

機関番号： 32620

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591040

研究課題名 (和文) IgA 腎症における責任細胞の臓器選択的移動に関わる制御機構の解明

研究課題名 (英文) Approach to the mechanism organ specific homing of responsible cells in IgA nephropathy

研究代表者

堀越 哲 (HORIKOSHI SATOSHI)

順天堂大学・医学部 先任准教授

研究者番号：80260884

研究成果の概要 (和文)：摘出したヒト扁桃を用いて TLR9 発現と、扁桃摘出術、ステロイドパルス療法による治療効果を検討した。49 名の IgA 腎症患者で検討し摘出した扁桃における TLR9 発現が全測定値の mean+SD 以上を示す患者が治療後の血尿、蛋白尿の寛解率が高いこと、また扁桃摘出術前後で血清 IgA 値の減少率が大きい患者が蛋白尿の寛解率が高い傾向にあることを見いだした。

研究成果の概要 (英文)：In IgA nephropathy patients, expression levels of tonsillar TLR9 was well correlated with the efficacy of tonsillectomy with steroid pulse therapy. In addition, the decreasing rate of serum IgA level by tonsillectomy was well correlated with the remission of proteinuria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：腎臓内科

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、扁桃摘出術、TLR9、責任細胞、扁桃パルス療法

1. 研究開始当初の背景

● IgA 腎症の現状と治療の限界

IgA 腎症は、その約 4 割が腎生検から 20 年以内に末期腎不全 (ESRD) に至る予後不良の疾患である (Yasuhiko Tomino et al, *Clinical and Experimental Nephrology*, 2003)。近年、本邦を中心に扁桃摘出術が多施設で行われ、一部の症例に良好な成績を収めている。有効症例では、完全寛解が期待でき、平成 19 年に日本腎臓学会が行った全国アンケート調査によれば 1 年後の完全寛解率は 45.6% と報告されている。その点で、既存の治療法とは明らかに異なり、根治治療

として有望視されている。しかしながら、この治療効果の基礎的考察は不十分であり、RCT 等の高いエビデンスの臨床研究が行われておらずその適応基準も不明確である。したがって、この治療法による完全寛解を高率に誘導できる理論の構築が非常に重要である。

● 病因解明の必要性と、我々の研究から示唆されること

IgA 腎症の病因は未だ不明である。我々は、IgA 腎症の病因解明に向けた基礎研究を長年継続し、重要な報告をしてきた。その病態は、全身の複雑な免疫ネットワークの異常に基

づくため、この複雑系を読み解くには妥当性をもった自然発症モデルが必要である。我々は、最近ヒト IgA 腎症に病態的にも遺伝的にも非常に類似した IgA 腎症自然発症系マウスモデル”grouped ddY mouse”の確立に成功し (JASN, 2006)、これを用いることにより飛躍的に解析を進めている。この基礎的検討から、1) 腎炎発症に関する責任細胞は、主に上気道粘膜面で異常な免疫感作を受けている (JASN, 2008)、2) この責任細胞は、他のリンパ組織 (主に骨髄や脾臓) に播種し (Kidney Int 2007, Cont Nephrol 2007)、その組織と粘膜間を行き来している、3) この責任細胞は粘膜感染を機に活性化し、病態を悪化させる、4) この責任細胞により産生される異常 IgA は、糖鎖異常を有している可能性が高い、5) この疾患に特異的な炎症の持続は、この異常 IgA の持続的供給に依存する (Kidney Int 2007) ことなどを確認した。特に 2) に関連して我々はモデルマウスを用いて骨髄や脾細胞を移植することで IgA 腎症を再構成できる (投稿準備中) ことを確認している。以上から、IgA 腎症の病因の本態は Mucosa-Bone marrow axis の異常であり、それが基本的治療ターゲットであるとする仮説を我々は提案している (Contr Nephrol 2007, Seminar in Nephrol 2008)。我々の基礎研究は、異常な免疫感作の場としての粘膜 (扁桃) の重要性、骨髄やリンパ組織へ播種し待機している病因に関わる免疫記憶細胞の治療ターゲットとしての重要性を示唆し、扁桃パルス療法の有効性を理論的に支持するものとする。さらに、この治療の効果が期待できる症例は、1) 異常に感作を受けた責任細胞が増殖し全身に十分量が播種される前の発症早期の症例、2) 発症してある期間がたっても IgA 腎症に特異的な活動性が残っている症例であることが予想される。IgA 腎症の約 20% は自然寛解するとされる。即ち、病因に関わる免疫記憶細胞は、時間とともにその絶対数が減ってくる可能性がある。したがって、逆に扁桃パルス療法の無効例は、すでに IgA 腎症に特異的障害機転はなくなっているものの、そこまでの障害により不可逆的な障害が残った症例と推論される。したがって、異常感作を受け全身に播種する責任細胞を初期の段階で捉えることは疾患活動性の評価のみならず、病態の理解や扁桃パルス療法の適応を考える上できわめて重要である。

2. 研究の目的

責任細胞としてはリンパ球および樹状細胞などが想定されるが、これらの細胞が、粘膜 (扁桃) から骨髄や 2 次リンパ組織へ選択的に移動することは、ケモカインレセプターやインテグリンなどの接着分子の発現パターンに規定されていると考えられる。即ち本症

に特異的な発現パターンが存在しこれが Mucosa-Bone marrow axis の異常の一部を担っていることが推測される。今回の検討では特に粘膜、骨髄、リンパ組織間での責任細胞の選択的移動に関わる制御機構を解明することを主たる目的とする。具体的にはまずヒト IgA 腎症における扁桃の関わりを検討し、責任細胞が扁桃に存在 (移動) しているのか、またその中でもどのような細胞が進展に寄与しているのかを検討する。その後、grouped ddY mouse の骨髄、リンパ組織 (脾臓) の細胞に発現している本症特異的なケモカインレセプター、インテグリンなどの接着分子の発現様式を検討し、その上でヒト IgA 腎症扁桃組織および末梢血について検討を加え、本症に特異的なパターンを明らかにする。

3. 研究の方法

① 摘出した扁桃から RNA を抽出し TLR9 の発現の程度と扁桃摘出・ステロイドパルス療法後の治療効果を血尿、蛋白尿の寛解の有無を評価した。なお、それぞれ 1-5/HPF、0.15g/g・cre 以下を尿所見の寛解とした。また治療前後での血清 IgA 値の変化とこれらの関係についても同様に検討をした。また併せて扁桃における TLR9 発現はどのような細胞に由来するのかを検討した。

② 8 週齢及び 20 週齢の grouped ddY マウス”とコントロールの BALB/c マウスから汎脾臓細胞を抽出し、CD19 を磁気標識して CD19 陽性細胞 (B 細胞) を分離した。これらの細胞から RNA を抽出し、SABioscience 社の RT² Profiler[™] PCR Array System を使用して、CD19 陽性におけるケモカイン・ケモカインレセプターの発現様式を網羅的に解析した。また、同様に IgA 腎症と診断され当院にて扁桃摘出術を受けた患者の扁桃から汎扁桃細胞を抽出し、同様に CD19 を磁気表紙記して CD19 陽性細胞を分離し RT² Profiler[™] PCR Array System を使用して、CD19 陽性におけるケモカイン・ケモカインレセプターの発現様式を網羅的に解析した。

4. 研究成果

① 49 名の IgA 腎症患者 (表 1) とコントロールとしてその他疾患で扁桃摘出術を施行した患者の扁桃で検討した (慢性扁桃炎 n=10, 睡眠時無呼吸症候群 n=4, 掌蹠膿疱症 n=1)。摘出した扁桃における TLR9 発現が mean+SD 以上の患者が 11 名 (22.4%, TLR9 high group) 存在した (図 1)。またそれ以外の患者を TLR9 low group と定義した。TLR9 high group の治療後の血尿、蛋白尿の寛解率が高い (図 2-1, 2) ことを見いだした。また扁桃摘出術前後で血清 IgA

値は平均して 8.1%の減少であった。そこでこの平均の 8.1%よりも大きく減少した群を large Δ IgA 群、残りを small Δ IgA 群として尿所見の変化を検討した。large Δ IgA 群が蛋白尿の寛解率が高い傾向にある【図 3-1, 2】ことを見いだした。

【表 1】

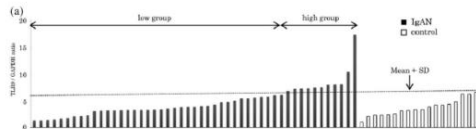
Table 1. Patients' profile just before treatment

Age (years old)	31.9 ± 7.9
Male:female	14:35
Duration until tonsillectomy (years)	5.6 ± 6.3
Prognostic criteria for IgAN ^a (cases)	
Good prognosis Grade I	1
Relatively good prognosis Grade II	6
Relatively poor prognosis Grade III	18
Poor prognosis Grade IV	14
Unknown	10
Chemistries	
sCr (mg/dL)	0.76 ± 2.7
BUN (mg/dL)	12.9 ± 2.7
eGFR ^b (mL/min/1.73m ²)	86.5 ± 23.2
Proteinuria (g/g-Cr)	0.75 ± 0.8
Hematuria (RBC/HPF)	25.1 ± 9.0

^aPatients are divided clinically into four groups at the time of renal biopsy according to clinical guidelines for IgAN in Japan, second version 16.

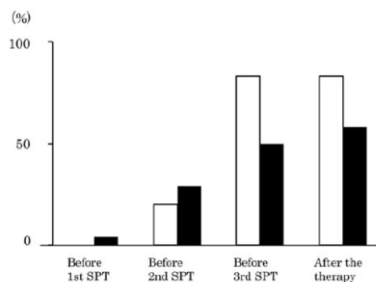
^bEstimated glomerular filtration rate (eGFR) is calculated by the next formula; $eGFR (mL/min/1.73m^2) = 194 \times Cr^{-1.094} \times Age^{-0.287}$ (male), $194 \times Cr^{-1.094} \times Age^{-0.287} \times 0.739$ (female) (Japanese Association of Chronic Kidney Disease Initiative, 2008).

【図 1】



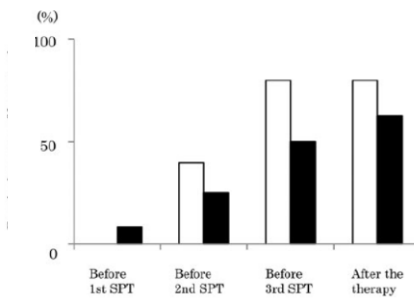
【図 2-1】 蛋白尿の寛解率

(■TLR9 low group, □TLR9 high group)



【図 2-2】 血尿の緩解率

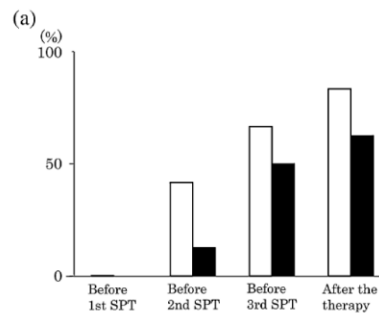
(■TLR9 low group, □TLR9 high group)



SPT; steroid pulse therapy

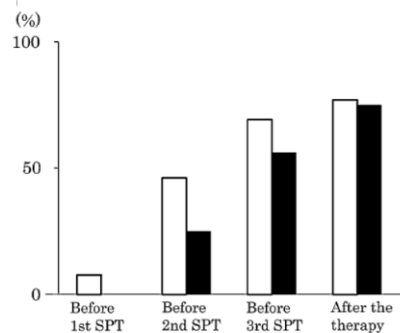
【図 3-1】 蛋白尿の寛解率の比較

(■small Δ IgA, □large Δ IgA)



【図 3-1】 血尿の寛解率の比較

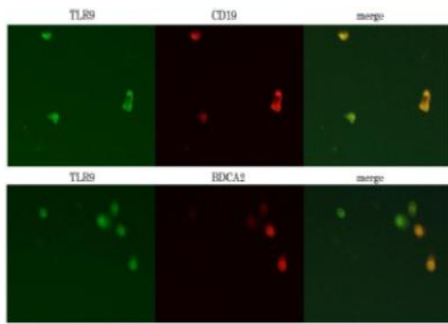
(■small Δ IgA, □large Δ IgA)



では、一般的にはヒトでは TLR9 発現は B 細胞と pDC にあるものと考えられている。扁桃における TLR9 発現はどのような細胞に由来するのかを検討するべく、次に扁桃由来細胞を用いて検討をおこなった。

扁桃より抽出した汎扁桃細胞をそれぞれ、TLR9、CD19、BDCA2 で染色した【図 4-1】。この結果から、IgA 腎症患者扁桃でも CD19 陽性 B 細胞、及び plasmacytoid dendritic cell の両方が TLR9 発現をしていることが示唆された。

【図 4-1】



- ② 8 週齢の grouped ddY マウス” とコントロールの BALB/c マウスから汎脾臓細胞を抽出し、CD19 を磁気標識して CD19 陽性細胞 (B 細胞) を分離した。これらの細胞から RNA を抽出し、SABioscience 社の RT² Profiler™ PCR Array System を使用して、CD19 陽性におけるケモカイン・ケモカインレセプターの発現様式を網羅的に解析した。高発現遺伝子として PPBP、PF4、CXCL5 が、低発現遺伝子として CCR4、CCR6 などが候補として挙げられた。しかし週齢によりその発現パターンにばらつきを認めた。またヒト扁桃細胞を用いて同様に CD19 陽性細胞を分離し、ケモカインレセプター発現様式を解析したがばらつきが大きく一定の傾向を見いだすことはできなかった。

今回の検討により、TLR9 発現や血清 IgA 産生に関わる細胞が本症の進展のメカニズムに大きく関連する可能性が示唆された。また 2 次リンパ節への移動や疾患の進展には TLR9 やそれに関わる B 細胞、pDC などが重要な役割を担っていることが推察された。今回はヒト扁桃サンプルの収集などで時間に制約があったため十分な検討はできなかったが、今後更に検討を進めていくことが肝要と考えられた。

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 6 件)

1. Daisuke Sato, Yusuke Suzuki, Tatsuya Kano1, Hitoshi Suzuki, Joe Matsuoka, Hidenori Yokoi, Satoshi Horikoshi1, Katsuhisa Ikeda and Yasuhiko Tomino. Nephrology Dialysis Transplantation. (2012) 27: 1090-1097 査読有り

2. A new screening method for proteinuria using Erythrosin B and an automated analyzer—rapid, sensitive and inexpensive determination. Horikoshi S, Higurashi A, Kaneko E, Yoshimura H, Ohsawa I, Suzuki Y, Hamada C, Tomino Y. Clin Chim Acta. 2012 Jul 11;413(13-14):1087-91. 査読有り
3. Different pathological roles of toll-like receptor 9 on mucosal B cells and dendritic cells in murine IgA nephropathy. Kajiyama T, Suzuki Y, Kihara M, Suzuki H, Horikoshi S, Tomino Y. Clin Dev Immunol. 2011;2011:819646. 査読有り
4. Reevaluation of the mucosa-bone marrow axis in IgA nephropathy with animal models. Suzuki Y, Suzuki H, Sato D, Kajiyama T, Okazaki K, Hashimoto A, Kihara M, Yamaji K, Satake K, Nakata J, Aizawa M, Novak J, Tomino Y. Adv Otorhinolaryngol. 2011;72:64-7. 査読有り
5. Pathological role of tonsillar B cells in IgA nephropathy. Suzuki Y, Suzuki H, Nakata J, Sato D, Kajiyama T, Watanabe T, Tomino Y. Clin Dev Immunol. 2011;2011:639074. Epub 2011 Jul 18. Review. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- A) 2009 年アメリカ腎臓学会 Association of Tonsillar TLR9 Expression, TLR9 SNP and Therapeutic Efficacy of Tonsillectomy with Steroid Pulse Therapy in Patients with IgA Nephropathy 2009. 11. 27
- B) 2009 年 第 39 回日本腎臓学会東部学術大会 IgA 腎症患者における扁桃 TLR9 発現と扁桃ステロイドパルス併用療法 (扁桃パルス) の効果に関する検討 2009. 10. 3
- C) 2010 年 第 7 回国際粘膜免疫学会 Correlation among tonsillar TLR9 expression, TLR9 SNP and clinical outcomes of tonsillectomy with steroid pulse therapy 2010. 7. 8

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀越 哲 (Horikoshi Satoshi)
順天堂大学・医学部・前任准教授
研究者番号：80260884

(2) 研究分担者

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

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

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