

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08250

研究課題名（和文）IgA腎症の発症に關与する扁桃免疫多様性の解明

研究課題名（英文）Research on the Tonsil Immune Diversity Involved in the development of IgA Nephropathy

研究代表者

後藤 眞 (Goto, Shin)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00463969

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では摘出扁桃を用いてIgA腎症における免疫反応の詳細を明らかにすることを計画した。扁桃組織のバルクRNA-Seqおよび1細胞核RNA-Seqでは、習慣性扁桃炎患者に比較してIgA腎症患者では上皮系遺伝子発現の亢進が観察された。細胞間相互作用では、上皮系遺伝子群と免疫細胞・樹状細胞などの相互作用が検出された。扁桃T細胞受容体レパトアについては、IgA腎症患者のTCRレパトア鎖において、習慣性扁桃炎患者よりも類似性が有意に低く、症例間で共有されるクローンの違いが観察された。これらの共有クローンのCDR3配列の特徴や扁桃APRIL、IgA結合細菌との関連が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究からIgA腎症患者の粘膜免疫異常について、特に扁桃組織において遺伝子発現プロファイルが明らかになった。国内ではIgA腎症に対する治療として扁桃摘出術およびステロイド治療が広く行われている。扁桃摘出の理論的根拠として、また扁桃解析をIgA腎症の粘膜免疫異常のモデル解析として研究を進めることは実際の臨床診療にフィードバックする点で意義があると思われる。今後、新たな治療ターゲットの解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we planned to use excised tonsils to elucidate the details of the immune response in IgA nephropathy (IgAN). Both bulk RNA-Seq and single-cell nucleus RNA-Seq of tonsil tissue revealed an up-regulation of epithelial-related gene expression in IgAN patients compared to chronic tonsillitis patients. In terms of cell-cell interactions, interactions between epithelial gene groups and immune cells, including dendritic cells, were detected. Regarding the tonsil T-cell receptor (TCR) repertoire, IgAN patients showed significantly lower similarity in the TCR repertoire alpha chain compared to chronic tonsillitis patients, with differences in shared clones. Features of the CDR3 sequences of these shared clones and their association with tonsil APRIL and IgA-binding bacteria were observed.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：IgA腎症 扁桃 1細胞RNA-Seq T細胞受容体レパトア

## 1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は腎糸球体に Ig 分子の沈着と補体活性化を伴うメサングウム増殖性糸球体腎炎である。世界で最も頻度が高く、末期腎不全に至る主要な慢性腎疾患の原因でもある。IgA 腎症患者の血中で糖鎖不全 IgA1 が上昇し、糸球体に沈着することが報告されており、原因は遺伝背景と環境因子による複合的な要因が想定されている (マルチヒット仮説)。IgA 腎症は上気道感染に伴い尿所見が増悪することから、その環境要因として上気道粘膜細菌叢の関与が強く疑われ、腎糸球体に沈着している IgA 分子は粘膜免疫異常に由来すると考えられている。以前から IgA 腎症の感染病巣として口蓋扁桃が注目されており、IgA 腎症患者に特異的な扁桃細菌群が複数報告されているが、一定の結論は得られていない。

申請者らは扁桃細菌叢の組成について 16S rRNA 解析で検討し、IgA 腎症患者と習慣性扁桃炎患者の間に有意な違いは見られないことを報告した (*Nephrol Dial Transplant* 2017)。一方、IgA 腎症患者の扁桃組織では B 細胞活性化因子である APRIL や BAFF の発現は有意に増加し、特定の細菌叢 (*Bacteroidetes* 門) への IgA 反応性が亢進していた。さらに末梢血ではこれらの細菌群に結合する多量体 IgA が多く存在していた。したがって、IgA 腎症患者では扁桃での粘膜免疫反応が異常亢進した結果、粘膜 IgA が末梢血へ移行している可能性がある。しかし、細胞分子生物学的な定量的な根拠は乏しく、血中で増加する糖鎖不全 IgA1 や糸球体への沈着・腎炎惹起との関連も不明である。

粘膜免疫応答における IgA と細菌叢の相互作用のメカニズムを明らかにするため、申請者らは扁桃組織を用いて、IgA 重鎖可変領域の多様性 (レパトア) 解析を行い、IgA 腎症患者で IGHV3-30 の発現が亢進し、*Bacteroidetes* 門細菌群に対する結合指標と相関することを見出した。これは IgA と細菌との総体的な親和性を反映する知見と考えられるが、一方で T 細胞レパトア配列情報や背景に存在する遺伝子発現の詳細は不明である。この点を明らかにするためには、組織全体を対象とした解析では不可能であり、単一細胞レベルでのより解像度の高い研究手法が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究は、1 細胞に由来する網羅的遺伝子発現解析を通じて IgA 腎症の扁桃に特異的な免疫細胞群を同定し、免疫応答から生じる IgA 分子の特性と末梢血および腎糸球体への動態を解明することにより口蓋扁桃の免疫応答異常の詳細な機序を解明することを目指す。口蓋扁桃における粘膜免疫応答は、抗原提示細胞、T・B 細胞各々の免疫機能分子を介する相互作用が必須である。IgA 腎症患者の扁桃では、APRIL の発現が増加しており、T 細胞非依存性 IgA 産生と考えられる一方、糖鎖不全 IgA1 は胚中心にも多く観察されており、抗原提示を受けて T 細胞依存性 IgA 産生も存在すると推定される。胚中心における免疫応答は濾胞性ヘルパー T 細胞と B 細胞の相互作用で行われるが、IgA 腎症患者の扁桃における病態は明らかでない。1 細胞解析で網羅的に遺伝子発現を解析することで IgA 腎症に特異的な免疫細胞群・発現遺伝子を同定できる可能性がある。

また、全ゲノム解析関連から IgA 腎症と扁桃炎の遺伝背景は一致する (22q12.2, rs2412971) ことが報告されており、IgA 腎症の発症と扁桃炎に共通する病態があることを示唆している。この遺伝子座にリンクする遺伝子群について扁桃組織で発現解析を行うことは IgA 腎症のさらなる病態解明につながる可能性がある。本研究でその発現量・細胞特異性を上記の 1 細胞解析の中で解析し、IgA 腎症の発症機序への関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、IgA 腎症患者の扁桃組織の 1 細胞解析により、IgA 腎症の粘膜免疫応答を明らかにするとともに、T・B 細胞受容体のレパトア情報から細菌群集に対する反応特異性と糸球体腎炎に対する扁桃由来 IgA の関与を明らかにする。

### 1) IgA 腎症患者の扁桃組織の網羅的遺伝子発現解析

#### 1.1 扁桃組織の bulk RNA-Seq

IgA 腎症患者と習慣性扁桃炎患者の摘出扁桃組織全体から RNA を抽出し、バルク (bulk) RNA-Seq 解析を行った。シーケンズリード数から各遺伝子発現の定量を行い、群間比較を行った。IgA 腎症患者に有意に発現する遺伝子群を対象にエンリッチメント解析を行った。

#### 1.2 扁桃組織の 1 細胞核 RNA-Seq 解析

IgA 腎症患者と習慣性扁桃炎患者の摘出扁桃組織を用いて細胞核を対象とした 1 細胞核 RNA-Seq 解析を行い、IgA 腎症患者に特異的な遺伝子発現パターンを有する細胞集団 (クラスター) を解析した。その中で変動発現遺伝子からエンリッチメント解析を行い、IgA 腎症に特異的なパスウェイを解析した。またクラスター間の細胞間相互作用を解析した。また IgA 腎症のリスク SNP rs2412971 (22q12.2) に関連する遺伝子群の発現解析から IgA 腎症に特異的な遺伝子発現制御機

構を解析した。

### 1.3 扁桃組織の1細胞 RNA-Seq 解析

IgA 腎症患者と習慣性扁桃炎患者の摘出扁桃から新鮮な組織を用いて1細胞 RNA-Seq 解析を行った。各細胞集団のクラスターを同定し、群間比較を行った。

### 2) 扁桃組織の T 細胞受容体レパトア解析

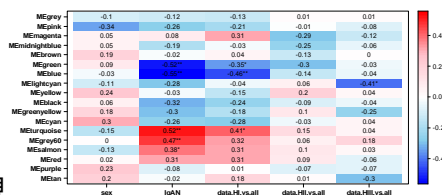
IgA 腎症患者と習慣性扁桃炎患者の扁桃組織から RNA を抽出し、ライブラリ作成後、アダプターライゲーション PCR 法で TCR 鎖、鎖の可変領域配列を次世代シーケンサーで決定した。TCR レパトアの多様性、類似性および CDR3 について群間比較を行い、さらに扁桃組織の APRIL、BAFF、Gd-IgA1 値との相関を解析した。

## 4. 研究成果

### 1) 1細胞解析による扁桃組織の網羅的遺伝子発現解析

#### 1.1 扁桃組織の bulk RNA-Seq

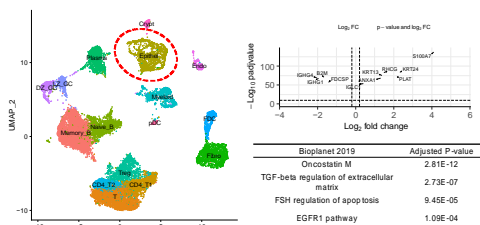
扁桃組織の網羅的遺伝子発現を解析するために、まず扁桃組織全体（バルク、bulk）での RNA-Seq 解析を行った。IgA 腎症 19 例、習慣性扁桃炎 13 例を対象とした。Weighted gene co-expression 解析により IgA 腎症に関連するモジュール（下図）を同定し、そのモジュール内の発現遺伝子によるエンリッチメント解析を行った。Reactome 2022 ではケラチン化、Bioplanet 2019（下図）では Oncostatin M や TGF- $\beta$  に関連する細胞外マトリックス、Disease Perturbation (GEO) では psoriasis などのパスウェイが検出された。IgA 腎症患者の扁桃細胞陰窩では、リンパ上皮の網状化が減少しており、上記の遺伝子発現の変化を反映していると考えられた。



Term	Adjusted P-value
Oncostatin M	9.02E-20
Drug metabolism: cytochrome P450	3.08E-07
TGF-beta regulation of extracellular matrix	1.33E-05

#### 1.2 扁桃組織の1細胞核 RNA-Seq 解析

次に扁桃組織の1細胞解析として、まず、凍結保存された扁桃組織（IgA 腎症 3 例、習慣性扁桃炎 2 例）を用いて、1細胞核 RNA-Seq 解析を行った。クラスタリング後、16 のクラスターが得られた（下図）。上皮系細胞のクラスターにおいて発現変動遺伝子を抽出し、群間比較により IgA 腎症患者で有意に発現する遺伝子でエンリッチメント解析を行うと、bulk RNA-Seq と同様にオンコスタチン M や TGF- $\beta$  に制御される細胞外マトリックスが検出された（下図）。各クラスター間の細胞間相互作用について解析を行い、樹状細胞や免疫細胞に発現する TGF- $\beta$  と上皮細胞とのリガンド・ターゲット関連が上位に抽出され、扁桃陰窩における上皮細胞の変化の背景に粘膜免疫細胞の関与が疑われた。オンコスタチン M は IgA 腎症のゲノムワイド関連解析で検出された、22q12.2 に存在する遺伝子であり、IgA 腎症に特異的な発現機構で制御されている可能性がある。先進ゲノム支援採択課題として、扁桃組織から免疫細胞を抽出し、22q12.2 領域に着目した Hi-C 解析を行っている。

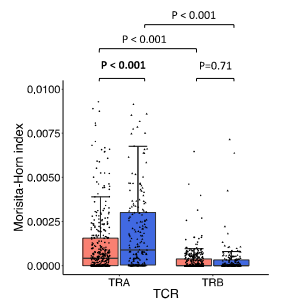


#### 1.3 扁桃組織の1細胞 RNA-Seq 解析

扁桃摘出後の新鮮な組織を対象とした1細胞 RNA-Seq 解析（IgA 腎症 2 例、習慣性扁桃炎 2 例）では、上皮系細胞のクラスターは検出されないが、T/B 細胞を含めて多くの免疫細胞に関するクラスターが同定された。現在、変動遺伝子を解析し、bulk RNA-Seq データとの関連性を検討している。1細胞解析の標本処理が解析結果に影響を与えており、それぞれ補完的な解析結果になり得ると考えられる。

### 2) 扁桃組織の T 細胞受容体 (TCR) レパトア解析

IgA 腎症患者と習慣性扁桃炎患者の TCR レパトアについて、多様性指標は両群に有意な差は認められなかった。類似性については、Morisita-Horn Index を算出し、TCR 鎖 (TRA) で IgA 腎症患者で有意に低下していることが観察された（右図）。このことは、TRA レパトアの症例間で共有されるクローンの類似性が異なることを意味しており、IgA 腎症患者の TRA 共有クローンは CDR3 長が短いクローンで有意に増加していた。これらの TRA 共有クローンの CDR3 のアミノ酸組成は疎水性に富み、各種抗原への親和性が高い可能性を示唆する。また、この TRA 共有クローンの相対存在比は扁桃組織の APRIL 値や、IgA 結合 Bacteroidetes 菌の存在比と有意な正の相関を示し、IgA 腎症の発症における粘膜免疫における役割が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名	米沢正貴、後藤眞、山口浩毅、渡辺博文、土田雅史、里方一紀、今井直史、伊藤由美、田崎正行、齋藤和英、成田一衛
2. 発表標題	腎移植後IgA腎症患者の扁桃免疫と扁桃摘出・ステロイドパルス療法
3. 学会等名	第45回IgA腎症研究会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Masataka Yonezawa, Shin Goto, Hirofumi Watanabe, Hiroki Yamaguchi, Kazunori Satokata, Masafumi Tsuchida, Naofumi Imai, Yumi Ito, Masayuki Tasaki, Kazuei Saito, Ichiei Narita
2. 発表標題	Association of tonsillar immunity with steroid pulse therapy combined with tonsillectomy in post-transplant IgA nephropathy patients
3. 学会等名	the 65th Annual Meeting of the Japanese Society of Nephrology
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Kazunori Satokata, Shin Goto, Hirofumi Watanabe, Koichi Higashi, Ken Kurokawa, Ichiei Narita.
2. 発表標題	RNA-Seq analysis of tonsils in patients with IgA nephropathy.
3. 学会等名	17th International Symposium on IgA nephropathy. 2023/09/25-27, Tokyo (国際学会)
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	里方一紀、後藤眞、渡辺博文、山口浩毅、山本卓、金子佳賢、成田一衛
2. 発表標題	IgA腎症患者の扁桃陰窩におけるトランスクリプトーム解析
3. 学会等名	第46回IgA腎症研究会学術集会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名 Satokata K, Goto S, Yamaguchi H, Watanabe H, Yonezawa M, Tsuchida M, Yamamoto S, Kaneko Y, Narita I
2. 発表標題 Public repertoire of T cell receptor in tonsils of IgA nephropathy patients
3. 学会等名 the 65th Annual Meeting of the Japanese Society of Nephrology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazunori Satokata, Shin Goto, Hiroki Yamaguchi, Hirofumi Watanabe, Suguru Yamamoto, Yoshikatsu Kaneko, Ichiei Narita
2. 発表標題 T cell receptor repertoire analysis in tonsillar tissues of patients with IgA nephropathy
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satokata K, Goto S, Yamaguchi H, Watanabe H, Yonezawa M, Tsuchida M, Yamamoto S, Kaneko Y, Narita I
2. 発表標題 High-throughput sequencing analysis of the T-cell receptor repertoire in tonsils of IgA nephropathy
3. 学会等名 The 64th Annual Meeting of the Japanese Society of Nephrology
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	成田 一衛  (Narita Ichiei)  (20272817)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------