

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860690

研究課題名(和文) 分子標的治療を目指した、IgA腎症の病態におけるAPRILの病因的役割の解明

研究課題名(英文) Aberrant APRIL expression in tonsillar germinal center B cells in IgA nephropathy

研究代表者

橋本 梓 (Hashimoto, Azusa)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50646106

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)：IgA腎症患者(IgAN)口蓋扁桃胚中心(GC)において、B細胞の分化に関わるサイトカインであるAPRILの発現上昇を認め、その発現量と疾患重症度、血清IgG-IgA免疫複合体および口蓋扁桃摘出術とステロイドパルス併用療法の治療効果との間に相関を認めた。また、口蓋扁桃GCのAPRILの主要な産生源がB細胞であることが判明し、外来抗原によりTLR9活性化を介し過剰に発現したB細胞由来のAPRIL variantを含むAPRILがGC B細胞の延命に関与し、glycan specificまたはpolyreactiveな内因性抗体産生を介し免疫複合体形成に関わり、腎症進展に寄与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Up-regulation of APRIL from tonsillar germinal center (GC) B cells in IgA nephropathy (IgAN) patients was observed. The expression levels of APRIL in tonsillar GC were correlated with the urinary protein levels, treatment responses such as decrease of proteinuria after tonsillectomy combined with steroid pulse therapy, and the serum levels of IgG-IgA immune complex (IC) in IgAN patients. We also found that this up-regulation of APRIL consists of not only soluble APRIL (APRIL- ), but also membrane bound APRIL such as APRIL- . Up-regulation of tonsillar TLR9, and the correlation between the expression levels of TLR9 and those of APRIL- or APRIL- in tonsillar GC B cells were also found in IgAN. Taken together, aberrant expression of APRIL, partly with APRIL variants, from tonsillar GC B cells induced by TLR9 activation could be critical in the progression of IgAN, presumably via production of anti-glycan or poly-reactive antibodies prior to IC formation with Gd-IgA1.

研究分野：免疫

キーワード：IgA nephropathy tonsil APRIL TLR9

### 1. 研究開始当初の背景

A proliferation-inducing ligand (APRIL) は、B細胞および形質細胞の分化・延命に中心的な役割を担うサイトカインである。APRIL は SLE などの自己免疫疾患において自己抗体産生 (*Arthritis Rheum.* 2009;60(7):2083-2093)や、B細胞性慢性リンパ性白血病などの悪性リンパ腫において腫瘍化した B細胞のアポトーシス回避に関与していることが明らかにされてきている (*Blood* 2004;103:679-688)。近年、APRIL と IgA 腎症の病因の関連が示唆され、IgA 腎症患者は健康者と比較し血清 APRIL が高値であり、血清 APRIL の値が尿蛋白量と相関すると報告されている (*J Clin Invest* 2011;121:3991-4002)。また、Genome-Wide Association Study(GWAS)により IgA 腎症の疾患感受性候補領域として、APRIL を含む領域があがっている (*Nat Genet.* 2012;44(2):178-182)。しかしながら、APRIL の産生部位や産生細胞、病因との関連については明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

IgA 腎症の病因に粘膜免疫異常、特に口蓋扁桃における免疫異常が示唆され、口蓋扁桃摘出術とステロイドパルス併用療法(扁桃摘出術)の効果を示唆する報告があるが、その理論的根拠の解明には至っていない。そこで今回 APRIL の側面から扁桃免疫に着目し、IgA 腎症患者口蓋扁桃における APRIL の発現を検証し、その責任細胞、分子メカニズムおよび臨床的意義を検証することを目的とした。IgA 腎症においては糖鎖異常 IgA 産生とそれに対する内因性抗体産生が病因に関与していることが示唆されていることから、口蓋扁桃における APRIL 発現との関連も併せて検証する。これまで IgA 腎症患者口蓋扁桃における APRIL 発現の検証や、口蓋扁桃における APRIL 発現と臨床経過や病因との関連を詳細に検討した報告は皆無である。口蓋扁桃における APRIL に関連した免疫異常の解明は、扁桃摘出術の理論的根拠のつながる可能性が高いと思われる。

### 3. 研究の方法

(1) IgA 腎症患者とコントロールとして慢性扁桃炎患者の口蓋扁桃における APRIL と、そのレセプターである TACI(transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor)、BCMA(B-cell maturation antigen)および TLR9 (Toll like receptor 9) の mRNA 発現量を real-time PCR で解析した。

(2)口蓋扁桃摘出術とステロイドパルス併用療法(扁桃摘出術)が施行された IgA 腎症患者(IgAN)56名および慢性扁桃炎患者(CT)12名の口蓋扁桃における APRIL 発現量と、臨床

経過の関連を検討した。

(3)APRIL 産生細胞に特異的な抗体である Stalk-1 を用い、IgAN と CT の口蓋扁桃の免疫染色 (IHC) を行い、口蓋扁桃における APRIL 産生細胞の局在と程度を比較検討した。

(4)Stalk-1 を用いた口蓋扁桃の IHC の染色特性、特に胚中心(GC)における染色性と、疾患活動性として尿潜血や尿蛋白、血清糖鎖異常 IgA、血清糖鎖異常 IgA 免疫複合体の他、扁桃摘出術の治療効果との関連を評価した。

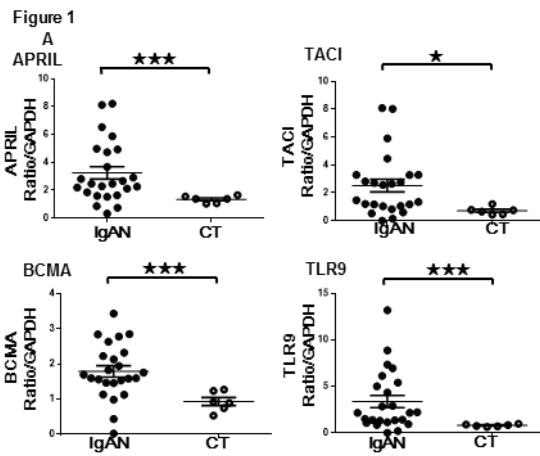
(4)IgAN の口蓋扁桃における APRIL 産生細胞を明らかにするため、Stalk-1 と樹状細胞、好中球および B細胞のマーカーを用い、IHC やフローサイトメトリー(FCM)の解析を行った。

(5)IgAN 口蓋扁桃における APRIL 産生細胞と分泌された APRIL の関係を検証するため、Stalk-1 と、APRIL 産生細胞に特異的な抗体である Aprilin-2 の 2重染色を行った。また、口蓋扁桃 B細胞が発現している APRIL variant を明らかにするため、IgAN と CT の口蓋扁桃 B細胞における APRIL alpha (wild type)、APRIL delta の発現量を RT-PCR で検証した。今回用いた APRIL delta primer が APRIL delta の他、APRIL delta と同様 furin cleavage site の欠損した APRIL zeta も増幅させるため、IgAN および CT の口蓋扁桃 B細胞における APRIL delta primer による PCR 産物の sequence を行い、PCR 産物の内容と割合を検証した。

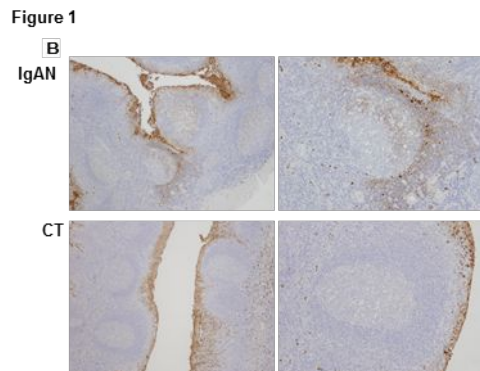
(6) IgAN および CT の口蓋扁桃 B細胞における APRIL alpha、APRIL delta および TLR9 の mRNA 発現量を real-time PCR で解析した。さらに、B cell line Raji に TLR9 のリガンドである CpG で刺激を行い APRIL 発現上昇を認めるかどうかと、CpG に加え TLR9 antagonist 投与により APRIL 発現に低下がみられるか In Vitro の実験で検証した。

### 4. 研究成果

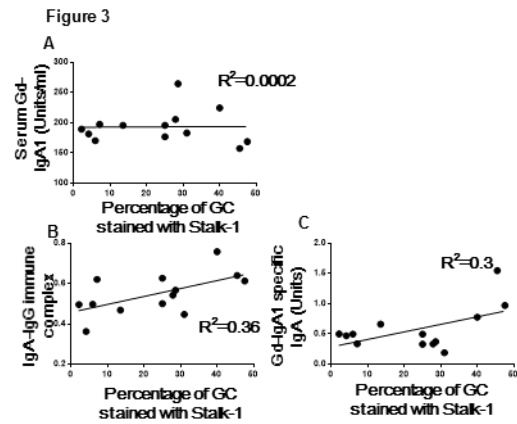
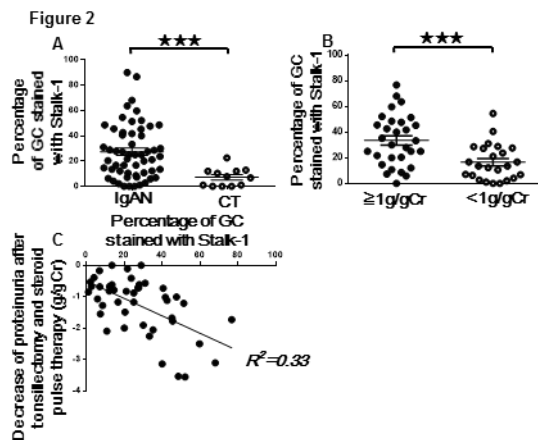
(1)口蓋扁桃における APRIL およびそのレセプターである TACI(transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor)、BCMA(B-cell maturation antigen)、TLR9(Toll like receptor 9)の mRNA 発現量は、CT と比較し IgAN で有意に高値であった (Figure.1A  $P<0.05$ )。



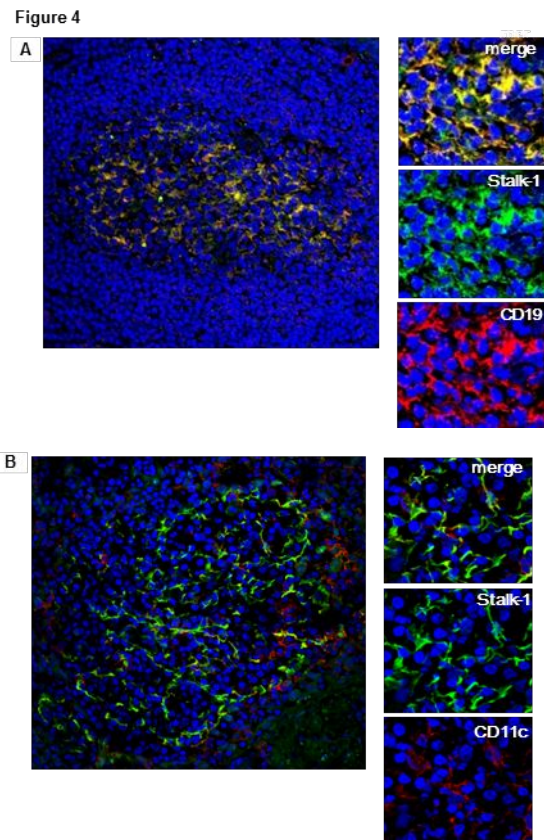
(2) IHCにおいて、CTと比べIgANの口蓋扁桃胚中心(GC)で多くのAPRIL産生細胞が確認された(Figure.1B)。また、IgAN口蓋扁桃GC内細胞におけるStalk-1の染色所見は、扁桃上皮や多核白血球の染色所見と異なっていた。



(3) IgANの口蓋扁桃GCのStalk-1陽性率(Stalk-1陽性細胞を伴うGCの割合)は、CTと比較し有意に高値であり( $P=0.0005$ )、尿蛋白量( $P=0.0017$ )、扁桃摘パルス後の尿蛋白低下量( $P=0.0003$ )と相関を認めた(Figure.2A-C)。また、血清IgG-IgA免疫複合体との相関( $P=0.0304$ )が確認されたが、糖鎖異常IgA1との間に相関関係は認めなかった(Figure.3A-C)。



(4) IHCおよびFCMにより、IgANの口蓋扁桃GCにおける主要なAPRIL産生細胞が、通常APRILを産生しないとされているCD19+B細胞である可能性が示唆された(Figure 4, 5)。一方、IHCで、IgANの口蓋扁桃GCにおいて、APRILを産生することが報告されている樹状細胞のマーカであるCD11cとStalk-1とのco-localizeは、一部であった(Figure.4B)。









severity of IgA nephropathy. The ASN  
(American Society of Nephrology) 46th  
Annual Meeting, Atlanta, USA, 2013

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 梓 (HASHIMOTO Azusa)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50646106

### (2) 研究協力者

富野 康日己 (TOMINO, Yasuhiko)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：

鈴木 祐介 (SUZUKI, Yusuke)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70372935

武藤 正浩 (MUTO, Masahiro)

順天堂大学・医学部・大学院生

研究者番号：なし