

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08284

研究課題名（和文）IgA腎症において粘膜免疫応答異常から全身展開する糖鎖異常IgA1産生機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of systemic production of aberrantly-glycosylated IgA1 related to the abnormal mucosal immune response in IgA nephropathy

研究代表者

佐藤 大介（Sat, Daisuke）

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50621942

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：IgA腎症における骨髄や全身のリンパ組織に展開している粘膜型責任細胞の生存・糖鎖異常IgA1産生機序解明のため、IgA腎症モデルマウスを用いて検証した。まず、J鎖mRNA陽性粘膜型IgA陽性形質細胞（IgA+PC）をマウスの骨髄・脾臓・リンパ節から選択的に抽出することを試みたものの抽出が困難であった。また、抗BAFF抗体/抗APRIL抗体等を用いた多重染色によってJ鎖陽性IgA+PCの各組織における特徴を解析することも試みたが、こちらも染色条件が確立できなかった。研究全体を通じて、マウスの各組織からのIgA陽性PC抽出方法を確立できず、詳細な解析が困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgA腎症の病態には、粘膜の免疫異常応答による糖鎖異常IgA産生が関与していると考えられており、本邦においては治療の一環として扁桃摘出術が行われている。また、これまでの基礎研究から、B細胞生存に関与するAPRILやBAFFといった因子についてもIgA腎症の病態に関与することが示唆されており、抗APRIL抗体などの臨床試験も実施されている。しかしながら、糖鎖異常IgAを産生する粘膜型免疫細胞がどのように全身に展開しているかは明らかでなく、本研究ではその解明を試みた。本研究ではリンパ組織から粘膜型免疫細胞を抽出する手法を確立できなかったため、今後のさらなる検証が必要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of survival of mucosal lymphocytes, which are responsible for the production of aberrantly-glycosylated IgA1 in bone marrow and lymphoid tissues throughout the body in IgA nephropathy, we examined it using a murine model. First, we attempted to selectively extract J-chain mRNA-positive mucosal IgA-positive plasma cells (IgA+PCs) from mice's bone marrow, spleen, and lymph nodes, but extraction was unsuccessful. We also tried to analyze the characteristics of J-chain positive IgA+PCs in each tissue by staining using anti-BAFF/anti-APRIL antibodies but could not establish staining conditions. Throughout the study, we could not establish a method for extracting IgA-positive PCs from each mouse tissue, making it difficult to do further detailed analysis.

研究分野：IgA腎症

キーワード：IgA腎症 BAFF APRIL

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は原発性糸球体腎炎のなかで最も頻度が高い疾患である。IgA 腎症の病態には糖鎖異常 IgA1 と糖鎖異常 IgA1 免疫複合体が深く関与しており、Toll like receptorなどを起点とした粘膜免疫応答異常と、Mucosa-Bone Marrow Axis 仮説による骨髄や全身のリンパ組織に展開した責任細胞が関与していると考えられる。B 細胞活性化因子とその受容体は、B 細胞の生存、分化、抗体産生を担うことが知られており、IgA 腎症においても APRIL が扁桃における胚中心の B 細胞に強く発現し、糖鎖異常 IgA1 産生への関与が強く示唆される。しかし粘膜における責任細胞がどのように骨髄や全身のリンパ組織に展開し、どのようにエフェクター組織である腎臓に影響を及ぼすかについての詳細な機序は明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、IgA 腎症における骨髄や全身のリンパ組織に展開している粘膜型責任細胞の生存・糖鎖異常 IgA1 産生の機序を解明するため、IgA 腎症自然発症モデルである gddY マウスを用いて骨髄や脾臓、全身リンパ組織における粘膜型責任細胞の BAFF/APRIL 発現の有無、BAFF/APRIL による細胞自体の生存維持や糖鎖異常 IgA1 産生への誘導を証明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) IgA 腎症モデルマウスを用いた骨髄/脾臓の粘膜型責任細胞の分離と特性の解明

IgA 腎症自然発症モデルである grouped ddY マウスを用いて、脾臓・骨髄の粘膜型責任細胞を分離培養し、IgA・糖鎖異常 IgA1 の産生や BAFF/APRIL 発現を評価する。また受容体 TAC1/BCMA/BAFF-R についても発現を評価する。

#### (2) 骨髄/脾臓の粘膜型責任細胞への TLR9 刺激による B 細胞活性化因子の変動と糖鎖異常 IgA 産生の評価

grouped ddY マウスに TLR9 のリガンドである CPG-ODN を投与することで、TLR9 を介するシグナルによる糖鎖異常 IgA の産生や BAFF/APRIL の発現の変化を評価し、骨髄/脾臓の単核球での TLR9 シグナルへの応答性を評価する。

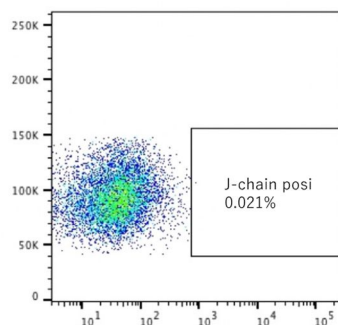
#### (3) 骨髄/脾臓のメモリーB細胞や長寿型形質細胞に及ぼす BAFF/APRIL 中和抗体の影響の評価

grouped ddY マウスの脾臓/骨髄におけるメモリーB細胞や長寿型形質細胞と BAFF/APRIL の中和抗体とを共培養することで上記細胞の生存と IgA・糖鎖異常 IgA1 の抑制効果を認めるのかどうかを検証する。

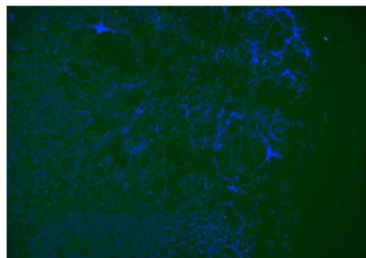
### 4. 研究成果

#### (1) IgA 腎症モデルマウスを用いた骨髄/脾臓の粘膜型責任細胞の分離と特性の解明

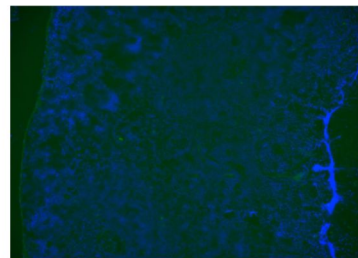
当研究室で樹立された IgA 腎症自然発症モデルである gddY マウスや、マウスの骨髄移植による IgA 腎症再構成、APRIL 発現細胞の同定などの技術を駆使することで、IgA 腎症における B 細胞分化誘導因子の機能解析を目指した。まず、J 鎖陽性粘膜型 IgA 陽性形質細胞をフローサイトメトリーの手法を用いて、マウスの骨髄・脾臓・リンパ節から選択的に抽出することを試みたものの抽出が困難であった。また、抗 BAFF 抗体/抗 APRIL 抗体等を用いた染色によって J 鎖陽性 IgA 陽性形質細胞の各組織における特徴を解析することも試みたが、こちらも染色条件が確立できなかった。



CD19陽性細胞中のJ-chain陽性細胞は0.021%と少なく抽出困難であった



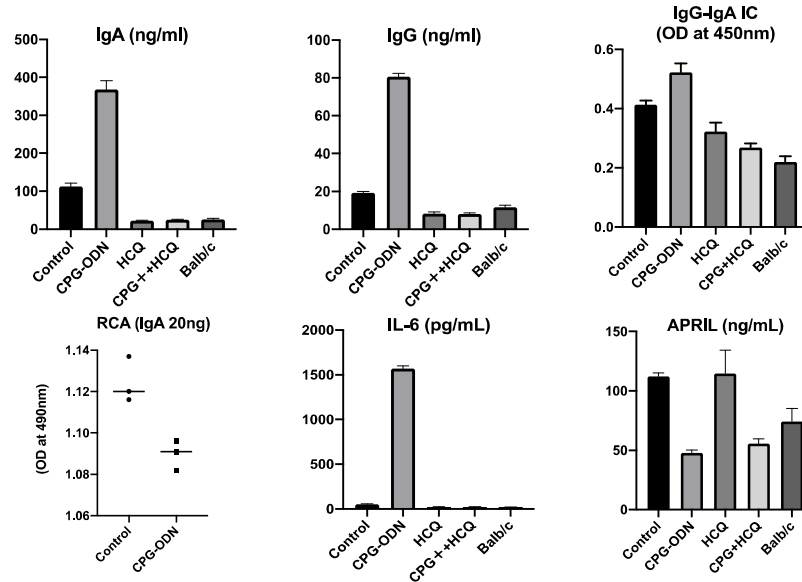
マウス脾臓 BAFF染色(FITC)



マウス脾臓 APRIL染色(FITC)

## (2) 骨髄/脾臓の粘膜型責任細胞への TLR9 刺激による B 細胞活性化因子の変動と糖鎖異常 IgA 産生の評価

上記で述べたように今回の検証では粘膜型 (J-chain 陽性) リンパ球の抽出が困難であったことから、脾臓細胞から抽出した CD19 陽性細胞に対し、TLR9 刺激を行なった。具体的には、TLR9 のリガンドである CPG-ODN による刺激を加えた場合や TLR9 の阻害作用が知られているヒドロキシクロロキン (HCQ) を加えた際の培地中の IgA、IgG、IgG-IgA 免疫複合体 (IC)、ガラクトース欠損型 IgA の割合 (ガラクトースを特異的に認識する RCA を用いて評価)、APRIL 濃度を測定した。また、コントロールとして、Balb/c マウスの脾臓から抽出した CD19 陽性細胞についても同様に検討した。

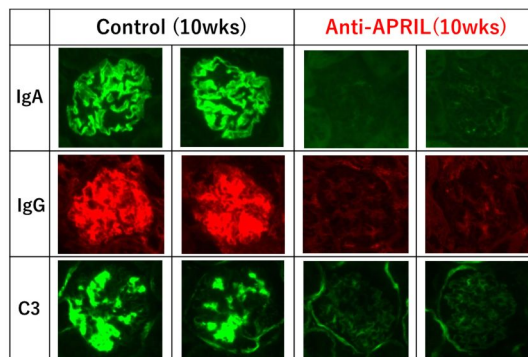


培地中の IgA、IgG、IgG-IgA IC は TLR9 刺激によって上昇し、ガラクトース欠損型 IgA の割合についても上昇を認めた。IL-6 は糖転移酵素である C1GALT1 を抑制することで、ガラクトース欠損型 IgA 産生に関与することが報告されているため、培地中の IL-6 についても測定したところ、TLR9 刺激により著明な IL-6 上昇を認めた。また、APRIL についても測定したが、APRIL は TLR9 刺激で産生が低下しており、既報とは解離した結果であった。

今回は粘膜型 IgA 産生の責任細胞を用いて検証できていないため、実験条件のさらなる検討が必要である。

## (3) 骨髄/脾臓のメモリーB細胞や長寿型形質細胞に及ぼす BAFF/APRIL 中和抗体の影響の評価

メモリーB細胞や長寿型形質細胞についてもフローサイトメトリーによる同定や抽出ができていないため、今回の検証では評価できていない。しかしながら、抗 APRIL 抗体をモデルマウス (gddY マウス) に投与する実験では、腎糸球体上の免疫グロブリンや補体沈着の消失を確認できており、APRIL が IgA 腎症において、腎炎惹起性 IgA 産生に関与していることは間違いないと考えられる。今後さらなる条件検討を行い、詳細な *in vitro* での評価を行いたい考えである。



研究全体を通じての総括としては、マウスの各組織からの IgA 陽性形質細胞の抽出方法を確立できず、詳細な解析が困難であった。骨髄組織や脾臓でのそもそもの粘膜型 IgA 産生形質細胞の数が少ない可能性や今回使用した抗体がうまくワークしていない可能性などが考えられた。今後は、リンパ組織から粘膜型 IgA 産生形質細胞を抽出する手法を確立するため、さらなる実験条件に関する検討が必要と考えている。

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
研究分担者	鈴木 仁  (Suzuki Hitoshi)  (10468572)	順天堂大学・医学部・教授   (32620)	
研究分担者	鈴木 祐介  (Suzuki Yusuke)  (70372935)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授   (32620)	

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