

機関番号： 32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590963

研究課題名（和文） I g A 腎症の発症と進展における樹状細胞の役割

研究課題名（英文） Potential roles of dendritic cells in murine IgA nephropathy

研究代表者

鈴木 祐介（SUZUKI YUSUKE）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70372935

研究成果の概要（和文）：マウス IgA 腎症では、それぞれ粘膜上の DC と B 細胞の TLR9 を介した活性化が血清中の IgA や IgA-IgG 免疫複合体の組成の変化、腎組織でのマクロファージのサブセットの変化などの違いをもたらし、異なったタイプの腎組織障害を誘導する。

研究成果の概要（英文）：The present study demonstrated that mucosal activation of TLR9 on B cells and DC had different contributions to the progression of murine IgAN, presumably via formation of nephritogenic IgA and IgA-IgG IC, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究代表者の研究分野：腎臓内科学（IgA 腎症）、免疫学

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、樹状細胞、粘膜免疫、ddY マウス、TLR9、CD11c

1. 研究開始当初の背景

長年我々は、IgA 腎症の病因を免疫学的側面からアプローチしてきた。IgA 腎症自然発症モデルマウスである ddY マウスに抗 CD4 抗体を投与することにより、糸球体 IgA 沈着が改善することを報告し、糸球体 IgA 腎症にヘルパー T 細胞（Th）が強く関与している可能性を他に先駆けて明らかにした（*Am J Nephrol*, 1994;14:136-141）。また、GATA3 を遺伝子導入させることで Th2 に偏向させたマウスに経口（粘膜）による抗原感作をするとメサンギウム増殖性変化を伴う糸球体 IgA・C3 沈着を誘導し、血清中の抗原特異的 IgA 抗体が上昇することを明らかにした（投

稿中）。本症の原因として糖鎖不全 IgA1 の関与が報告されているが、我々のグループでは Th2 サイトカインである IL-4 が Core1 (β 1,3galactosyl transferase) とその分子シャペロン Cosmc の活性を低下させることにより、B 細胞からの糖鎖不全 IgA1 の産生を増加させることも報告している（投稿中）。他の研究者の報告も含め IgA 腎症では、Th の極性異常が発症・進展に深く関与していると理解されている。しかし、この Th の極性や、それに関連した B 細胞の抗体産生を制御するメカニズムは全く分かっていない。一方、多くの IgA 腎症患者では、扁桃炎をはじめとする上気道炎や腸管感染症のあとに一過性の

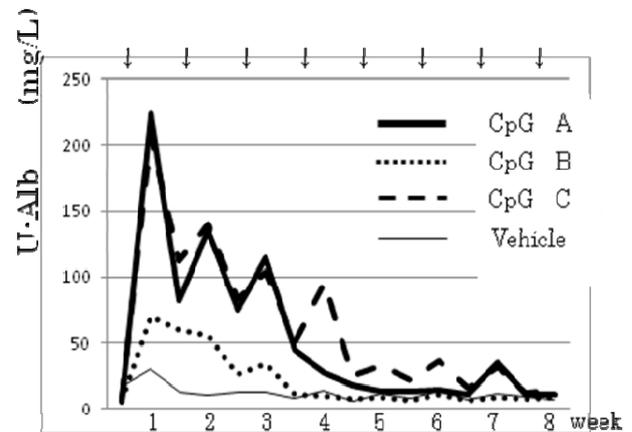
血尿や蛋白尿の増悪を認めることから、IgA腎症の病因には粘膜免疫の異常も議論されている。事実、扁桃摘出術がこの疾患の長期予後を改善させるとする報告が相次いでいる。さらに、我々のグループは、IgA腎症発症モデルマウスの骨髄を正常マウスに移植することで、IgA腎症が再構築できることを確認した (*Kidney Int*,2007;72:319-327)。また、自然免疫において重要な働きをする Toll like receptor (TLR) のうち、TLR9のリガンドである CpG DNA モチーフで気道粘膜を刺激することで、マウス IgA腎症を急性増悪させうることを確認している。これらのことは、粘膜で異常に priming された腎炎発症に関わる責任細胞 (免疫記憶細胞を含む) が骨髄に播種、貯蔵されており、その責任細胞が粘膜での感染などを期に増殖し、粘膜・骨髄間を行き来している可能性を示唆している。異常の結果から、IgA腎症における Mucosa-Bone Marrow Axis の異常が病気の本態で治療のターゲットであるとする仮説をたて報告している (*Contrib Nephrol*,2007;157:197-217) (*Semin Nephrol*, in press)。こういった研究成果をふまえ、我々は粘膜免疫の初期 priming に中心的な役割を果たす樹状細胞 (dendritic cell;DC) に注目した。IgA腎症患者の扁桃内の濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell;FDC) には IgA1 が認められるが、慢性扁桃炎などの他疾患や健常者では認められないことより、IgA1 を含む免疫複合体が FDC に捕捉され、IgA腎症の発症と進行に関わる B 細胞の持続的活性化を起している可能性が報告されている。また、IgA腎症患者の血液から得られた DC は、ナイーブ B 細胞の IgA 産生を誘導する機能が障害しているとする報告もある。このように、IgA腎症の発症進展機序における DC と、特に B 細胞との相互作用が重要であることが示唆されるが、IgA腎症における DC の役割を検討した報告は上記の 2 つしかなく、病因の解明という点では十分とはいえない。以上から、我々は、DC からのアプローチが IgA腎症の発症・進展機序を解明するために有用であると考え、研究を計画した。

2. 研究の目的

粘膜免疫で重要な役割を果たす DC と B 細胞に関して、共通して存在するレセプターである TLR9 に着目した。今回 TLR9 のリガンドである CpG-ODN を用い、gddY での TLR9 の病的意義について検討した。CpG-ODN (CpG) は CpG A (DC を活性化)、CpG B (B 細胞を活性化)、CpG C (DC と B 細胞を活性化) の 3 種類があり、それらを使い分けることにより、DC と B 細胞がどのような腎組織

障害に寄与するのかを検討する。

3. 研究の方法

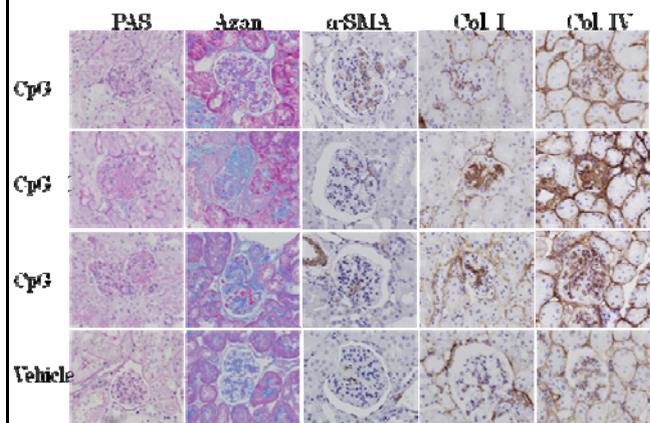


SPF 環境下で飼育されている 4 週齢の gddY と Balb/c にそれぞれ CpG A, B, C を週 1 回、1 回に 10µg 経鼻腔投与する。Vehicle control 群とあわせ (各群 N=3)、それぞれ投与前後に採血、全尿採尿し 8 回投与後に sacrifice し、腎病理組織を評価した。

4. 研究成果

① アルブミン尿の推移 (gddY)

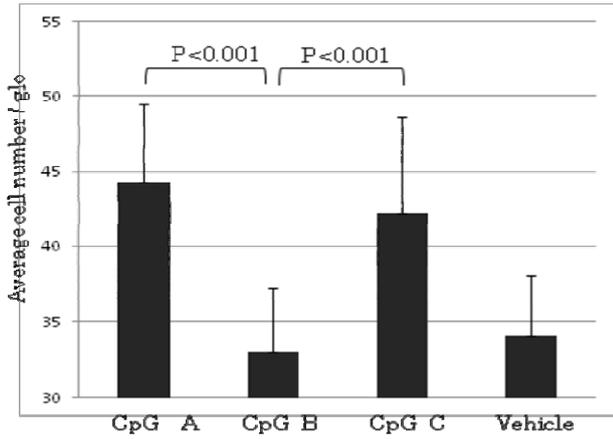
gddY の各群では、CpG 感作でアルブミン尿が増悪した。感作後から次回感作までにアルブミン尿は減少するが、感作により再び増悪する。感作を繰り返すごとに反応性は低下し



ていく。DC を活性化した群 (CpG A, C 群) は CpG B 群よりアルブミン尿が多い傾向にあった。なお、Balb/c 群ではいずれの群も経過中にアルブミン尿を認めなかった。

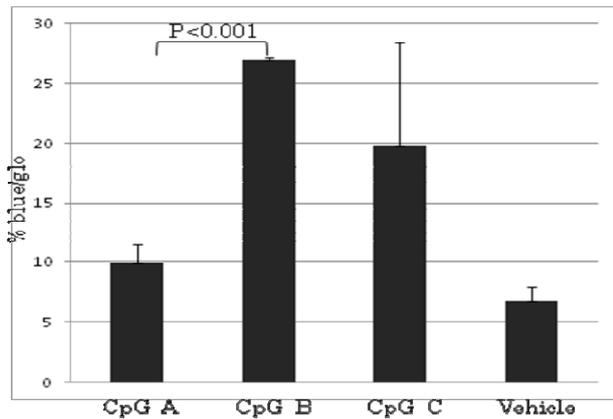
② CpG を 8 回投与後の腎病理組織 (PAS,

Azan, α -SMA, Col I, Col IV) (gddY)



gddY 群では CpG 投与により糸球体障害が増悪した。尿細管・間質障害の進展はあまり見られなかった。腎糸球体の硬化と細胞増殖のパターンが CpG の違いにより異なっている印象があったため、詳細に解析した。

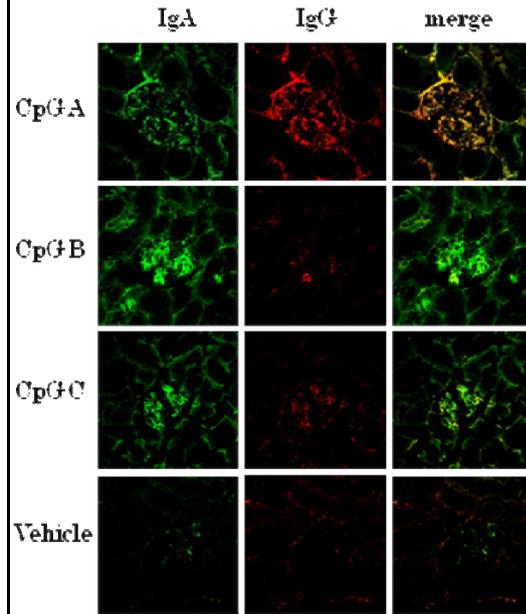
③ 糸球体内の平均細胞数 (gddY)



各個体少なくとも 30 個以上の糸球体内細胞数をカウントし、各群で平均細胞数を算出した。CpG A, C 群は CpG B より優位に糸球体内細胞が増加していた。

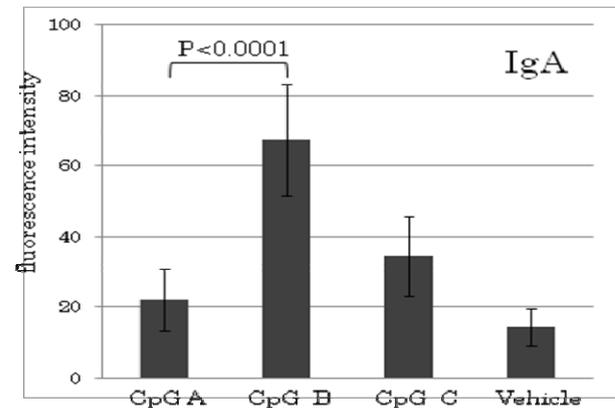
④ Azan 染色での細胞外基質の評価 (gddY)

Azan 染色で細胞外基質を反映する青の面積を画像解析ソフトを用いて測定し、糸球体面積との比を算出した。これも各個体最低 30 個の糸球体について評価し、各群で平均を算出した。CpG B 群は CpG A 群と比較して優位に細胞外基質が増加していた。



⑤ 糸球体の IgA、IgG の沈着 (gddY)

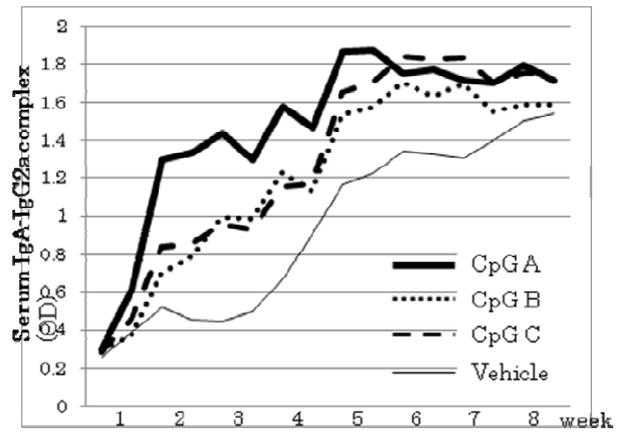
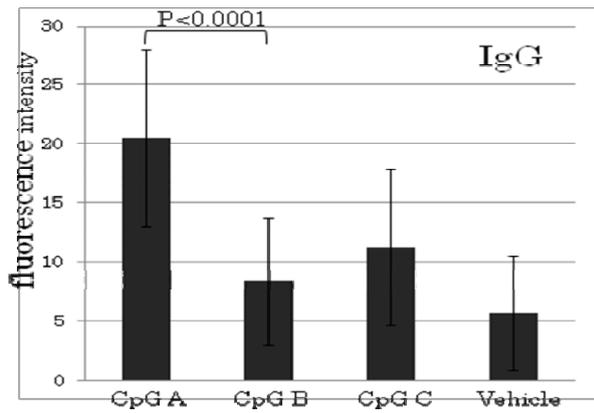
糸球体への IgA、IgG の沈着を定量化する為



に蛍光抗体法で染色し、同一設定で糸球体の画像を撮影した。画像処理ソフトで糸球体の平均蛍光強度を測定した。これも各個体少なくとも 30 個以上の糸球体进行评估し、各群で平均を算出した。

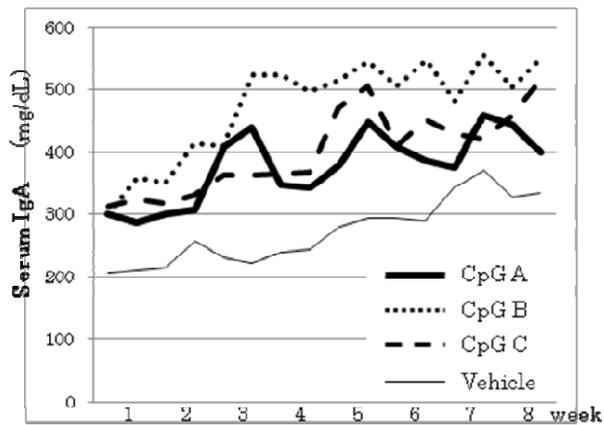
⑥ 糸球体の IgA 平均蛍光強度 (gddY)

CpG B 群は CpG A 群より優位に IgA が沈着していた。



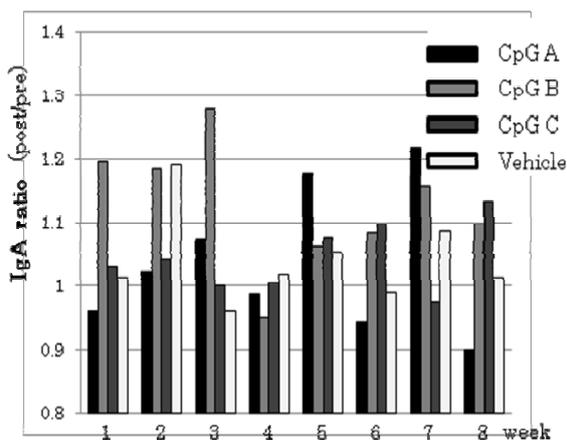
⑧ 血清 IgA の推移 (gddY)

全ての群で観察期間中に徐々に血清 IgA 値が上昇していった。CpG 投与後に IgA 値の上昇を認めた。CpG B 群は CpG A 群よりも全ての期間で IgA 値が高値を示した。下図は各投与前後での変化率を見たものである。



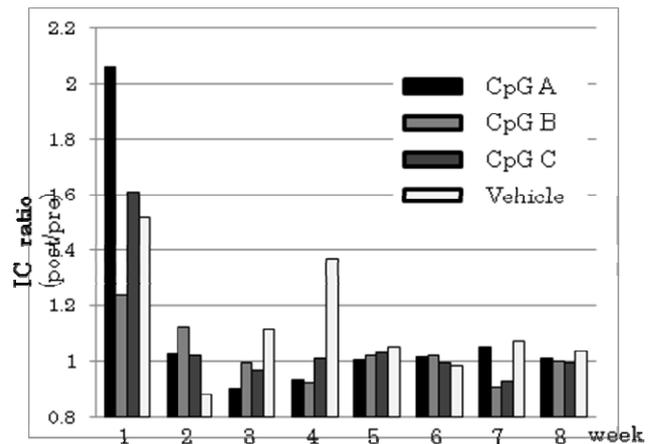
⑦ 糸球体の IgG 平均蛍光強度 (gddY)

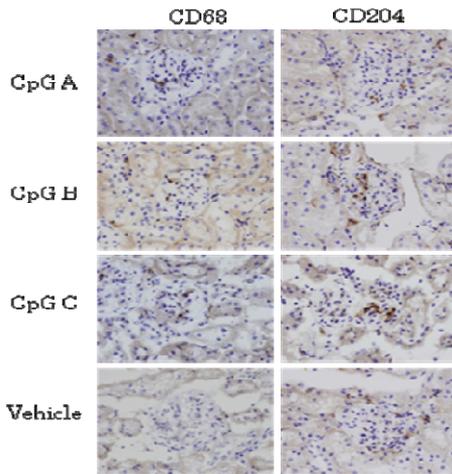
CpG A 群は CpG B 群より優位に IgG が沈着していた。



⑨ 血清 IgA-IgG2a 免疫複合体の推移 (gddY)

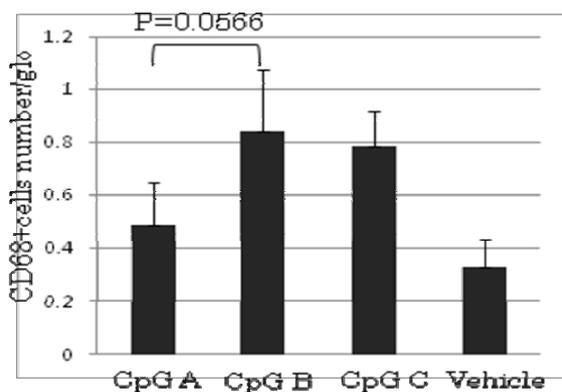
Sandwich ELISA 法で血清 IgA-IgG2a 免疫複合体 (IC) を測定した。全ての群で観察期間中に IC は増加した。CpG 投与後 IC は増加した。特に CpG A 群は観察期間中の全ての時間で CpG B 群より高値で推移した。下図は各投与前後の変化率を見たものである。





⑩ 糸球体内のマクロファージ (gddY)

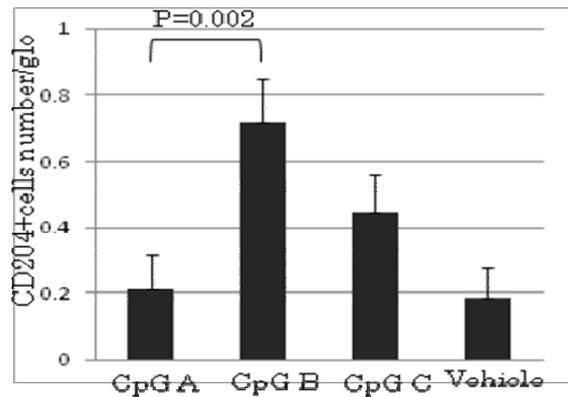
糸球体内の細胞増殖や細胞外基質の要因の評価の一つとして、腎組織のマクロファージを酵素抗体法で染色した。全ての群で尿細管・間質にはほとんどマクロファージの浸潤は見られなかった。汎マクロファージのマーカである CD68 と M2 マクロファージのマ



ーカーである CD204 で染色した。各群でマクロファージのサブセット数に違いがあったために解析した。これも各個体少なくとも 30 個の糸球体を評価し、各群の平均細胞数を算出した。

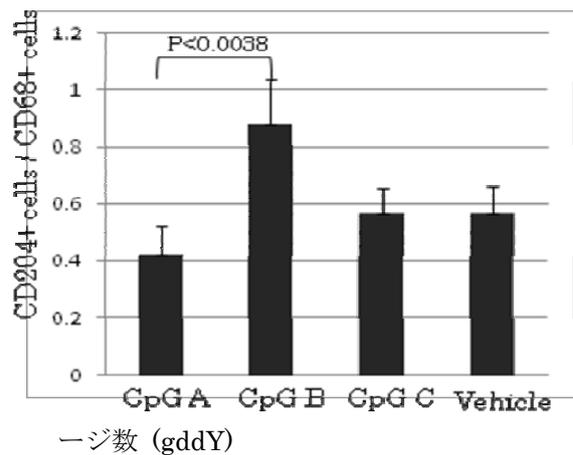
⑪ 糸球体内の平均 CD68 陽性マクロファージ数 (gddY)

CpG 投与群では汎マクロファージ数は増加していた。CpG B 群ではよりマクロファージ



が多い傾向にあった。

⑫ 糸球体内の平均 CD204 陽性マクロファ



CpG 投与によって M2 マクロファージは増加していた。特に CpG B 群では CpG A 群より有意に M2 マクロファージが増加していた。

⑬ 糸球体内のマクロファージの M1/M2 サブセット比 (gddY)

糸球体内のマクロファージのサブセットでみると、CpG B 群では CpG A 群より有意に M2 にシフトしていた。

マウス IgA 腎症では、DC と B 細胞に TLR9

を介した刺激を行うことで、それぞれ異なったタイプの腎障害を誘導できることが明らかとなった。今後、それぞれの障害を解析することで治療上の戦略に役立つものであると考えられた。

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 7 件)

Yusuke Suzuki et al. Clinicoepidemiological manifestations of RPGN and ANCA-associated vasculitides: an 11-year retrospective hospital-based study in Japan. Mod Rheumatol. 査読有, 20: 54-62, 2010

Koshi Yamada, Yusuke Suzuki et al. Down-regulation of core 1 {beta}1,3-galactosyltransferase and Cosmc by Th2 cytokine alters O-glycosylation of IgA1. Nephrol Dial Transplant. 査読有, 25: 3890-3897, 2010

Nan Zuo, Yusuke Suzuki et al. Protective effects of tubular liver-type fatty acid binding protein in murine IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 査読有, in Press

Yusuke Suzuki et al. Reevaluation of Mucosa-Bone Marrow-Axis in IgA nephropathy with animal models. ADVANCES IN OTO-RHINO-LARYNGOLOG. 査読有, in Press

Jan Novak, Yusuke Suzuki et al. Aberrant Glycosylation of IgA1 and Anti-Glycan Antibodies in IgA Nephropathy: Role of Mucosal Immune System. ADVANCES IN OTO-RHINO-LARYNGOLOG. 査読有, in Press

鈴木祐介, I g A腎症の病態における扁桃B細胞の役割、医学のあゆみ、査読無、236: 1193-1194、2011年

鈴木祐介, I g A腎症とHenoch-Schonlein紫斑病、腎と透析、査読無、70: 73-76、2011年

[学会発表] (計 4 件)

Yusuke Suzuki et al. Mucosa-Bone Marrow-Axis in IgA Nephropathy -Insights from Animal Models- The 7th International Symposium on Tonsil and Mucosal Barriers of the Upper

Airways, July 9 2010, Asahikawa, Japan

Tadahiro Kajiyama, Yusuke Suzuki et al. Different Disease phenotypes differ by activation of TLR9 on dendritic cells (DC) and B cells in murine IgA nephropathy. American Society of Nephrology Annual meeting 2010, Nov 20 2010, Denver, USA

Tadahiro Kajiyama, Yusuke Suzuki et al. Different disease phenotypes by activation of TLR9 on dendritic cells(DC) and B cells in murine IgA nephropathy. The 7th International Symposium on Tonsil and Mucosal Barriers of the Upper Airways, July 8 2010, Asahikawa, Japan

梶山忠弘、鈴木祐介 他、IgA腎症モデルマウスにおける、感作抗原の相違がもたらす病態の多様性の検討、第53回 日本腎臓学会学術総会、2010年6月17日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 祐介 (SUZUKI YUSUKE)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：70372935

(2) 研究分担者

富野 康日己 (TOMINO YAQSUHIKO)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：60130077

堀越 哲 (HORIKOSHI SATOSHI)
順天堂大学・医学部・先任准教授
研究者番号：80260884

木原 正夫 (KIHARA MASAO)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：50512604

鈴木 仁 (SUZUKI HITOSHI)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：10468572

中田 純一郎 (NAKATA JUNICHIRO)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：20365638

山路 研二 (YAMAJI KENJI)
順天堂大学・医学部・助手
研究者番号：90420835