎が惹起される (4th hit)、とする multi-hit 仮説が提唱されている (Suzuki H, J Am Soc Nephrol:2011)。しかしながら、Gd-IgA1 産生や自己抗体の産生の機序の詳細は解明が進んでいない。

MHC は class および 遺伝子にコードされる高度多形成を持つ細胞表面蛋白であり T 細胞への抗原提示に関与する。class と は構造および生体内での発現パターンが異なっている。class は全ての有核細胞に発現し内因性抗原を CD8+ T 細胞に提示するが、class は B 細胞や樹状細胞等の抗原提示細胞のみに発現し、外来抗原のペプチド断片と結合して CD4+ T 細胞への抗原提示を行う。ヒトの MHC 分子の遺伝的名称がヒト白血球型抗原 (HLA) であり、HLA class には HLA-DR、DQ、DP が存在する。IgA 腎症の GWAS において HLA 領域の遺伝子座に感受性座位が同定され、MHC class は他の自己免疫疾患と同様に本症においても感受性遺伝子として同定されている。しかしながら、IgA 腎症の発症・重症化と MHC class のハプロタイプの直接的な機序について示した研究は少ない。

近交系マウスである ddY マウスは、以前より IgA 腎症自然発症モデルとして知られていたが、その発症頻度と重症度が各マウスで異なることから研究に用いることが困難であった。我々はこの ddY マウスに経時的に腎生検を行い、同マウスが発症時期に応じて早期発症群・晩期発症群・未発症群の 3 群に分類できることを明らかにした (Suzuki H, J Am Soc Nephrol: 2005)。さらに、早期発症群のみを 20 世代以上選択的に交配させることで、全例で IgA 腎症を発症する gddY (Grouped ddY) マウスを樹立した。このマウスは表現型のみでなく、遺伝子制御の面からもヒト IgA 腎症と類似しており、モデルとしての有用性も確認している (Okazaki K, J Am Soc Nephrol:2012)。

以前より、何故 ddY マウスは早期発症群、晩期発症群、未発症群の 3 群に分類できるのか、という疑問があった。今回 ddY マウスの MHC class がハプロタイプ毎に 3 つに分類できるとが明らかになったことから、IgA 腎症の発症と MHC class の関連という本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

MHC class について、GWAS の解析に基づいたコホート研究は多数報告されているが、MHC class 遺伝子多型により発症に至る直接的な機序については十分に検討がなされていない。本研究では、ddY マウスを用いて、MHC class と IgA 腎症発症・重症化の機序を解明することを目的とする。ddY マウスの MHC class のハプロタイプとその発症の関連を解明するという観点から行った研究は皆無であり、その点で本研究は極めて独自性が高い。本研究の成果により、IgA 腎症の発症に関する糖鎖異常 IgA1 の糖鎖異常を認識する自己抗体の産生機序等、未解明な点が解明され、IgA 腎症への特異的な治療に向けた研究基盤が整うと考えられた。

3. 研究の方法

ハプロタイプ毎の比較

ddY マウスの MHC class のハプロタイプを決定するにあたり、MHC class 領域の遺伝子配列を sanger sequencing 法を用いて決定した。その結果、ddY マウスの MHC class が、3 つのハプロタイプ s/s, s/q, q/q のいずれかに分類できることを明らかにした (以下 ddY(s/s), ddY(s/q), ddY(q/q)とする)。まず本研究では、ハプロタイプ s, q をそれぞれ認識する抗マウス MHC class 抗体 (OX-6, NIMR4) を用いて、計 48 匹のマウスにタイピングを行い、各マウスの MHC class のハプロタイプを決定した。予備研究の結果、ddY マウス (24 週齢, N=8, s/s= 3 匹, s/q= 3 匹, q/q= 2 匹) は、そのハプロタイプに関わらず、すべ

でのマウスにおいて、腎系球体への IgA の沈着が確認された。これに対し、IgG・C3 の腎系球体への共沈着を認めたマウスは、ddY (s/s) のみであった。この結果は、このマウスモデルにおいて、ddY (s/s) が、IgA 腎症早期発症群に相当する可能性を示唆する。

本研究では、ddY (s/s) が早期発症群、ddY (s/q) が晩期発症群、ddY (q/q) が未発症群と仮説を立て、20 週齢以降に尿蛋白による IgA 腎症発症の評価を行い、gddY マウスをポジティブコントロールとして、病理学的な腎障害と IgG・C3 の共沈着を評価する。

糖鎖異常 IgA と自己抗体の検討

先行研究にて、ddY マウスに Toll like receptor 9 (TLR9) のアゴニストである非メチル化 CpG DNA を経鼻的に投与することでガラクトースを欠損する糖鎖異常 IgA が誘導され、腎炎が増悪することが明らかになっている (Makita Y, *Kidney Int*:2020)。現在提唱されている IgA 腎症の病態仮説である muti-hit 仮説において、この糖鎖異常 IgA の増加が 1st hit とされており、IgA 腎症の発症に関与していることが知られている。さらに、IgA 腎症モデルマウスである grouped ddY (gddY) マウスと IgA 腎症患者の血清中に、腎メサンギウム細胞表面タンパクに対する IgA 型自己抗体が存在することが明らかになり、マウスではこの IgA 自己抗体が系球体に沈着することが判明している (Nihei Y, *Sci Adv*:2023)。

そこで IgA 腎症において、糖鎖異常 IgA と腎メサンギウムタンパクに対する自己抗体、どちらが病態の主座であるか、という疑問が残る。以上を踏まえて、これを検討するために、自己抗体が存在しない状況下で、糖鎖異常 IgA を誘導することで IgA 腎症が発症するかを検証する。具体的には野生型マウスに非メチル化 CpG DNA を経鼻投与することで、糖鎖異常 IgA が誘導できるかを検証する。さらにその後、非メチル化 CpG DNA 投与による ddY マウスの糖鎖異常 IgA の誘導において、MHC class のハプロタイプ毎の表現型を評価する。

4. 研究成果

40 週齢時点で、ddY マウスの腎臓を免疫蛍光染色で評価したところ、すべてのマウスで IgA、IgG、C3 の系球体への沈着を認めていた。沈着の程度についてもハプロタイプ間の相違を認めず、血清 IgA、糖鎖異常 IgA、尿蛋白においても有意な変化を認めなかった。そこで、より早い週齢時点から、表現型を評価することとし、ddY マウスを 4 週齢以降、4 週齢毎 (4 週齢より開始し 24 週齢まで、それぞれ N=8) に免疫蛍光染色で腎系球体への IgA の沈着を評価したところ、全ての週齢のマウスで系球体への IgA 沈着を認め、尿蛋白を認めないことが明らかになった。当初の予想と反して、先行研究で報告されたように IgA 腎症時期による分類はできなかった。この原因としては、ddY マウスは近交系マウスであるため、遺伝子が統一されておらず、起源のマウスコロニーが異なることで表現型に相違が生じたためと考えた。また、先行研究の ddY マウスでは MHC class のハプロタイプによるタイピングを行っておらず、今回の研究で使用した ddY マウスとは異なるハプロタイプであった可能性がある。本研究では当初、「ddY (s/s) が早期発症群、ddY (s/q) が晩期発症群、ddY (q/q) が未発症群」と仮説を立て検証を行ったが、全ての ddY マウスの系球体に IgA が沈着しており、野生型マウスでは沈着しないことから、ハプロタイプ s と q いずれもが IgA 腎症の発症に関与する可能性が考えられた。

次に、ddY マウスにおいて IgA が沈着するだけでなく、その後炎症が惹起され系球体腎炎に至るための要素を解明するために糖鎖異常 IgA と IgA 型自己抗体に着目した。先行研究で gddY マウスと ddY マウスの血清中には腎メサンギウムタンパクに対する IgA 型自己抗体が存在することが明らかになっており、糖鎖異常 IgA と IgA 型自己抗体のいずれが IgA 腎症発症の主座であるかを検討した。まず、IgA 型自己抗体が存在しない中で、糖鎖異常 IgA のみで IgA 腎症を発症するかを検討することとした。これを検討するために、腎メサンギウムタンパクに対する IgA 型の自己抗体が存在しない野生型マウスに非メチル化 CpG DNA を経鼻的に投与し、糖鎖異常 IgA が誘導できるかを検証した。予想に反して、野生型マウスでは糖鎖異常 IgA は誘導されず、系球体への IgA 沈着や血清 IgA の増加、尿蛋白の出現を認めなかった。野生型マウスの鼻咽腔関連リンパ組織内には存在しない、ddY マウスでのみ存在する異常 B 細胞が TLR9 の刺激で糖鎖異常 IgA を誘導すると考えられた。自己抗体が存在しないマウスにおいて糖鎖異常 IgA のみを誘導させることはできておらず、糖鎖異常 IgA と自己抗体のどちらが IgA 腎症の病態の主座であるかは不明である。

しかしながら、動物モデルを用いて、IgA 腎症の病態と MHC class の関連性について、検討した研究は皆無であり、GWAS の結果をみると、これらの関連性については今後も検討していく必要がある。今後も解析を進める上で、新たな知見を与えうる研究であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	鈴木 仁 (Suzuki Hitoshi) (10468572)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究分担者	鈴木 祐介 (Suzuki Yusuke) (70372935)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授 (32620)	

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