

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790804

研究課題名（和文） IgA 腎症における補体、特に MBL の関与の検討

研究課題名（英文） The role of Complement Pathways in IgA nephropathy.

研究代表者

田中 裕一（Tanaka Yuichi）

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：10420837

研究成果の概要（和文）：IgA 腎症における補体の関与を検討するために、IgA 腎症自然発症モデルマウス“grouped ddY mouse (gddY)”における補体経路の関与を検討した。その結果、gddY では血中多量体 IgA および IgA-IgG 免疫複合体が、補体活性化を介して腎障害の程度を規定していると考えられた。さらに gddY では糖鎖不全 IgA が、Balb/c マウス (Balb/c) よりも多く、IgA の糖鎖不全の程度が血中多量体 IgA および IgA-IgG 免疫複合体の形成に関係していると考えられた。以上より糖鎖不全 IgA が血清中の多量体 IgA および免疫複合体の形成に関与し、補体系を活性化し組織障害を惹起していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We researched complement pathway in IgA nephropathy model mouse “grouped ddY mouse (gddY)”. We observed that polymeric IgA and IgA-IgG immune complex regulate severity of IgA nephropathy by the activation of complement pathway in gddY. The other hand, gddY have more amount of aberrantly glycosylated IgA than Balb/c. From this finding, we think that the degree of glycosylation of IgA influence the formation of polymeric IgA and IgA-IgG immune complex. Therefore, aberrantly glycosylated IgA may influence the formation of macromolecular IgA including IgA-IgG immune complexes and subsequent complement activation, leading to full progression of IgAN.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1, 100, 000	330, 000	1, 430, 000
2011 年度	1, 100, 000	330, 000	1, 430, 000
2012 年度	800, 000	240, 000	1, 040, 000
年度			
年度			
総 計	3, 000, 000	900, 000	3, 900, 000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：IgA 腎症, 補体, レクチン経路, 骨髄移植, MBL

1. 研究開始当初の背景

【背景】

●IgA 腎症における補体 Lectin pathway の関与

IgA 腎症は、病理形態学的に糸球体のメサ

ンギウム基質の増生とメサンギウム細胞の増殖を特徴とする腎炎であり、蛍光抗体法でメサンギウム領域に IgA 優勢の沈着と補体 C3 の沈着を認める。最初の報告から 40 年経つが、IgA 腎症の病因はいまだ不明である。

血清 IgA/C3 比は、疾患の特異度 (J Clin Lab Anal. 2003;17:73-6.)、および疾患の予後と関連している (Nephron 2002;91:755-758)。この補体の活性化は補体 Alternative Pathway や Lectin Pathway の活性化が想定されている。事実、IgA 腎症の患者では Lectin Pathway の鍵を握る分子である Mannan-Binding-Lectin (MBL) がメサンギウムに沈着している (Nephron Dial Transplant 1998;13:1984-990)。

●補体のクリアランス機能

自然免疫の一つである補体系は異物(病原体、アポトーシス細胞、免疫複合体、核崩壊産物)上で活性化し、補体 C4・C3 の活性化産物である C4b、C3b は赤血球膜状に多く発現している Complement Receptor-1 (CR1) に結合する。CR-1 に補足された免疫複合体は網内系の肝臓・脾臓に運ばれ phagocyte により食食・処理され、非炎症性に免疫複合体、核崩壊産物等の病因物質のクリアランスを行っているとの報告がある (Journal of Immunology 2004; 60, 23-29)

●IgA 腎症における polymeric IgA1 のクリアランス

IgA 腎症の糸球体に沈着している IgA は polymeric IgA1 (pIgA) であり、MBL はこの pIgA と高い結合能および補体活性化能を有しているとされている (Semin Nephrol 2008 ;28 :58-65)。

他方、古典経路の最初の分子である C1q 欠損症では、90%以上の症例で SLE を発症するといわれている。その原因としては免疫複合体のクリアランスが低下するためといわれている (J Clin Invest. 1992 Nov;90(5):2075-83)。この事実から推察されることは IgA 腎症においても MBL は pIgA に関係した免疫複合体のクリアランスに関わっていることが予想され、MBL 欠損者ではクリアランスが低下することにより、重症化していると予想される。

●IgA 腎症自然発症マウス” Grouped ddY マウス” モデルの確立とその樹立

ヒトは他の生物に比べて遺伝的多様性に富んでおり、環境因子やその応答にも個人差があるため、特に多因子疾患においては遺伝子解析が困難である。そのため、妥当性をもった動物モデルの遺伝子解析が重要である。1920 年代にドイツから日本に持ち込まれた ddY マウスのなかに、加齢とともに高 IgA 血症を呈し、糸球体 IgA 沈着とメサンギウム基質の増加を伴うメサンギウム増殖性腎炎を発症する個体があり、ヒト IgA 腎症の自然発症モデルとして頻用されてきた。しかし、非近交系マウスであるため遺伝的に均一でな

く、発症にばらつきがあることが問題であった。そのため、我々は数百匹におよぶ ddY マウスに経時的腎生検を行い、早期発症群 (20 週～、約 3 割)、晚期発症群 (40 週～、約 3 割) と、未発症群の 3 群に分けられることを見出した。(J Am Soc Nephrol 16:1289-1299, 2005)。さらに、早期発症群と未発症群間で、発症に関わる遺伝子を検索したところ、4 ヶ所の候補領域が見つかり、そのうちの 1 ヶ所はヒト家族性 IgA 腎症患者の責任遺伝子と考えられている IGAN1 に相同する領域であった。以上より、このマウスモデルは IgA 腎症の遺伝子制御の面でも、ヒトと類似しており、IgA 腎症モデルとしての強力なツールになると考えられる。その後、我々はこの早期発症群のみを 20 代以上交配し、ほぼ 100%の割合で IgA 腎症を発症する、「Grouped ddY マウス」モデルの確立に成功した。

さらに我々は、ddY マウスの骨髄を他系統の正常マウスに骨髄移植 (BMT) することにより IgA 腎症を再構成できることを確認した (Kidney Int. 2007; 72: 319-27)。

他方、レクチン経路や、MBL と感染症に関する研究がこれまで数多く行われている。海外では重症感染症に対するリコンビナント MBL 静注療法の臨床試験も行われている (J Clin Immunol. 2006 ; 26: 465-75)。しかし、慢性腎疾患における Lectin Pathway の研究は、ほとんど検討されていない。

今回の実験で MBL-A および MBL-C のダブルノックアウトマウス (MBLKO) に IgA 腎症を再構成し腎炎が重症化し、さらにヒトでも同様のことが実証されれば、今後、現在免疫疾患で多く使われている生物学的製剤のように、IgA 腎症に対するリコンビナント MBL 補充療法の可能性も考えられる。そしてリコンビナントの MBL は免疫抑制剤とは違い免疫力を低下させることはないと考えられるため、長期に使用しても副作用の少ない薬剤となる可能性があり、この研究から得られる知見は治療面においても重要と考えられる

2. 研究の目的

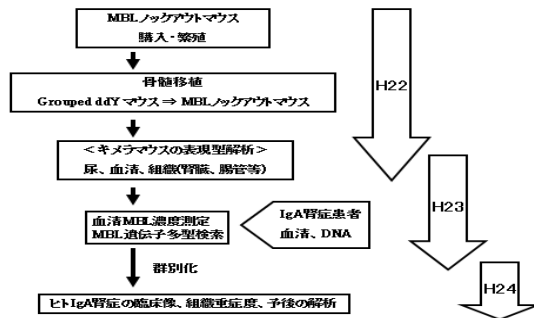
補体 Lectin Pathway の鍵を握る分子である MBL のこの疾患における役割を、gddY と MBLKO を用いて検討する。gddY の骨髄を MBLKO に移植し、MBLKO において IgA 腎症を再構成させ、その表現型を調べ、IgA 腎症における MBL の役割を検討する。本研究は感染症領域で臨床試験が開始されているように、IgA 腎症における MBL 補充療法の開発のための基礎研究と位置づけられる。

3. 研究の方法

下図のように実験を計画した。

平成 22 年・23 年度中に基礎実験として

MBLK0 への骨髄移植とその表現型の解析を行い、平成 23 年度・24 年度にかけてヒト IgA 腎症患者における MBL 欠損者の臨床像の解析を行う予定とした。



4. 研究成果

基礎実験として我々が gddY における補体経路の関与を詳細に検討した。腎臓における各種補体成分の免疫染色を行った結果、このマウスでは IgA・IgG2a がメサンギウム領域に共染色され、さらに MBL-A、-C、C4、C3 および MAC も同様にメサンギウム領域に染色された。このことは、gddY でもヒト IgA 腎症と同様に少なくとも Lectin Pathway が活性化されていることを示唆している。さらに、gddY では C1q も染色されているため、Classical Pathway も同様に活性化している可能性が考えられた。血中多量体 IgA および IgA-IgG 免疫複合体の上昇を認め、これらによる両経路の活性化が腎障害の程度を規定している可能性が考えられた。

次に、IgA の多量体化および免疫複合体形成には IgA の糖鎖異常が重要であると考え、以前報告されていたレクチン ELISA (J Immunol. 1997) を用いて糖鎖不全の程度を検討した。対照として、gddY と同様に commercial ddY マウスから樹立され、IgA 腎症自然発症モデルであり、高血清 IgA であるが腎症は gddY ほど重症ではない HIGA マウス (HIGA) および同じ Th2 型である Balb/c と比較したところ、gddY では糖鎖不全の程度が大きかった。このことより、糖鎖不全の程度が血中多量体 IgA および IgA-IgG 免疫複合体の形成に関係していると考えられた。ヒト IgA 腎症でも糖鎖不全 IgA が血中に存在し、糸球体に沈着していることが確認されているため、今回の実験と類似の機序で、血清中に多量体 IgA および免疫複合体が形成され、補体系を活性化し組織障害を惹起していると考えられる。

この結果を踏まえ、MBLK0 に gddY の骨髄を移植することにより Lectin Pathway の IgA 腎症における役割を解明することを目的に実験を行った。

骨髄移植を行う前段階として、コントロールである Wild Type C57B1/6 マウス (C57B1/6) に対して gddY の骨髄移植を行い、骨髄が置換されていることを確認する作業を行った。

方法としては、骨髄移植は、我々が従来から行っているプロトコル (Kidney Int. 2007) を用いた。骨髄が置換されていることの確認は、末梢血、脾臓および骨髄細胞を用いて、FACS にて C57B1/6 の MHC-Class II 抗原の H2-Db 陽性細胞が、gddY の細胞に置き換わり消失しているかどうかを確認した。

結果としては、従来のプロトコルでは骨髄が置換されていなかった。原因として今まで我々が移植レシピエントとして使用していたマウスは Balb/c であり、今回使用したマウスとは系統が異なるため、放射線感受性の違いによるレシピエントの骨髄破壊が不十分であった可能性が考えられた。そのため、様々な線量をマウスに照射したところ、C57B1/6 は Balb/c と比較し放射線感受性が低いことが判明した。この結果を受け、再度骨髄移植を行ったところ、レシピエントの骨髄は gddY の骨髄に置換されていることが確認できた。

骨髄移植を確実にできる方法が確立したので、実際に MBLK0 を用い gddY の骨髄を移植した。報告段階では、移植後の経過を観察している。

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 1 件)

Determination of severity of murine IgA nephropathy by glomerular complement activation by aberrantly glycosylated IgA and immune complexes.

Hashimoto A, Suzuki Y, Suzuki H, Ohsawa I, Brown R, Hall S, Tanaka Y, Novak J, Ohi H, Tomino Y.

Am J Pathol. 2012 Oct;181(4):1338-47.

〔学会発表〕(計 3 件)

IgA 腎症における補体系関与の検討 ～IgA 腎症自然発症モデルを用いて～

橋本 梓、鈴木 佑介、鈴木 仁、大沢 勲、大井 洋之、堀越 哲、富野 康日己

第 54 回日本腎臓学会学術総会、2010 年 6 月 神戸

IgA 腎症における補体系関与の検討 ～IgA 腎症自然発症モデルを用いて～

橋本 梓、鈴木 佑介、鈴木 仁、大沢 勲、大井 洋之、堀越 哲、富野 康日己 第 34 回 IgA 腎症研究会 2011 年 1 月 東京

Both Lectin and Classical Complement Pathways Determine the Severity of Murine IgA Nephropathy.

橋本 梓、鈴木 佑介、富野 康日己

アメリカ腎臓学会 Kidney Week 2011、2011
年 11 月 アメリカ フィラデルフィア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 裕一 (Yuichi Tanaka)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：10420837

研究協力者

富野 康日己 (Yasuhiko Tomino)

順天堂大学・医学部・教授

鈴木 佑介 (Yusuke Suzuki)

順天堂大学・医学部・准教授

鈴木 仁 (Hitoshi Suzuki)

順天堂大学・医学部・助教