

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460451

研究課題名(和文) IgA腎症の扁桃病変におけるIgA産生B細胞の発生機序

研究課題名(英文) Mechanisms of IgA producing B cell production in tonsillar lesions with IgA nephropathy

研究代表者

山川 光徳 (YAMAKAWA, Mitsunori)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：20183676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：IgA腎症患者の扁桃組織のリンパ濾胞に存在する濾胞樹状細胞にthymic stromal lymphopoietin (TSLP)とそのレセプター (TSRPR)が発現されており、transforming growth factor- β 1、B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family、a proliferation-inducing ligandおよびactivation-induced cytidine deaminaseと協調しつつTSLP-TSLPRの作用がIgAクラススイッチを促進することを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The present study firstly demonstrated that tonsillar follicular dendritic cells of IgA nephropathy patients express thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and its receptor, and the TSLP-TSLPR interaction promotes IgA class switching through the cooperative role of transforming growth factor- β 1, B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family, a proliferation-inducing ligand and activation-induced cytidine deaminase.

研究分野：人体病理学

キーワード：IgA腎症 扁桃組織 胚中心 濾胞樹状細胞 IgA TSLP AID

1. 研究開始当初の背景

(1) IgA 腎症の疫学：IgA 腎症は腎糸球体に IgA が沈着する慢性糸球体腎炎で、日本における慢性糸球体腎炎の原因として最多であり(40%以上が IgA 腎症を原因としている)、難治性疾患克服研究事業の対象疾患とされている。さらに予後において比較的不良群(5年~20年以内に透析療法に移行する可能性があるもの)や予後不良群(5年以内に透析療法に移行する可能性があるもの)では、透析療法を必要とする可能性が高い疾患である。

(2) IgA 腎症の治療法：IgA 腎症の治療法の一つとして扁桃摘出術があるが、その有効性には未だに議論がある。その原因は、IgA 腎症と扁桃病変の関連性についての解明がほとんど進んでいないことによる。

(3) T 細胞依存性・非依存性クラススイッチを介した IgA 産生 B 細胞の発生には種々の因子が複雑に関与する。消化管リンパ組織では、上皮細胞から分泌されて樹状細胞を活性化する thymic stromal lymphopoietin (TSLP)、樹状細胞あるいは T 細胞から分泌される nitric oxide、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)、interleukin (IL)-5、IL-6、IL-10、B cell-activating factor of the TNF family (BAFF)、a proliferation-inducing ligand (APRIL)、retinoic acid、そして B 細胞上の TGF- β receptor、transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI)などが関与するとされている (Cerutti A, 2008; Tezuka H & Ohteki T, 2010)。

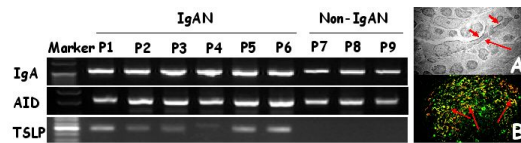
2. 研究の目的

本研究では、IgA 腎症の扁桃内リンパ濾胞における IgA 産生 B 細胞の発生機序を、特に濾胞樹状細胞、濾胞ヘルパー T 細胞と TSLP に注目して解明し、IgA 腎症におけ

る扁桃病変の役割を明確にする。

3. 研究の方法

(1) IgA 腎症の扁桃胚中心における TSLP の発現：既に、我々は、非 IgA 腎症の扁桃内リンパ濾胞で発現しない TSLP が、IgA 腎症のリンパ濾胞でほぼ特異的に発現することを polymerase chain reaction (PCR)法、免疫二重染色や免疫電顕で確認していた(下図)。



PCR 法(左図)：非 IgA 腎症の扁桃リンパ濾胞(実体顕微鏡下でくり抜いたもの)では TSLP の発現がみられないが、IgA 腎症のリンパ濾胞で特異的に TSLP が発現する。IgA と AID の発現には有意な差はない。(右 A 図) TSLP の免疫電顕で、濾胞樹状細胞の表面に発現がみられる。(右 B 図) TSLP と濾胞樹状細胞マーカーである CD23 の蛍光二重染色で、矢印は二重陽性の細胞を示す。

この所見は本研究の開始にあたって最重要項目であるので、さらに多数の症例で検討してこれを確定させる。加えて、摘出扁桃組織を用いた *in situ* hybridization (ISH)法で、さらに実体顕微鏡下で新鮮標本からくり抜いた胚中心組織を用いて enzyme-linked immunoassay (ELISA)法で追加確認する。また、濾胞樹状細胞が TSLP レセプターを発現し、autocrine 機序で多量の TSLP を産生・分泌している可能性、或は TSLP が TSLP レセプターに結合して存在している可能性があるため、これを免疫染色や分離濾胞樹状細胞を用いて検討する。

(2) 胚中心 B 細胞における activation-induced cytidine deaminase (AID)および switch circle mRNA ($I\alpha$ - $C\mu$) の発現の検討：AID と switch circle mRNA

($I\alpha-C\mu$)が細胞内に発現されていることを確認できれば、IgA 産生細胞であることを証明できる (Cerutti A, 2008)。このことを利用して、非 IgA 腎症と IgA 腎症における胚中心内 B 細胞における発現細胞の有無とその程度を、免疫染色、ISH 法、PCR 法で明らかにする。

(3) 扁桃胚中心内におけるサイトカインなどの発現: IgA 産生 B 細胞の発生には、TSLP 以外にも種々の因子が複雑に関与する。濾胞樹状細胞などから分泌されると推測される TGF- β 1、IL-5、IL-6、IL-10、BAFF、APRIL について、摘出組織を用いて免疫二重染色、ISH 法、PCR 法で検討する (Wada ら, 2009)。

(4) リンパ濾胞内から分離した濾胞樹状細胞、胚中心内樹状細胞、濾胞ヘルパー細胞と B 細胞におけるサイトカイン産生能の解析: 実体顕微鏡下で、新鮮扁桃摘出組織の胚中心をくり抜き、これらにおける TGF- β 1、IL-5、IL-6、IL-10、BAFF、APRIL の量について ELISA 法で測定し、非 IgA 腎症と IgA 腎症で比較検討する。

(5) 血清中 TSLP 値の検討: IgA 腎症の扁桃では、TSLP が key role を担っている可能性が予想される。非 IgA 腎症と IgA 腎症の患者血清中のそれぞれの量の比較検討を ELISA 法で行う。

4. 研究成果

(1) 免疫染色の結果、IgA 腎症の扁桃組織では IgA の過剰産生を生じており、非 IgA 腎症に比べて、TSLP、TSLPR、AID、TGF- β 1、BAFF および APRIL の発現増強があり、IgA 発現と TSLP 発現の間に正の相関性が確認された。同様に、扁桃胚中心から分離した濾胞樹状細胞関連クラスターでも、非 IgA 腎症に比べて、IgA 腎症では AID、TGF- β 1 および BAFF の高発現が確認された。これらの結果は、IgA 腎症の扁桃組織における IgA 産生関

連因子の過剰発現を示している。

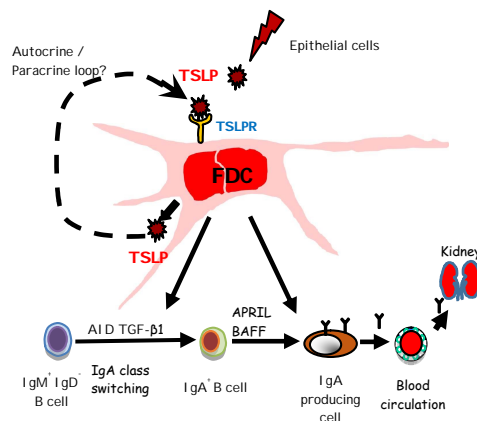
(2) 免疫二重染色、ISH 法および免疫電顕で濾胞樹状細胞での TSLP と TRLPR の発現を確認した。

(3) IgA 腎症の扁桃組織から分離した胚中心で IgA 産生関連因子を real time-PCR 法で検討した結果、IgA 産生に必須である AID と $I\alpha-C\mu$ の mRNA の発現を確認した。さらに、非 IgA 腎症に比べて、IgA 腎症では TSLP、TRLPR、AID、TGF- β 1 mRNA の発現量が増加していた。蛋白に加えて mRNA レベルでも、IgA 産生に関わる因子の過剰発現が確認された。

(4) 扁桃胚中心から分離した濾胞樹状細胞関連クラスターを TSLP で刺激すると、IgA 産生が増強され、抗 TSLP 抗体の添加で減少した。

(5) 非 IgA 腎症に比べて IgA 腎症の患者では、血清中 TSLP 値が有意に高値であった。

(6) 以上、本研究では、IgA 腎症患者の扁桃組織における濾胞樹状細胞に TSLP と TSLPR が発現していることを世界で初めて明らかにした。このことは、濾胞樹状細胞上における TSLP と TSLPR の相互作用が、胚中心 B 細胞における IgA 産生を促進していることを示唆している (下図)。



さらには、TSLPR に対する拮抗薬が開発されれば IgA 腎症に対する有効な治療薬になる可能性がある。また、IgA 腎症患者では、血清中 IgA や TSLP が高値であることから、

病勢のモニタリングや扁桃摘出の適否判定の因子になる可能性がある。

引用文献

Cerutti A. The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol* 8(6):421-434, 2008

Wada K, Maeda K, Tajima K, Kato T, Kobata T, Yamakawa M. Expression of BAFF-R and TACI in reactive lymphoid tissues and B-cell lymphomas. *Histopathology* 54(2):221-232, 2009

Tezuka H1, Ohteki T. Regulation of intestinal homeostasis by dendritic cells. *Immunol Rev* 234(1):247-258, 2010

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 32 件）うち査読付論文 計（32）件

Aung NY, Ohe R, Meng H, Kabasawa T, Yang S, Kato T, Yamakawa M. Specific neuropilins expression in alveolar macrophages among tissue-specific macrophages. *PLoS One*, 査読有, 11 巻, 2016, e0147358, 掲載論文の DOI: 10.1371/journal.pone.0147358

Ohe R, Aung NY, Meng H, Kabasawa T, Suto A, Tamazawa N, Yang S, Kato T, Yamakawa M. Localization of collagen modifying enzymes on fibroblastic reticular cells and follicular dendritic cells in non-neoplastic and neoplastic lymphoid tissues. *Leuk Lymphoma*, 査読有, 2016, (in press), 掲載論文の DOI: 10.3109/10428194.2015.1107907

Meng H, Li H, Ohe R, Naing YA, Yang S, Kabasawa T, Kato T, Osakabe M, Ohtake H, Ishida A, Lu J, Zhang L, Ohta N, Kakehata S, Joh K, Shi Q, Jin X, Geng J, Yamakawa M. Thymic stromal

lymphopoietin in tonsillar follicular dendritic cells correlates with elevated serum immunoglobulin A titer by promoting tonsillar immunoglobulin A class switching in immunoglobulin A nephropathy. *Transl Res*, 査読有, 2016, (in press), 掲載論文の DOI: 10.1016/j.trsl.2016.04.008

Meng HX, Ohe R, Li HN, Yang SR, Kabasawa T, Kato T, Zhang L, Ohtake H, Ishida A, Ohta N, Jin XM, Kakehata S, Yamakawa M. Immunoglobulin and CD8⁺ T-cell distribution in histologically distinctive tonsils of individuals with tonsillar focal infection. *Acta Otolaryngol*, 査読有, 135 巻, 2015, 264-270, 掲載論文の DOI: 10.3109/00016489.2014.96880

Meng HX, Li HN, Geng JS, Ohe R, Yu XY, E XQ, Ye F, Yang SR, Kato T, Zhang L, Ishida A, Ohta N, Jin XM, Kakehata S, Geng JS, Yamakawa M. Decreased expression of follicular dendritic cell-secreted protein correlates with increased immunoglobulin A production in the tonsils of individuals with immunoglobulin A nephropathy. *Transl Res*, 査読有, 166 巻, 2015, 281-291, 掲載論文の DOI: 10.1016/j.trsl.2015.04.004

Meng H, Zhang L, E X, Ye F, Li H, Han C, Yamakawa M, Jin X. Application of Oxford classification, and overexpression of transforming growth factor- β 1 and immunoglobulins in immunoglobulin A nephropathy: correlation with World Health Organization classification of immunoglobulin A nephropathy in a Chinese patient cohort. *Transl Res*, 査読有, 163 巻, 2014, 8-18, 掲載論文の DOI: 10.1016/j.trsl.2013.06.007

Narumi M, Kashiwagi Y, Namba H, Ohe

R, Yamakawa M, Yamashita H. Contribution of corneal neovascularization to dendritic cell migration into the central area during human corneal infection. PLoS One. 査読有, 9 巻, 2014, e109859, 掲載論文の DOI: 10.1371/journal.pone.0109859

〔学会発表〕 (計41件) うち招待講演 計(7)件

山川光徳. リンパ節の正常構造と機能. 第55回日本リンパ網内系学会総会. 2015年7月11日. 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

山川光徳. 樹状細胞腫瘍の病理. 第60回日本病理学会秋期特別総会. 2014年11月21日. 国立劇場おきなわ(沖縄県浦添市)

孟宏学, Naing Ye Aung, 樺澤崇允, 梁秀蘭, 大江倫太郎, 加藤智也, 刑部光正, 大竹浩也, 石田晃弘, 欠畑誠治, 城謙輔, 山川光徳. IgA腎症患者の扁桃組織におけるIgA class switchingの制御機構の解析. 第103回日本病理学会総会. 2014年4月25日. 広島国際会議場(広島県広島市)

孟宏学, 大江倫太郎, ナイン・イエイ・アウン, 樺澤崇允, 梁秀蘭, 加藤智也, 大竹浩也, 石田晃弘, 太田伸男, 欠畑誠治, 城謙輔, 山川光徳. Overexpression of thymic stromal lymphopoietin in tonsillar follicular dendritic cells: Correlation with elevated IgA production in tonsils with IgA nephropathy. 第54回日本リンパ網内系学会総会. 2014年6月21日. 山形国際ホテル(山形県山形市)

〔図書〕 (計10件)

山川光徳. 西村書店. ルービン・カラー基本病理学. 2015. 総ページ数 17

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山川 光徳 (YAMAKAWA Mitsunori)

山形大学医学部・教授

研究者番号: 20183676

(2) 研究協力者

孟 宏学 (MENG Hongxue)