

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462678

研究課題名(和文) IgA腎症口蓋扁桃におけるBcl-2過剰発現と糖鎖不全IgA産生の関係について

研究課題名(英文) The significance of bcl-2 in production of galactose-deficient IgA1 in IgA nephropathy

研究代表者

須長 寛 (SUNAGA, HIROSI)

福井大学・医学部・特別研究員

研究者番号：30362049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口蓋扁桃サンプルを用いた検討の結果、IgA腎症の患者の口蓋扁桃の単核球におけるbcl-2の発現が著明に増加していた。また末梢血単核球においてもbcl-2の発現が著明に増加していることも明らかにした。これらの結果より糖鎖不全IgAの産生にはbcl-2が関与している可能性が示唆された。LPS、HP抗原で刺激をした末梢血単核球においてIgA産生が誘導されたがbcl-2を抑制しても糖鎖不全IgAの産生抑制は認められなかった。しかしながらbcl-2がIgA腎症の病態形成に関与する可能性は高く、bcl-2の補体産生誘導などのメカニズムも考えられ今後更なる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that the level of bcl-2 was significantly increased in tonsil mononuclear cells from the patients with IgA nephropathy compare to control sample. In peripheral mononuclear cells, the level of bcl-2 was also increased, significantly. Since galactose-deficient IgA1 is involved in pathogenesis of IgA nephropathy, our results suggest that bcl-2 might play pivotal role in production of galactose-deficient IgA1. We therefore study the influences of bcl-2 on production of galactose-deficient IgA1. Stimulation of lipopolysaccharide (LPS) or H. Parainfluenzae (HP antigen) on peripheral mononuclear cells induce up-regulation of galactose-deficient IgA1 in supernatant by using ELISA. However, suppression of bcl-2 did not influence the production of galactose-deficient IgA1. Therefore, we could not any correlation between bcl-2 and galactose-deficient IgA1. Further study is required to elucidate the mechanism by which bcl-2 induce IgA nephropathy.

研究分野：IgA腎症

キーワード：IgA腎症 口蓋扁桃 病巣感染症

1. 研究開始当初の背景

年間約 5000 人の IgA 腎症患者が末期腎不全によって透析導入されている。この人数は新規透析導入患者の約 4 分の 1 を占めている。しかし、この疾患の病態は解明されつつあるものの、病因に関しては未だ不明のままである。よって、この疾患が初めて報告されてから約 30 年以上経過する現在でも根治治療はおろか予防策も確立されていない。

IgA 腎症は扁桃病巣感染症の一つと考えられており、IgA 腎症における特異的 IgA の産生には上気道感染が深く関与している可能性が高い。実際に、小児 IgA 腎症症例では口蓋扁桃摘出術とステロイドパルス治療の組み合わせが最も有効な治療法となりつつある。今までに、我々は上気道感染と IgA 腎症について以下のことを見いだしてきた。

1. IgA 腎症患者の咽頭培養では高率にパラインフルエンザ菌が検出される。
2. IgA 腎症の腎組織の免疫化学染色ではパラインフルエンザ菌特異的 IgA が染色される。
3. 扁桃から抽出した単核球を用いて、パラインフルエンザ菌外膜抗原の刺激が特異的な IgA および IL-10、TGF- β の産生を非 IgA 腎症患者の扁桃細胞よりも有意に増加させる。

しかしながら、上気道感染は必ずしもパラインフルエンザ菌の感染のみで生じるものではなく、IgA 腎症の発症および進行には特定の細菌やウイルスに限定されないメカニズムが関与すると考えるべきである。その共通メカニズムの一つとして、Toll-like receptor

(TLR) を介したシグナル伝達機序が考えられた。我々は IgA 腎症患者および非 IgA 腎症患者の口蓋扁桃において TLR の発現を検討した。その結果 IgA 腎症患者の口蓋扁桃では、非 IgA 腎症患者と比べ TLR3 において有意に発現が少なかったが、他の TLR (TLR1,2,4,5,6,7,8,9,10) では有意な差は見られなかった。つまり IgA 腎症患者の口蓋扁桃では総じて外来リガンドの認識機構には異常が生じていないと考えられた。IgA 腎症の口蓋扁桃において病原体認識メカニズムに慢性扁桃炎との差がほとんど認められなかったにもかかわらず、ある特定の細菌が高率に同定されることは、IgA 腎症患者の口蓋扁桃粘膜上で微生物に対する攻撃因子に何らかの異常が生じている可能性が考えられた。上気道粘膜には、病原微生物の侵入・定着を防ぐ目的の抗菌作用を持つペプチドが存在し、その一つが defensin である。IgA 腎症患者と慢性扁桃炎患者の口蓋扁桃組織において -defensin1 ~ 6、-defensin1 ~ 3 の発現に差が無いかを検討した。その結果 IgA 腎症では -defensin2 の発現が少なかったが、IgA 腎症の病因に迫る有意な差ではなかった (投稿中)。

何らかの感染により口蓋扁桃で IgA の産生が惹起されるが、正常ではない IgA、つまり糖鎖不全 IgA の産生が IgA 腎症の重要な病態の一つであることが近年報告されている。上記に述べたように口蓋扁桃の外来リガンドの認識機構や防御機構に異常がないとすると、扁桃における抗体産生機構に何らかの異常が生じていると考えられる。この点に関しては、自己免疫疾患モデルのマウスに Bcl-2 蛋白を過剰発現させると糖鎖不全 IgA が産生さ

れ、IgA 腎症を発症するという注目すべき報告がなされている (Marquina, R. et al.; J Immunol. 2004 :7177-85)。つまり、IgA 腎症の扁桃では、Bcl-2 蛋白によりアポトーシスを回避した B 細胞が異常な IgA を産生している可能性が示唆された。IgA 腎症患者の口蓋扁桃と慢性扁桃炎患者の口蓋扁桃で Bcl-2 蛋白の発現を免疫組織化学染色及び蛋白電気泳動で比較検討した。その結果、IgA 腎症患者の口蓋扁桃では有意に Bcl-2 蛋白の発現が亢進していた。そして IgA 腎症患者の口蓋扁桃の胚中心では単核球のアポトーシスが有意に減少していた。このことから IgA 腎症患者の口蓋扁桃では Bcl-2 を介した単核球のアポトーシ回避が IgA 産生に影響を及ぼしている可能性が示唆された (投稿中)。

IgA 腎症は学校検診の充実した我が国では早期発見がされやすく特に腎臓内科を中心に研究が行われているが、世界的には小児検診が普及していないため早期の症例が少なく、病因にせまる研究はあまりなされていない。特に、病巣感染症という概念が欧米には無く、上気道感染と IgA 腎症の関係についての研究は全く行われていない。早期の症例に積極的に扁桃摘出術が施行される我が国でのみ IgA 腎症の病因に迫る研究が可能であり、ひいては治療法の確立に大いに寄与することができると考えられる。

2 . 研究の目的

I 本研究の目的は、IgA 腎症患者の口蓋扁桃において糖鎖不全 IgA が産生されているかどうかの検討である。よって、まず IgA 腎症患

者の口蓋扁桃単核球における Bcl-2 の過剰発現とその関連蛋白の発現とアポトーシスを検討し、次に口蓋扁桃単核球に bcl-2 を遺伝子導入した場合にアポトーシス及び糖鎖不全 IgA 産生がどのように生じるかを検討する。

3 . 研究の方法

Bcl-2 蛋白を過剰発現させた扁桃リンパ球で実際に細菌感染刺激により糖鎖不全 IgA が産生されるかどうかはいまだ明らかにはされていない。また、IgA 腎症患者の口蓋扁桃では濾胞間組織に存在する T リンパ球にも Bcl-2 の過剰発現が見られており、産生された IgA が濾胞外で修飾を受け糖鎖不全になる可能性も考えられる。これらの点についての解明は、Bcl-2 蛋白を遺伝子導入にて過剰発現させた扁桃単核細胞を細菌外膜抗原で刺激し、糖鎖不全 IgA を抗ヒンジ部抗体を用いて定量し Bcl-2 との関係を検討する。また、IgA 腎症患者の口蓋扁桃をフローサイトメトリーにて単核球をソートし、B リンパ球と T リンパ球における Bcl-2 や細胞周期関連蛋白の発現の違いとアポトーシスの関係を検討する。

4 . 研究成果

当施設における口蓋扁桃摘出サンプルを用いて検討を行った。コントロールには口蓋扁桃肥大症患者の扁桃を用い IgA 腎症患者の扁桃との比較を行った。免疫染色の結果、IgA 腎症の患者の口蓋扁桃の単核球における

bcl-2 の発現が著明に増加していた。これらの結果は口蓋扁桃組織 (whole tissue) を用いた real time PCT, ELAS、western blot にて同様の結果が確認できた。また末梢血単核球においても bcl-2 の発現が著明に増加していることも明らかにした。

これらの結果より糖鎖不全 IgA の産生には bcl-2 が関与している可能性があるとして我々は考えた。

ボランティアから採血を行い末梢血単核球を分離し LPS、HP 抗原で刺激をした。この結果刺激を加えた末梢血単核球の上清において糖鎖不全 IgA 産生を ELISA 法にて確認した。刺激による糖鎖不全 IgA 産生が bcl-2 を介していることを証明するために RNAi vector を用いて末梢血単核球にトランスフェクションし bcl-2 の抑制実験を行った。末梢血単核球において RNAi で bcl-2 の発現が抑制されていることは real time PCR, western blot によって確認をした。

Bcl-2 を RNAi で抑制した細胞では刺激による糖鎖不全 IgA の産生抑制は認められなかった。このことから末梢血単核球において Bcl-2 が直接糖鎖不全 IgA を産生するというデータを得ることはできなかった。しかしながら bcl-2 が IgA 腎症の病態形成に関与する可能性は高く、bcl-2 の補体産生誘導などのメカニズムも考えられ今後更なる検討が必要である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 先天性鼻涙管閉塞症の治療経験

須長 寛、鈴木 弟、後藤礼子

福井県地方部会

地方レベル

口演

福井

2014.03

2. IgA 腎症口蓋扁桃における Bcl-2 の発現について

須長 寛、藤枝重治

第 26 回日本口腔・咽頭科学会

全国レベル

シンポジウム

名古屋

2013.09.

〔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 0 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

須長 寛 (SUNAGA HIROSHI)

福井大学・医学部・特別研究員

研究者番号：30362049

(2)研究分担者

藤枝 重治 (FUJIEDA SHIGEHARU)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：3023859

(3)連携研究者

なし