

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580415

研究課題名(和文) 実験的肝毛頭虫症におけるクリオグロブリン血症と糸球体腎症の病態解明

研究課題名(英文) Pathological analysis of cryoglobulinemia and glomerulonephropathy in experimental *Capillaria hepatica* infection

研究代表者

代田 欣二 (Shirota, Kinji)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：70147974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、肝毛頭虫(*C. hepatica*)の虫卵経口接種による実験的クリオグロブリン(CG)血症マウスモデルを確立し、本病態がモノクローナルなIgM型RFとポリクローナルなIgAから構成される型CG血症であることを証明した。

また、CG血症発症の初期段階には、虫体刺激によるIgM RF産生B-1a細胞の選択的増殖の過程があり、発症には、1) IgM RF産生細胞として脾臓B-1a細胞、2) IgM RF産生B-1a細胞の増殖、3) IgM産生のトリガーとしての特異抗原、4) CG血症の促進因子としてIL5が必須であることを示した。

研究成果の概要(英文)：This study established the mouse model of experimental cryoglobulinemia induced by oral administration of *Capillaria hepatica* eggs, and revealed that the induced cryoglobulinemia was consistent with type II cryoglobulinemia which was characterized by monoclonal IgM rheumatoid factor (RF) and polyclonal IgA. The experimental study showed that selective proliferation of IgM RF-producing B-1a cells induced by stimulation of the parasites occurred in the early phase of the cryoglobulinemia, and also demonstrated that following factors or events are essential for the onset of this cryoglobulinemia: 1) the splenic B-1a cells as IgM RF-producing cell, 2) proliferation of B-1a cells, 3) the specific parasitic antigen as a trigger of IgM production, 4) IL-5 as a cryoglobulinemia promoting factor.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：動物生命科学・獣医学

キーワード：クリオグロブリン 免疫病理 寄生虫 病理

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) クリオグロブリン血症の定義と分類について

クリオグロブリンは、体温(37℃)より低い温度で沈殿し、37℃に加温することで再溶解する免疫グロブリンと定義されている。クリオグロブリンによる病態はクリオグロブリン血症と呼ばれ、クリオグロブリンを構成する免疫グロブリンの性状から、3型(I型、II型、III型)に分類され、単一の免疫グロブリンからなる単クローン性クリオグロブリン血症(I型)と、複数の免疫グロブリンからなり、一つ以上の因子がリウマトイド因子陽性である混合型クリオグロブリン血症(II型およびIII型)に大別される。混合型クリオグロブリン血症の多くは、hepatitis C virus (HCV)、hepatitis B virus (HBV)、Epstein-Barr virus (EBV)などの病原体感染に伴って起こる。

### (2) 病原体感染に起因したリンパ球増殖性疾患としての混合型クリオグロブリン血症

感染に伴って発症する混合型クリオグロブリン血症は、病原体の抗原駆動性(antigen-driven)に単クローン性(II型)または、少クローン性(III型)のIgM RF産生Bリンパ球の増殖性が起こることが発症の原因になる。特定のIgM RF産生Bリンパ球が選択的に増殖する機序は、クリオグロブリン血症の病理発生を明らかにするうえで重要な機序であるにもかかわらず、いまだ不明な点が多い。選択的増殖が起こるメカニズムは、特定の抗原を認識するBリンパ球が、適当な条件下で、抗原刺激を受けクローナルに増殖することが想定されるが、IgM RFを産生する細胞の性状や引き金となる特異抗原については、様々な報告があり、いまだ確定的なものはない。また、選択的増殖が進行するうえで適当な宿主免疫状態の解析は、解析の困難さから、ほとんど行なわれていないの

が現状で、下記の～の解明が必要である。

選択的Bリンパ球の増殖の引き金となる特異抗原について

混合型クリオグロブリン血症は、その最大の病因因子であるHCVの感染患者の臨床検体で最もよく研究がなされている。HCV慢性感染は、混合型クリオグロブリン血症やNon-Hodgkin Lymphomaといったリンパ球増殖性疾患を引き起こす。増殖したBリンパ球の多くは、V<sub>H</sub>1-69によりコードされた高度に制限された免疫グロブリン可変領域を発現している。そして、このV<sub>H</sub>1-69によりコードされたBリンパ球の可変領域の塩基配列は、HCV構造タンパクE2に対する中和抗体の可変領域の塩基配列と高い相同性を持つことが示された(De Re, 2000; Chan, 2001)。選択的Bリンパ球増殖へのHCV E2の直接的な関与は証明されていないが、この知見は、特異抗原によるBリンパ球の刺激が、クリオグロブリン血症進行の重要な因子であることが示唆するものである。しかしながら、その他の感染随伴性クリオグロブリン血症において、特異抗原同定の報告はない。特異抗原がBリンパ球の選択的増殖の引き金としてどのように機能するかを解明するためには、複数の特異抗原を同定し、その抗原構造の共通性を比較解析することが、その解明の助けになると考えられる。

クリオグロブリン血症の進行に関わる宿主Th1/Th2免疫応答について

混合型クリオグロブリン血症の発症機序への特異抗原の重要性が示唆される一方で、クリオグロブリン血症の病態は、それだけでは説明できない。感染に起因したリンパ球増殖疾患は、多段階を経て発症すると想定されている。このメカニズムは、ポリクローナルに活性化したBリンパ球のうち、ある条件下で、少数クローン(オリゴクローナル)のBリンパ球が選択的に増殖し、さらに何らかのメカニズムで単一のクローンが活性化すれ

ば、モノクローナルに B リンパ球が増殖するという、多段階的な選択を経てモノクローナルな増殖に至ると説明される。この仮説を証明するためには、それぞれの選択段階に進むために必要な好適条件を明らかにする必要があり、そのためには、それぞれの段階の時点での宿主免疫状態を評価しなければならない。HCV 関連クリオグロブリン血症では、Th1 に偏向した宿主免疫状態が病態進行に促進的に働くことを示唆されている。しかし、これら研究の対象は、慢性化したクリオグロブリン血症患者から採取したサンプルであり、病態の増悪化に關与する免疫状態は評価できても、初期に起こる選択的な増殖が起こる段階での宿主 Th1/Th2 状態を正確に評価しているとはいえない。慢性感染症に随伴して発生する病態であり、臨床検体で病態の初期を評価することは困難である。初期メカニズムを解明するためには、病原体感染に起因した選択的な B リンパ球の増殖を評価できる動物モデルが必要である。

クリオグロブリン血症で増殖する CD5+ B リンパ球について

HCV 感染によるクリオグロブリン血症患者において、CD5+ B リンパ球がクローナルに増殖することが報告され、CD5+ B リンパ球が IgM RF 産生細胞であることを示唆される一方で、それに矛盾する結果も報告され、IgM RF 産生細胞の性状は完全に解明されているわけではない。CD5+ B リンパ球は、マウスにおける B-1a 細胞に相当する細胞であり、その増殖、活性化には、Interleukin 5 (IL5) が必須であるとされる。Mizuochi らは、HCV 関連クリオグロブリン血症患者血漿中の IL5 濃度を測定したが、健常者と有意な差がなかったことを報告しており、IL5 の病態への関与は不明である。

### (3) クリオグロブリン血症の動物モデル

クリオグロブリン血症の動物モデルは少

なく、3 つの動物モデルが報告されるのみである。一つ目は、thymic stromal lymphopoietin (TSLP) を過剰発現したトランスジェニックマウスであり、ポリクローナルなリンパ球の増殖が起こり、1 型クリオグロブリン血症を発症する。二つ目のモデルは、クリオグロブリン産生能を持つハイブリドーマ細胞を移植したマウスであり、1 型クリオグロブリン血症を発症する。上記 2 つの動物モデルは、主に、クリオグロブリンが沈着したことで誘発される炎症反応の進行メカニズムを解明するために利用されている。これら動物モデルは、1 型クリオグロブリン血症とはクリオグロブリンを構成する免疫グロブリンの性状が異なり、また、クリオグロブリン血症の発症までに、特異抗原の感作や B リンパ球の選択的増殖の過程を持たない。そのため、上述したクリオグロブリン血症の初期に起こる B リンパ球の増殖メカニズムの解析に用いることができない。3 つ目の動物モデルは、本研究で確立した *C. hepatica* 感染クリオグロブリン血症マウスモデルである。このモデルの特徴は、感染した全個体において、個体間で発症時期にばらつきがなく 1 型クリオグロブリン血症を発症することである。これにより、感染から発症に至るまでの過程を、段階的に分けて評価することが初めて可能になった。臨床検体やこれまでの動物モデルでは、解析することが困難であったクリオグロブリン血症の初期段階を解析するのに適している点が、このモデルを利用する最大の利点である。

## 2. 研究の目的

(1) *C. hepatica* のマウス実験感染によるクリオグロブリン血症の実験モデルとしての有用性に着目し、*C. hepatica* 実験感染によるクリオグロブリン血症のマウスモデルを確立し、その病態解析を行うこと

(2) 本マウスモデルの利点を生かして、クリ

オグロブリン血症の発症初期段階におけるリンパ球増殖とクリオグロブリン産生の機序を解明すること

### 3. 研究の方法

#### (1) *Capillaria hepatica* 実験感染による型クリオグロブリン血症マウスモデルの確立

*C. hepatica* 実験感染クリオグロブリン血症マウスモデルの確立を目的として、ICR マウスを用いて *C. hepatica* の幼虫形成卵の経口接種を行い感染率、全身臓器の光学顕微鏡的变化、腎系球体における超微形態学的変化、血清 CG の検出 (CG 形成試験および

immunoglobulin の鎖、鎖、 $\mu$ 鎖、鎖、鎖に対する western blotting) 血清リウマチ因子 (Rheumatoid factor, RF) の検出を接種後 30 日まで経時的に検索した。

#### (2) クリオグロブリン血症発症初期段階における病態の解明

確立したモデルにおけるクリオグロブリン産生細胞の選択的増殖の機序を解明することを目的とし、クリオグロブリンを形成する IgM が認識する虫体特異抗原 (感染マウス血清およびクリオグロブリンを用いた虫体抗原に対する western blotting および虫体標本を用いた免疫蛍光法)、IgM RF 産生細胞の性状 (リンパ球マーカーを用いたフローサイトメトリ-および脾臓の免疫蛍光法、単離リンパ球に対する抗原刺激試験)、クリオグロブリン産生細胞の増殖促進因子 (血中サイトカインの ELISA、BALB/c と C57BL/6、IL-5 トランスジェニックマウスを用いた虫体抗原刺激実験) の解析を行った。

#### (3) 増殖後の B-1a 細胞における B 細胞活性化抑制因子 Stra13 の発現の解析

本モデルでは虫卵接種後 24 日以降に血中クリオグロブリン量が減弱することから、IgM RF 産生 B-1a 細胞の増殖抑制機序に焦点をあて、増殖抑制因子である Stra13 の単離 B-1a 細胞における mRNA の RT-PCR を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) *Capillaria hepatica* 実験感染による型クリオグロブリン血症マウスモデルの確立

*C. hepatica* の経口接種を受けた全例 (15/15 匹) のマウスの肝臓に感染が成立し、接種後 20 日で血清中にクリオグロブリンの形成を認めた。さらに、本病態がモノクローナルな IgM 型 RF とポリクローナルな IgA から構成される型クリオグロブリン血症であることを示し、感染に起因する II 型クリオグロブリン血症の実験動物モデルを確立した。(発表論文)

#### (2) クリオグロブリン血症発症初期段階における病態の解明

接種後 24 日のクリオグロブリン中 IgM は、約 75kDa の虫体抗原に特異的に反応し虫体の消化管に結合したことから、クリオグロブリンは虫体特異抗原に対して結合する IgM で構成されることが示された。また、脾臓赤脾髄で  $\mu$ 鎖+鎖+CD45R/B220+CD5+ の B-1a 細胞が増殖しており、単離 B-1a 細胞は虫体抗原刺激により約 1,100bp の IgM 可変領域 mRNA を発現する細胞群が増殖し、約 75kDa の虫体抗原に特異的に結合する IgM の産生を亢進したことから、虫体刺激によって選択的に増殖した脾臓の IgM+ + B-1a 細胞がクリオグロブリン産生細胞であることが示唆された。さらに、感染後のクリオグロブリン産生および血中 IgMRF 産生が C57BL/6 と比べ BALB/c マウスで血中 IL-5 の上昇を伴って優位に高値を示したことから、虫体抗原刺激によって IL-5 トランスジェニックマウスでのみクリオグロブリン血症が惹起されたことから、感染による Th2 免疫応答は、IL5 を上昇させるために重要であり、クリオグロブリン血症の進行に必須の因子は IL5 であることが示された。

#### (3) 増殖後の B-1a 細胞における B 細胞活性化抑制因子 Stra13 の発現の解析

非感染マウスの B-1a 細胞には Stra13 は発

現していなかったが、接種後 24 日の B-1a 細胞には強い発現が認められた。また、虫体抗原刺激により B-1a 細胞における Stra13 発現が低下し、細胞増殖、IgM 産生が亢進することから、この抑制機序が可逆的であることが示唆され、虫体の特異抗原が Stra13 発現制御に参与していることが考えられた。

#### 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 1 件)

Aihara N, Chambers JK, Hosono K, Kamiie J, Shirota K. An experimental type II mixed cryoglobulinemia with renal glomerulopathy in ICR mice triggered by *Capillaria hepatica* infection. *Histol Histopathol*. 2011;26(12):1519-29. 査読有 DOI: 10.1111/j.1365-2605.1993.tb01156.x

〔学会発表〕(計 8 件)

AIHARA Naoyuki, YAMADA Moe, MAMIIE Junichi, SHIROTA Kinji Monoclonal B-1a cell expression and rapid acquisition of an exhausted phenotype in a *Capillaria hepatica*-induced cryoglobulinemia mouse model.

2013 日本免疫学会総会・学術集会、2013 年 12 月 11 日～12 月 13 日、幕張市

N. Aihara, M. Yamada, J. Kamiie, K. Shirota. Identification of Cryoglobulin Producing Cells in *Capillaria hepatica*-infected Cryoglobulinemia Mouse Model. The American College of Veterinary Pathologists, 2013 Annual Meeting.

2013 年 11 月 16 日-20 日、Montreal, Canada

市川いおり、相原尚之、山田萌、櫻村茜、藤田良由貴、上家潤一、代田欣二 *Capillaria hepatica* 感染マウスにおけるクリオグロブリン腎症の病態解析

第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日～22 日 岐阜市

山田萌、相原尚之、櫻村茜、上家潤一、代田欣二 *Capillaria hepatica* 感染マウスにおいて Th2 に偏向した宿主免疫は CG 血症を促進する。第 29 回日本毒性病理学会学術集会、2013 年 1 月 31 日～2 月 1 日 つくば市

相原尚之、山田萌、櫻村茜、上家潤一、代田欣二 *Capillaria hepatica* 感染 II 型クリオグロブリン血症マウスモデルにおいて増殖する B 細胞の同定。第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 14 日～16 日 盛岡市

相原尚之、山田萌、櫻村茜、上家潤一、代田欣二 *Capillaria hepatica* 感染 ICR マウスモデルにおけるクリオグロブリンの虫体抗原に対する反応性の解析。第 28 回日本毒性病理学会学術集会、平成 2012 年 2 月 2 日、東京

山田萌、相原尚之、櫻村茜、高橋映理佳、若林伸、上家潤一、代田欣二。異なる免疫反応が *Capillaria hepatica* 感染マウスにおける病態形成に与える影響の解析  
第 28 回日本毒性病理学会学術集会、平成 2012 年 2 月 2 日、東京

N. Aihara, J.K. Chambers, K. Hosono, J. Kamiie, K. Shirota. Experimental infection of *Capillaria hepatica* induces type II cryoglobulinemia with glomerulopathy in iCR mice. The American College of Veterinary Pathologists, 62<sup>nd</sup> Annual Meeting. 2011 年 12 月 3 日-7 日、Nashville, TN, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

代田 欣二 (SHIROTA, Kinji)

研究者番号：70147974

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

上家潤一  
相原尚之  
山田萌  
櫻村茜  
市川いおり  
高橋映理佳  
若林 伸  
Chambers, J. K.