

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790859

研究課題名(和文) IgA腎症特異治療にむけたブタIgA腎症モデルの開発

研究課題名(英文) Development of porcine model to establish the specific treatment for IgA nephropathy

研究代表者

梶山 忠弘 (Tadahiro, Kajiyama)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40621941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：IgA腎症の病因に扁桃を中心とした粘膜免疫の異常が示唆されているが、これまで扁桃を有する適切なIgA腎症のモデル動物が存在しなかった。以前に豚がヒトIgA腎症に類似した腎病変を呈することが報告されており、また、豚が扁桃を有することから、今回モデル動物として豚に着目した。マイクロミニピッグを用いた予備実験でヒトIgA腎症に類似した腎組織像を呈することを確認後、自然経過群と扁桃摘出(扁桃摘)群に分け継時的に腎生検を行い、腎組織を中心とした表現型の比較を開始した。月齢8ヶ月の時点で、扁桃摘群でIgAを含む免疫グロブリンの沈着強度低下の可能性が示唆された。今後継続して腎組織を中心とした表現型の比較を行う。

研究成果の概要(英文)：Though immunological disorders in mucosa with a focus on tonsils are suggested to be involved in the pathogenesis of human IgA nephropathy (IgAN), there are no appropriate animal models bearing tonsils. Since it was reported that porcine develop spontaneous renal lesions resembling human IgAN in addition to bearing tonsils, we focused on porcine as a novel animal models of IgAN. After we confirmed that micro-minipigs (MMPs) develop spontaneous renal lesions resembling human IgAN as well as other types of porcine, we started to compare the phenotype containing renal lesions between MMPs in the natural course group (natural course G) and those in the tonsillectomy group (tonsillectomy G). Immunofluorescence stainings indicated that the intensity of glomerular deposition of immunoglobulin containing IgA in MMPs of tonsillectomy G may be lower than that of natural course G at eight months old. Now we are continuing the comparison of phenotype with a focus on renal lesions.

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：IgA腎症モデル豚 口蓋扁桃摘出術 腎生検 APRIL

1. 研究開始当初の背景

(1) IgA 腎症患者の多くは扁桃炎を始めとする上気道炎後に尿所見が増悪することから、IgA 腎症の病因に扁桃を中心とした粘膜免疫の異常が示唆されている。事実、扁桃摘出術(扁桃摘)が IgA 腎症の長期予後を改善させるという報告があり、近年本邦では IgA 腎症の根治治療として扁桃摘出+ステロイドパルス療法(扁桃摘パルス)が行われ、良好な治療成績が示されている(*Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 1923-1931, *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 1301-1307)。しかし、その理論的根拠は明らかにされていない。

(2)我々が近年確立した IgA 腎症自然発症型 ddY マウスモデル “grouped ddY mouse” (*J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:1289-1299, *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23:1364-1374)を用いた検討により、粘膜での免疫異常が IgA 腎症の病因に深く関与していることが示唆されている。しかし、げっ歯類は扁桃を有さないため、これまで扁桃への免疫学的アプローチによる病態検証は困難であった。

(3)家畜豚のほぼ全例がヒト IgA 腎症に極めて類似した腎病変を伴うことが報告されていたが(*Nihon Jinzo Gakkai shi* 1991; 33(2): 179-189)、豚は実験動物としては体格が大きいこともありその後詳細な検討はなされていなかった。近年、体重が 10 kgに満たないマイクロミニピッグが開発され、循環器や移植、再生医療などの分野でモデル動物として注目されている。また、ブタは遺伝子解読がすでに完了しており、抗体等の各種研究ツールも存在している。

(4) 我々の予備研究でも、マイクロミニピッグの腎系球体に IgA と IgG の沈着を伴うメサンギウム細胞・基質の増殖性変化と蛋白尿を認めており、IgA 腎症自然発症モデルとなる可能性が強く示唆される。

(5) 近年 B 細胞の分化・延命に関与するサイトカインである APRIL(a proliferation inducing-ligand)が、ヒト IgA 腎症の病因に関与している可能性を示唆する報告がでてきている。IgA 腎症患者は健常者と比較し血清 APRIL が高値であり、血清 APRIL の値が尿蛋白量と相関すると報告されている(*J Clin Invest* 2011;121:3991-4002)。また、GWAS により IgA 腎症の疾患感受性遺伝子領域として APRIL が明らかにされている

(*Nat Genet.* 2012;44(2):178-182)。しかし、IgA 腎症患者において、APRIL の産生部位や産生細胞、病因との詳細な関連は明らかにされていない。我々はこれまでの予備実験で、IgA 腎症患者口蓋扁桃において APRIL と、そのレセプターである TACI (transmembrane activator and CAML interactor protein)、BCMC (B cell maturation antigen)の発現が亢進していることを確認している。

2. 研究の目的

ブタは口蓋扁桃を有し、遺伝子改変も可能なことから、IgA 腎症の発症・進展における口蓋扁桃関与の検証、扁桃細胞を用いた細胞分子レベルでの免疫学的解析、さらには特異的な分子標的治療への強力なツールになると考え、IgA 腎症ブタモデルを確立することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

我々はヒト IgA 腎症様の腎組織を呈することを既に確認しているマイクロミニピッグを、口蓋扁桃摘出術(扁桃摘)を行う群と自然経過群に分け、継時的に腎生検を行い腎組織の表現型の比較に加え、尿所見(尿蛋白、尿潜血反応)、血清免疫グロブリン、腎および口蓋扁桃の病理組織所見などを継時的に観察し比較検討することとした。また、口蓋扁桃で、B 細胞、T 細胞および樹状細胞(dendritic cell: DC)など各種免疫担当細胞や、APRIL や BAFF(B cell activating factor)など B 細胞の分化・延命に関わるサイトカインの免疫染色を行い、分布や発現量を比較する。さらに血清 IgA の質量解析など、生化学的解析を行うこととした。

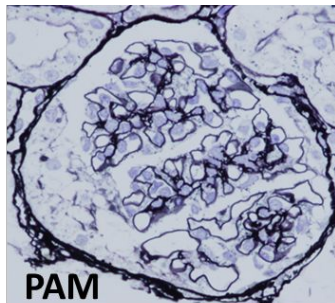
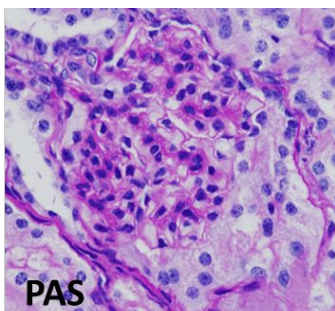
4. 研究成果

始めに他施設との予備研究で、マイクロミニピッグを含む数種類の豚を検証し、その大部分の豚がヒト IgA 腎症に極めて類似した腎病変を伴っていることを確認した。ある種の豚では、月齢 1.5 カ月の時点で既に IgA および IgG の沈着を伴うメサンギウム細胞・基質の増殖性変化が出現し、月齢を追うごとに腎病変が進行していることを確認した。また、ある種の豚は、SPF 飼育環境下に比べ、コンベンショナル飼育環境下で腎系球体の病変がより進行し、血清 IgA が高値となる傾向にあり、外来抗原が腎病変に関与していることが示唆された。以上より豚が IgA 腎症のモデル動物として有用であると考え、マイクロミニピッグの詳細な解析を開始した。

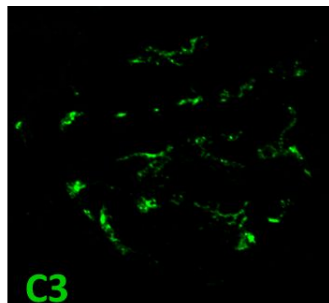
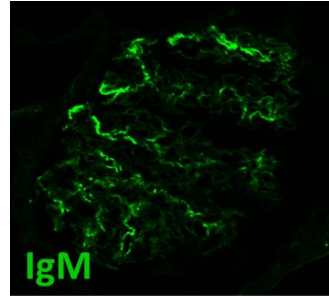
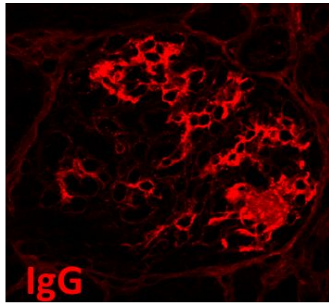
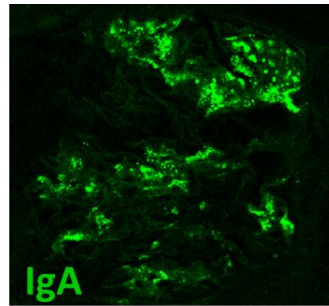
マイクロミニピッグを自然経過群 4 匹、月齢 4 ヶ月の時点で扁摘を行う群 3 匹の 2 群に分け、継時的に腎生検を行った。月齢 4 ヶ月の時点で、両群に IgA、IgG および C3 の沈着を伴うメサンギウム細胞・基質の増殖性変化に加え、電子顕微鏡でメサンギウム領域に高電子密度沈着物を確認し、一部の個体では既に尿蛋白が陽性であった。扁摘群は、月齢 4 ヶ月の時点で扁摘を施行した。術直後食事摂取量の低下を認めたがその後回復し、体重推移にも異常は認めず、自然経過群と差異はなかった。月齢 8 ヶ月の腎生検標本上、自然経過群と比較し扁摘群において免疫染色で IgA や IgG、C3 の沈着強度とメサンギウム増殖性変化がやや低下している可能性が示唆されたが、今後経過を見て判断する必要があると考える。また、尿所見については、扁摘群で腎生検直後一部の個体で尿蛋白と尿潜血を認めたが、その後両者ともに陰性で経過し、自然経過群と差は認めていない。

今後、月齢 12 ヶ月での屠殺後の腎組織を中心に比較検討する予定である。また、両群間での血清 IgA の推移や、IgA の糖鎖解析、さらにはヒト IgA 腎症と同様に IgA を含む免疫複合体形成の有無の検証を行う。また、これまでヒト口蓋扁桃を用いた予備実験での検証と同様、APRIL、BAFF やそれらのレセプターの発現を免疫染色などで解析する予定である。

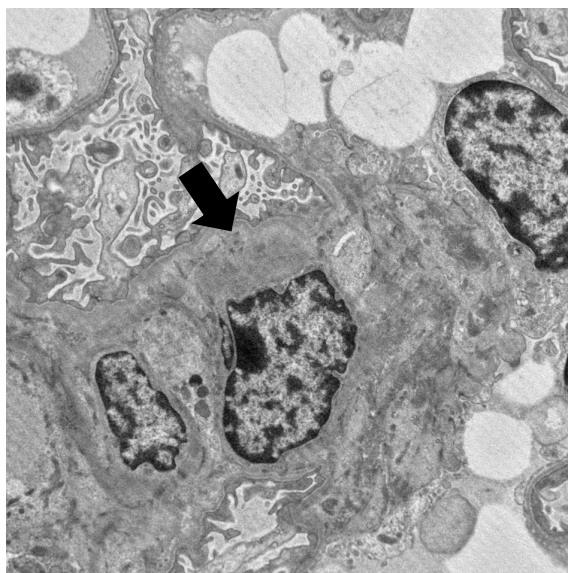
マイクロミニピッグ月齢 4 ヶ月齢(自然経過群) 腎組織 (光顕)



マイクロミニピッグ月齢 4 ヶ月齢(自然経過群) 腎組織 (IF)



マイクロミニピッグ月齢 4 ヶ月齢(自然経過群) 腎組織 (電子顕微鏡)
矢印: paramesangial deposit



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)

[その他]

IgA 腎症研究会研究助成

平成 26 年 1 月 25 日

(平成 27 年 1 月 24 日 IgA 腎症研究会で発表予定)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶山忠弘(KAJIYAMA, Tadahiro)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号: 40621941

(2) 研究協力者

鈴木祐介(SUZUKI, Yusuke)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 70372935

武藤正浩(MUTO, Masahiro)

順天堂大学・医学部・大学院生

研究者番号: なし