

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16089

研究課題名(和文)免疫調節物質ガレクチン-9を用いたIgA腎症の病態解明

研究課題名(英文)Clarification of the pathogenesis of IgA nephropathy using the immunomodulator galectin-9

研究代表者

守時 政宏(Moritoki, Masahiro)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40612528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：IgA腎症を自然に発症するマウスに対しガレクチン-9の投与実験を行った。尿蛋白やアルブミン尿、血中尿素窒素、腎組織像について評価したが、対照群と比べて差は認めなかった。CRSPR/Cas9法を用いてガレクチン-9の遺伝子をノックアウトしたマウスの作製に成功した。IgA腎症患者の血中・尿中ガレクチン-9濃度とIgA腎症の重症度や腎機能、治療反応性等との相関関係について明らかにする臨床研究を進めている。また、腎生検を行った他の原疾患の患者についても測定し、解析途中ではあるものの血中・尿中のガレクチン-9の濃度が原疾患によって差を認める可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgA腎症は我が国の慢性糸球体腎炎の中で最も頻度が高く、難病に認定されている。今回行ったIgA腎症自然発症マウスに対するガレクチン-9の投与実験の結果から、ガレクチン-9はIgA腎症に影響を及ぼさない可能性が示唆された。今回の研究で作製に成功したガレクチン-9ノックアウトマウスは他の実験モデルにも応用の可能性を広げるものである。

臨床研究では複数の腎疾患とガレクチン-9濃度の関係について明らかにすることが可能である。本研究により、Gal-9がIgA腎症の疾患活動性や予後予測のマーカー、治療薬候補となり得るかを明らかにし、IgA腎症の病態解明とGal-9の臨床応用につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Galectin-9 was administered to mice that spontaneously develop IgA nephropathy. Urine protein, albuminuria, blood urea nitrogen, and renal histology were evaluated, but no differences were found compared to the control group. CRSPR/Cas9 method was successfully used to generate mice with knockout of the galectin-9 gene. Clinical studies are underway to clarify the correlation between blood and urinary galectin-9 levels in patients with IgA nephropathy and the severity of IgA nephropathy, renal function, and response to treatment. Patients with other primary diseases who underwent renal biopsy were also measured, and during the course of the analysis, it was suggested that blood and urinary galectin-9 concentrations may be different depending on the primary disease.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ガレクチン-9 IgA腎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は国内における慢性糸球体腎炎の中で最も頻度の高い腎炎であり、患者数は3万人を超えると推定されている。20年の経過で約40%が末期腎不全に至る予後不良の疾患で2015年に難病指定された。好発年齢は10~20歳代であり、若くして末期腎不全に至り、腎移植や透析導入となることも少なからずあり、病態の解明と根本的な治療法の開発は急務である。

IgA 腎症の発症機序において、糖鎖異常 IgA1 が重要な役割を果たしている。IgA 腎症患者の腎臓に沈着する IgA は、そのヒンジ部の糖鎖のシアル酸やガラクトースが欠損した糖鎖異常 IgA1 であることが分かっている。しかしながら、IgA 腎症の健康近親者の血清糖鎖異常 IgA1 が高値を示すことや、検尿異常や腎機能障害のない生体腎移植のドナーの移植時の腎生検で、糸球体への IgA の沈着を認めることがあることから、糖鎖異常 IgA1 の存在のみでは IgA 腎症の発症を説明することはできない。IgA 腎症患者では、扁桃腺炎をはじめとする上気道炎や腸管感染症などの後に、一過性の肉眼的血尿や蛋白尿の増悪が見られることから、何らかの抗原感作及び免疫応答が IgA 腎症の病因に関わっているとされている。また、IgA 腎症患者において糖鎖異常 IgA1 に特異的な IgG の増加が確認されており、その自己抗体が IgA 腎症の病勢や予後と相関するとされ、IgA 腎症における自己抗体産生が近年注目されている。さらには、IgA 腎症患者における制御性 T 細胞 (Treg) とヘルパー Th17 細胞 (Th17) のインバランスが指摘されており、B 細胞だけでなく T 細胞の異常も病態にかかわっているとされている。

近年、IgA 腎症に対する治療として、IgA の主な産生場所である扁桃腺の摘出とリンパ組織に存在する糖鎖異常 IgA1 産生細胞を抑制する目的でステロイドパルス療法が多くの施設で行われ良好な成績を上げているが、その詳細な機序はまだ解明されていない。

一方、ガレクチン-9 (Gal-9) は、糖鎖を特異的に認識して結合し、架橋することによって生理活性を発揮するレクチンの一種であり、 α -ガラクトシドに親和性を持つ。Gal-9 は当初、好酸球遊走因子として同定され、その後の研究で様々な生理活性作用が報告されている。その主なものとして、Gal-9 のリガンドである Tim-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain) が陽性のヘルパー T1 細胞 (Th1) や Th17、細胞傷害性 CD8 陽性細胞 (CTL) に対してアポトーシスを誘導することと、ナイーブ T 細胞の Treg への分化を促進することが挙げられる。Gal-9 は、炎症性サイトカイン産生細胞と制御性 T 細胞などの免疫抑制性細胞のバランスを調節することによって、自己免疫状態においては抑制的に、逆に担癌状態などの場合には免疫を賦活する方向に働き、免疫調節物質としての働きを担うことがわかっている。実際、アレルギー性脳脊髄炎や自己免疫性の関節炎のモデルにおいて、Gal-9 の投与によってその症状が改善することが確認されている。腎臓領域においても、半月体形成性腎炎や抗 GBM 抗体型糸球体腎炎モデルの症状を改善することが分かっており、我々も Gal-9 がループス腎炎モデルマウスの形質細胞にアポトーシスを誘導することで抗 ds-DNA 抗体を減少させ、蛋白尿や関節腫脹を改善させることを確認した。前述の様に、IgA 腎症の発症メカニズムにおいて、糖鎖異常 IgA1 及びそれに対する自己抗体、および Treg と Th17 のインバランスが深く関わっており、Gal-9 の自己抗体産生抑制作用や Th17 へのアポトーシス誘導、Treg への分化誘導作用がループス腎炎のみならず、IgA 腎症の病態を改善し得ると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

IgA 腎症患者の扁桃摘出 + ステロイドパルス療法前後で血液及び尿中の Gal-9 濃度を測定し、臨床・組織学的重症度や検尿異常の寛解率、腎機能との関連を明らかにする。次に、当院で行われた IgA 腎症患者に対する扁桃摘出の検体を用いて、扁桃における Gal-9 の発現や Gal-9 が Th1 や Th17 にアポトーシスを誘導するか明らかにする。さらに、IgA 腎症を自然発症するマウスを用いて Gal-9 の効果を検討する。Gal-9 投与により蛋白尿や腎組織像が改善するかどうか明らかにする。

前述のごとく、Gal-9 は過剰免疫や免疫抑制状態を正常な状態へと寄り戻す免疫調節物質として作用することによって病態の改善に働いている。よって、既存のステロイドや免疫抑制剤と比べて免疫抑制に伴う副作用のリスクが極めて少ない物質である。また、現在の IgA 腎症に対する標準的な治療である扁桃摘出によって得られる検体を有効に活用し、その後の定期的なフォローにより、継続的なデータ収集が可能である。我が国における慢性糸球体腎炎の中で、最も頻度の高い IgA 腎症に対する新たなバイオマーカーや治療薬の開発は、IgA 腎症の進行および新規透析導入患者の抑制に寄与し、ひいては患者の QOL の向上、増大し続ける我が国の医療費の削減に貢献すると考えられ、難病対策、医療経済という点においても社会的に大きな意味を持つ研究である。

3. 研究の方法

(1) IgA 腎症患者の血中・尿中 Gal-9 濃度を測定し、IgA 腎症の重症度や寛解率、腎機能との相関関係について検証する。

(2) IgA 腎症患者の摘出扁桃からリンパ球と形質細胞を分離し、Gal-9 添加により Th17 や形質細胞のアポトーシスと Treg への分化誘導を認めるか検証する。

対象患者：平成 28 年 10 月～令和 3 年 3 月の間に当院で腎生検を行う患者で本研究に参加する同意が得られた者。腎生検の結果、IgA 腎症と診断された患者では治療開始半年後と 1 年後にも以下の検体採取を行う。計 100 例（うち IgA 腎症患者 30 例）を予定。

<仮説 1> IgA 腎症患者の血中・尿中 Gal-9 濃度は臨床・組織学的重症度や検尿異常の寛解率、腎機能と相関を示し疾患活動性や治療反応性、腎予後の評価に役立つ。原疾患の種類によって血中・尿中 Gal-9 濃度に差異を認め、糸球体腎炎の鑑別に役立つ。

評価項目

・血液、尿：血清 Gal-9, BUN, Cr, シスタチン C, 血清 IgA, 糖鎖異常 IgA1, 糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG, IgA-IgG 免疫複合体, 尿テストテープ, 尿沈渣, 尿蛋白定量, 尿中 Gal-9, Cr, NAG, 2MG をそれぞれ治療前（腎生検時）に採取。IgA 腎症と診断された場合は、治療開始半年後、1 年後に検体採取。

・腎臓：通常の染色、組織診断に加え Gal-9, マクロファージの免疫染色を行う。

<仮説 2> Gal-9 は IgA 腎症患者から摘出した扁桃の Th17 や形質細胞のアポトーシスを誘導し、Treg への分化を促進する。

・扁桃：CD208 陽性細胞数、陰窩上皮の網状化阻害 (ILES) スコアの病理学的評価に加え、MACS (magnetic activated cell sorting) 法を用いて扁桃から上記免疫細胞を分離し、Gal-9 を加えて培養し、Annexin 染色によるアポトーシスの評価や flow cytometry によるサブセットの変化を確認する。また、抗 Tim-3 抗体を加えて、その効果が Tim-3 依存的吗どうかについても検証する。

(3) IgA 腎症自然発症マウスに対する Gal-9 の投与実験を行いその効果を検証する。

<仮説 3> IgA 腎症動物モデルにおいて、Gal-9 投与群は PBS 群と比較して以下の所見を認める。

・蛋白尿減少、腎組織像の改善、BUN, Cr の改善。

・脾臓中の Th1, Th17, CTL の減少および Treg の増加。

・血中糖鎖異常 IgA1 および糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG, IgA-IgG 免疫複合体の減少。

実験モデル：5 週齢の IgA 腎症自然発症マウスを Gal-9 投与群(N=10)と PBS 投与群(control 群 N=10)に振り分ける。下記の治療の前、治療開始後 2 週間、治療終了時の 3 点で 24 時間蓄尿と採血を行い、治療終了後 sacrifice を行い、腎臓と脾臓を摘出する。

治療：ヒト安定型 Gal-9 をマウス体重 25g あたり 30 μ g を週 3 回、4 週間皮下注射する。

尿, 血清：尿中蛋白, 血清 Cr, BUN, 糖鎖異常 IgA1 とその特異的 IgG, IgA1-IgG 免疫複合体

4. 研究成果

(1, 2) 当大学で腎生検を行う患者の血中・尿中ガレクチン-9 濃度を測定し、IgA 腎症と診断された患者においては、その臨床的・組織学的重症度や腎機能、治療反応性等との相関関係について明らかにする臨床研究を行った。IgA 腎症だけでなく、より広く腎疾患とガレクチン-9 との関係について検討するため、IgA 腎症患者に限らず、腎生検を行う患者に対象を広げている。複数の疾患のガレクチン-9 濃度を網羅的に検討した点で新たな試みといえる。2020 年 3 月末現在、登録症例数は 30 症例を超え、引き続き症例を蓄積していく予定。症例数は十分でなく、解析途

中ではあるが、血中・尿中のガレクチン-9 濃度が原疾患によって差を認める可能性が示唆された。

(3) IgA 腎症自然発症モデルマウスに対しガレクチン-9 を IgA 腎症発症前～早期の段階の 5 週齢から 4 週間投与する実験を行った。尿蛋白やアルブミン尿、尿素窒素、腎組織像について評価したが、コントロール群と比べてそれらに差は認めなかった。これらよりガレクチン-9 は IgA 腎症自然発症マウスにおいて、IgA 腎症の発症進展に影響を及ぼさない可能性が示唆された。また動物実験におけるガレクチン-9 の関与をより詳しく検証するためガレクチン-9 ノックアウトマウスの作製を試み、成功した。CRSPR/Cas9 法を用いて独自に作製したものであり、DNA シーケンスにおける変異や ELISA 法による血中のガレクチン-9 濃度が検出限界以下であることを確認しており、変異に関しては確証を得ている。繁殖に際し、授乳中に母親マウスが高率に死んでしまうことが続いたが、その後安定して繁殖可能となっている。また、本研究で作製されたガレクチン-9 ノックアウトマウスを用いて腎障害モデルや心疾患モデルを作製しガレクチン-9 との関係を明らかにする研究が検討されており、今後のガレクチン-9 の基礎実験の発展・応用に大きく貢献するものと思われる。

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
--	---------------------------	-----------------------	----