

機関番号：22101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成20年度～平成22年度

課題番号：20590960

研究課題名（和文）IgA腎症の発症機序における常在菌、特にブドウ球菌膜性抗原の関与の研究

研究課題名（英文）The role of *S.aureus* bacterial antigen in the pathogenesis of IgA nephritis.

研究代表者 小山 哲夫 (KOYAMA AKIO)

茨城県立医療大学・学長

研究者番号：80111384

研究成果の概要（和文）：

我々は本邦の代表的慢性腎炎の一つである「IgA腎症の発症には、*S.aureus*感染が深く関連する」との仮説に基づき、患者血液中IgA抗体の特徴やT細胞活性化様式について、同細菌膜性抗原との関係から研究した。抗体の研究では、IgA腎症（IgAN群）患者群、MRSA関連腎症（MRSA）患者群、正常（N）群の各血清を対象とした。IgAN患者は、*S.aureus*に対して高抗体価を産生するhigh responder（高反応性）でありながら、かつ産生されるIgAはlow avidity（低親和性）であり、そのことが免疫系を介する抗原物質の除去機構を免れての腎糸球体へのIgA免疫複合体の沈着と持続の要件である可能性が示唆された。T細胞の特徴の研究では、糸球体へのIgA沈着を何れも特徴とする、IgA腎症、紫斑病腎炎、およびMRSA腎炎患者について、3色FACS解析を行い、菌体抗原物質に対する様々なT細胞活性化様式と免疫状態を表すeffector T cellsの活性化状態を解析した。一般抗原が関与する腎炎では、monoclonalなTCRVβ T細胞のexpansionが生じ特異抗体が産生され、対応抗原と結合し、腎炎惹起性の免疫複合体が形成されることが考えられる。一方、*S. aureus*が産生するenterotoxinの如くのスーパー抗原によりT細胞が活性化すると、polyclonalなTCRVβ T細胞がexpansionし、非常に多くのリンパ球が同時に活性化され、腎炎惹起性の免疫複合体が形成され、MRSA感染後腎炎や紫斑病性腎炎が発症すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

IgA nephropathy (IgAN) is the commonest glomerulonephritis in Asia, including Japan, characterized by the predominant deposition of IgA in the glomerulus. But the origin of this IgA and the mechanisms for its deposition remains unknown. In this study, we have shown that excessive production of circulating low-avidity antibodies against *S.aureus* cell envelope antigen in patient with IgAN, which may form immune complexes and accumulate in glomerular mesangial area. The lymphocytes subsets in patient with IgAN was analyzed as well, especially focusing on T cell antigen receptors repertoire using FACScan. These data suggest that immune abnormalities against *S.aureus* bacterial antigen may be involved in the pathogenesis of IgAN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成21年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：IgA腎症、慢性糸球体腎炎、MRSA感染後腎炎、急速進行性糸球体腎炎  
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、ブドウ球菌細胞膜抗原、低親和性IgA抗体、高応答性抗体産生

### 1. 研究開始当初の背景

IgA腎症は世界的に最も高頻度の慢性腎炎であり、発症機序には様々な抗原系の関与が示唆されている。我々はMRSA感染後腎炎を発見し、同腎炎が糸球体にIgAの沈着を伴うIgA腎症類似の腎炎であることを報告した(以後、MRSA腎炎と称する)。研究の過程で、患者由来抗*S. aureus*抗体を用いて糸球体に沈着する抗原を検出し、この抗原がIgA腎症患者の腎生検組織の約60%にも検出されることを発見した。その結果に基づいて作成した抗*S. aureus*モノクローナル抗体を用いても同様な結果を得た。

本抗原の epitope は *S. aureus* の cell envelope antigen の1つである粘膜に接着する分子 (*S. aureus* cell envelope antigen ‘probable adhesin’、ACCESSION AP003131-77, Protein ID; BAB41819.1)であることを明らかにした (Koyamら Staphylococcus aureus cell envelope antigen is a new candidate for the induction of IgA nephropathy. *Kidney International*. 2004 Jul;66(1):121-32.)。そこで、IgAN 患者の抗体の性状と、関連する活性化T細胞の性状の研究を更に進めた。

(1)スーパー抗原による糸球体腎炎・血管炎発症機序に関する研究

1)MRSA 感染後に発症するネフローゼ症候群

および急速進行性腎炎を発見し、腎糸球体にIgA・IgG・C3が沈着し、IgA腎症/紫斑病性腎炎の病像を呈する症例群を経験し、MRSA腎炎と命名した。

2)このMRSA腎炎の発症・進展においては、IgAとIgGの polyclonal activation を来とし、また、末梢血リンパ球の特異なTCRVβ陽性細胞が増加し、さらに、様々なcytokines(Th1 & Th2)が著増し、免疫グロブリンの産生や免疫複合体の形成に重要な役割を演じていることを解明した。

3)この病態にはMRSAの産生する enterotoxin が superantigen として、特に液性抗体の産生の著増を介して、本腎炎の発症に深く関わっていることを報告した。この腎炎はIgA型の免疫複合体を形成し、糸球体腎炎のみならず、紫斑を呈し、血管炎を伴うことを明らかにした。

4)enterotoxin は抗原特異的、非特異的の両機序を介して、抗体産生を促す事が既に明らかとなっている。従って、enterotoxin を含め、様々な市販の *S. aureus* 関連の抗体を用いて、沈着している免疫複合体の抗原を検討したが、特定の抗原を検出同定出来なかった。

(2)球体腎炎・ネフローゼ症候群・血管炎におけるT細胞活性化機序の研究

1)ヒト末梢血リンパ球に in vitro の系で enterotoxin を加えると、特定のTCRVβ細胞が増加し、培養早期にIL-2及びINF-γが増加し、

やや遅れて IL-10 及び TNF が増加することが判明した。また naïve T cell から特定の TCRV β 陽性 memory T cell が増加する事も明らかとなった。

2) 種々のヒト腎疾患において、T cell の活性化機序を末梢血リンパ球の観点からみると、興味あることに、特定の TCRV β 陽性細胞、memory T 細胞、並びに IgA-bearing T 細胞数は、MRSA 腎炎 > IgA腎症 > 正常人の順に増加、活性化することが判明した。

3) また、組織染色の結果、IgA腎症患者の特定の TCRV β 陽性細胞が間質の浸潤細胞中に優位に認められ、IgA腎症の組織傷害に関与しているものと推測された(Nephron 2002、業績23)。膜性腎症ではほぼ正常と同様であり、一方 Th1 型と考えられる pauci immune crescentic glomerulonephritis や顕微鏡的多発動脈炎では逆に末梢血では TCRV β 陽性細胞は正常人より低値であった。また、IgA腎症患者において、末梢血リンパ球における細胞内 cytokine を測定したところ、Th2 優位であった。

(3)ヒトIgA腎症惹起抗原を用いた新しいIgA腎症モデルの構築の研究

1)免疫遺伝学的には Th2 dominant type である Balb/c 系マウスを用いて、B/6 マウス(Th1 dominant type)群および非免疫対照群とともに、*S. aureus* 抗原を種々の方法で免疫し、ヒトIgA腎症モデルとなりうる糸球体腎炎を作成し、*S. aureus* の腎炎惹起抗原としての特性を明らかにした。即ち、Balb/c 系マウスでは、腎に抗原の沈着を伴う IgA の沈着と、軽度のメサンギウム増殖性腎炎像の発症を確認した。一方、B6 mouse には抗原の局在は認められなかった。

2)当該抗原を *E. coli* に発現させ、産生させた fusion proteinを用いて、腎炎を発症させたところ、super 抗原である *S. aureus* 由来 enterotoxin を加えることにより、抗体産生が増強されることが

判明した。

(4)IgA腎症の発症機序における常在菌、特にブドウ球菌膜抗原の関与に関する研究(IgA腎症およびMRSA腎炎患者両血清中の *S. aureus* 膜抗原に対する抗体分析)。

1)患者における抗 *S. aureus* 抗体の測定、ならびに認識抗原のバンドの同定:

(a) protein A をヒト IgG で吸収した抗原(主バンドは35kDa, 17kDa 抗原)を用いてELISAを行った。MRSA 腎炎患者およびIgA腎症患者では有意に高値であることを明らかにした。

(b)患者血清中には35kDa, 17kDa の抗原を認識する抗体が多いことを western blot 法で認めた。

2)IgA腎症患者の血清中の抗 *S. aureus* 抗体価とその性状の検討:

(a) IgA腎症患者血清における抗 *S. aureus* 抗体価は、IgA が沈着していない腎生検施行患者および正常人(腎生検未施行)の両血清に比して、有意に高値であった。

(b) western blot 法を用いた検討では、34kD, 17kD 付近の band が多くのIgA腎症患者において認められたが、IgA が沈着していない腎生検施行患者および正常人(腎生検未施行)の両血清においては認められなかった。それ故、IgA腎症患者においては、34kD, 17kD 付近の band の膜蛋白が腎炎惹起抗原となっている可能性が示唆された。

対するモノクローナル抗体を作成し、7種類の抗体を得た。これらの抗体は主に 34kD の band と 17kD の band を認識した。

(c) 免疫沈降法を用いて沈降させた蛋白をアミノ酸分析法により解析した。確認するために、*S. aureus* gene を組み込んだ λ ZAP II vescter を *E. Coli* に transfection し、IPTG を加え発現させた蛋白を本抗体にて cloning し、その DNA の sequence を解析した。その結果、

*S. aureus* cell envelope antigen

‘probable adhesin’ (ACCESSION AP003131-77, Protein ID; BAB41819.1)と判明した。

(c)本抗体を用いて121例のIgA腎症を染色したところ、65%に対応抗原の沈着を認めた。

一方、IgAの沈着しない腎生検例では全て陰性であった。

4)IgA腎症を含み各種腎炎糸球体における、本抗原とIgA1抗体のco-localizationの研究:

(a) 抗原検出のために、抗*S. aureus*膜抗原モノクローナル抗体、及び抗ヒトIgA1モノクローナル抗体をZenon one mouse IgG1 labeling reagentを用いてラベルした。すなわち、抗原の検出にはAlexa 594-、抗体の検出にはAlexa 488-labeled goat Fab fragments of Fc-specific anti-mouse IgG antibodyをlabelした。Blocking reagentとしては大量のmouse IgGを用いた。これらの抗体で組織を染色した。

(b) Olympus BX51 蛍光顕微鏡 (Alexa 488 は NIBA, Alexa 594 は WIY filter)を用いて撮影し両画像をマージした結果、当実験条件下ではIgA腎症の約60%の症例では抗原は陽性となり、また抗原とIgA1抗体とは、ほぼco-localizationしている事が認められた。

## 2. 研究の目的

ヒトIgA腎症患者におけるIgA抗体の性状をavidityの観点から、また細菌成分抗原物質に対するT細胞活性化様式をT細胞受容体の観点から分析し、腎炎発症における*S. Aureus*の役割とIgA患者の免疫応答様式の特徴を解析する。それらの結果から、*S. Aureus*(またはその菌体成分)はIgA腎症惹起物質候補である事を証明する。

## 3. 研究の方法

(1)抗体および免疫複合体の特徴の研究:

IgA腎症(IgAN)患者群(n=16)、MRSA関連腎症(MRSA)患者群(n=19)、正常(N)群(対照群, n=13)の各血清を、固相化ヒトIgGでProtein Aを吸収した*S. aureus*菌膜抗原をELISA plateに吸着させたwellsに反応後、sodium thiocyanate(0.25 to 3.0M)を用いたdissociation assayの系(MacDonald et al, J Immunol Methods 1988)にて、ELISA法を応用した抗体(抗*S. aureus*抗体:IgG, IgA)のavidity測定法で解析した。

(2)T細胞の特徴の研究:

*S. aureus*はenterotoxinを産生し、enterotoxinがヒトT細胞に対してsuperantigenとして作用することが知られている。そこで、本年度はIgA抗体が腎糸球体に沈着するIgA腎症、紫斑病腎炎およびMRSA腎炎患者について、Fluorescence activated cell sorter (FACS)、特にthree color analysisを用いて、様々なT細胞活性化様式ならびにT細胞を代表とする免疫状態を表すeffector T cellsの活性化状態について解析を行った。

## 4. 研究成果

(1)抗体と免疫複合体の特徴の研究:

1. IgA抗体はIgAN群, MRSA群においてN群に比較して高抗体価であった。2. IgG抗体はMRSA群においてIgAN群, N群に比較して高抗体価であった。3. IgG抗体価, IgA抗体価には3群ともに正相関を認めた。4. IgAにおいては、その抗体価とavidityには相関は見られなかった。5. IgGのavidityは、3群ともほぼ同程度であった。6. 然しながらIgA群のavidityは、MRSA群とN群との比較において、IgAN群では低値であった。7. MRSA群ではIgGの抗体価とavidityには正相関が見られた。8. しかしIgAにおいては、3群間

に関連を認めなかった。

以上より、IgAN 群は IgA の高抗体価を示す high responder かつ low avidity が特徴であった。即ち、IgA 腎症患者は、S.aureus に対して高抗体価を産生する high responder でありながら、かつ産生される IgA は low avidity であり、そのことが免疫系を介する抗原物質の除去機構を免れての腎糸球体への IgA 免疫複合体沈着と持続の要件である可能性が示唆された。

## (2) T細胞の特徴の研究:

糸球体腎炎では、それぞれの病型により、T細胞活性化機序が異なることが判明した。一般抗原が関与する腎炎では、一般に monoclonal な TCRV  $\beta$  T細胞の expansion が生じ、特異抗体が産生され、対応抗原と結合し、腎炎惹起性の免疫複合体が形成されるものと考えられる。

一方、スーパー抗原により T細胞が活性化するのは、polyclonal な TCRV  $\beta$  T細胞が expansion し、非常に多くのリンパ球が活性化され、腎炎惹起性の免疫複合体が形成され、MRSA 感染後腎炎、あるいは紫斑病性腎炎として発症するものと考えられた。

IgA 腎症では、T細胞 subsets では、DR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T細胞が有意に増加し、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞(制御性または活性化T細胞)が有意に増加しており、また、CD45RO<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞が有意に増加した。しかし、T細胞の活性化様式には顕著な変化は認められなかった。その臨床的発症・進展経過から、多くは一般抗原が、一部はスーパー抗原が関与し、大多数の症例では mild で慢性的な抗原刺激により病態を形成すると考えられた

まとめ:

IgA腎症発症の原因抗原としては、細菌やウイルス由来の複数が報告されており、更には常在

菌の関与を示唆する報告もある。候補抗原の *S. aureus* は多くのヒトで粘膜に biofilm を形成し、定着することが知られている。また、本研究により、流血中には抗 *S. aureus* 抗体(IgA, IgG class)が存在し、他の疾患に比して高値であることが判明し、また1/3程度の症例では、少ないながらも有意に IgA2 が沈着していることを考慮すれば、免疫反応による感染防御機構のジレンマ(IgA腎症患者は *S. aureus* に対して high responder であり、抗体は流血中に存在し、粘膜感染などにより、抗原が何らかの機序で粘膜より流血中に入れば、免疫複合体を形成し、腎糸球体へ沈着する可能性がある。)によりIgA腎症は発症すると想像される。本研究により、その可能性が大きい事を強調したい。事実、上気道感染後にIgA腎症患者では肉眼的血尿を呈することが多いことが知られている。近年、扁桃摘出がIgA腎症の進行を防止するとの報告もあり、細菌感染とその免疫機序がIgA腎症の成因に関与している可能性を示唆するものである。*S.Aureus* という日常的な細菌に対する免疫応答の異常が、IgA腎症患者の腎炎発症/進展機序に関係している可能性が強く示唆された。

## 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10件)

- ① Nagai M, Koyama A, et al. Serum levels of BAFF and APRIL in myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated renal vasculitis: association with disease activity. *Nephron Clin Pract* 118: C339-C345, 2011.
- ② Usui J, Koyama A, et al. Methicillin-resistant staphylococcus-aureus-associated glomerulonephritis on the decline: decreased incidence since the 1990s. *Clin Exp Nephrol* 15: 184-186, 2011.
- ③ Hirayama K, Koyama A, et al. Serum ration of soluble triggering receptor

expressed on myeloid cells-1 to creatinine is a useful marker of infectious complications in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated renal vasculitis. Nephrol Dial Transplant 26: 868-874, 2011.

- ④ Shimizu Y, Koyama A, et al. successful pregnancy in a female patient with congenital chloride diarrhea (CLD) and renal impairment. J Nephrol 22: 809-813, 2009.
- ⑤ Koyama A et al. a nationwide survey of rapidly progressive glomerulonephritis in Japan: etiology, prognosis and treatment diversity. Clin Exp Nephrol 13: 633-650, 2009.
- ⑥ Jesmin S, Yamaguchi N et al. the expression of 4 protease-activated receptors is associated with increased levels of TNF-alpha, tissue factor, and fibrin in the frontal cortex of endotoxemic rats. Thrombosis Research 124: 498-501, 2009.
- ⑦ Jesmin S, Yamaguchi N, et al. Protease activated receptor " blocking peptide counteracts endotoxin-induced inflammation and coagulation and ameliorates renal fibrin deposition in a rat model of acute renal failure. Shock 32, 626-632, 2009.
- ⑧ Joh K, Muso E, Shigematsu H, Koyama A, et al. Renal pathology of ANCA-related vasculitis: proposal for standardization of pathological diagnosis in Japan. Clin Exp Nephrol 12: 277-291, 2008.
- ⑨ Hirayama K, Yamagata K, Koyama A, et al. Anti-glomerular basement membrane antibody disease in Japan: part of the nationwide rapidly progressive glomerulonephritis survey in Japan. Clin Exp Nephrol 12: 339-347, 2008.
- ⑩ Hagiwara M, Yamagata K, Koyama A et al. a novel apolipoprotein E mutation, Apo E Tsukuba (Arg114 Cys), in lipoprotein glomerulopathy. Nephrol Dial Transplant 23: 381-384, 2008.

[学会発表] (計3件)

- ① 長井 美穂、小山哲夫ら MPO-ANCA 関連血管炎における B-cell activation factor belonging to the TNF family (BAFF) の検討 第 53 回日本腎臓学会学術総会 平成 22 年 6 月 神戸
- ② 山口直人、小山哲夫ら PAR2 拮抗薬は L

P S 誘発性腎不全モデルにて炎症、血液凝固、エンドセリンの 3 系統の亢進を同時に抑制する 第 52 回日本腎臓学会学術総会 平成 21 年 6 月 横浜

- ③ 山口直人、小山哲夫ら L P S 誘発性腎不全ラットモデルにおける血管作動性物質の腎組織内における経時的発現 第 51 回日本腎臓学会学術総会 平成 20 年 6 月 福岡

[図書] (計3件)

- ① 山口直人、鹿野直人、小山哲夫 コメデイカルのための C K D 慢性腎臓病療養指導マニュアル 南江堂 2010 年
- ② 山口直人、小山哲夫 医学書院医学大辞典第 2 版 腎臓責任編集 医学書院 2009
- ③ 山口直人、小山哲夫 血尿 病気と薬 南山堂 2008 年

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小山 哲夫 (KOYAMA AKIO)  
茨城県立医療大学・学長  
研究者番号: 80111384

### (2) 研究分担者

山口 直人 (YAMAGUCHI NAOTO)  
茨城県立医療大学・大学院保健医療科学研究科・教授  
研究者番号: 40239900