

平成 29 年 9 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460449

研究課題名(和文) IgA腎症に対する扁桃摘出・ステロイドパルス療法の効果に関する分子・病理学的研究

研究課題名(英文) The study on the effect of tonsillectomy combined with steroid pulse therapy against IgA nephropathy

研究代表者

城 謙輔 (Joh, Kensuke)

東北大学・医学系研究科・客員教授

研究者番号：10057086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：IgA腎症を完治させる画期的治療法として扁桃摘出ステロイドパルス療法の適応についての基準がない。そこで、扁桃パルス療法により寛解する因子を解析した結果、1年後の尿蛋白寛解に、間質の線維化%(IF)と腎生検時の一日尿蛋白量(PU)が独立した予後予測因子となった。カットオフ値は、IFが25%、PUは0.43gで、それにより1年後の寛解を78%の確率で予測できた。

IgA腎症発症に扁桃炎が関与する機序に関して、IgA腎症扁桃炎が慢性扁桃炎に比して担IgA形質細胞の比率が高く、CD208陽性樹状細胞を中心に持つT細胞結節が優勢で活動性半月体と関連し、パルス療法に扁桃摘出が併用される根拠が示された。

研究成果の概要(英文)：Tonsillectomy (TL) combined with steroid pulse therapy (SPT) has become a major choice against IgA nephropathy (IgAN) in Japan. The purpose was to figure out the factors preventing proteinuric remission (PUR) at 1 yr after the therapy and to contribute the indication of TL with SPT. PUR was found in 119 pts out of 194 pts (81%) at 1 year after. ROC analysis showed that cut off points, which were critical for a dichotomous classification of proteinuric remission, were 25% of interstitial fibrosis and 0.43 g/day of a grade of proteinuria, respectively. With these 2 parameters, PUR was predicted with 78% of probability. Tonsil is a unique organ causing initial and progressive events to generate IgAN. Comparing the features of the IgAN tonsillitis with chronic tonsillitis, the number of T lymphocyte nodules with assembly of CD208-positive dendritic cells and the grade of lymphoepithelial involution correlated with frequency of crescent and segmental sclerosis in the kidney, respectively.

研究分野：人体病理学

キーワード：IgA腎症 寛解 扁桃摘出 扁桃炎 樹状細胞 腎生検

1. 研究開始当初の背景

我が国で最も頻度の高い慢性腎疾患である IgA 腎症の治療に関しては、従来、IgA 腎症の進展を遅らせる治療法しかなかった状況下において、JCHO 仙台病院では、扁桃摘出とステロイドパルス療法の併用療法（扁桃摘出療法）により、IgA 腎症を完治させる画期的治療法を世界に先駆けて行った。一方、欧米においては未だ扁桃摘出療法に積極的でなく、その有効性に関する論文がない。国内では、厚生労働科学研究費・進行性腎障害に関する調査研究において、扁桃摘出療法の有効性に関するランダム化比較試験を行い、1年予後の有効性が確認された（Kawamura et al. Nephrol Dial Transplant. 29:1546-53, 2014）。そのため、扁桃摘出療法への流れが国内で加速しているが、その適応については、未だ統一された基準がない。

2. 研究の目的

扁桃摘出療法を施行した IgA 腎症症例を用いて、扁桃における IgA 腎症の特異的病変を定量化し、さらに腎病変を定量化して、扁桃摘出療法による血尿・蛋白尿寛解と腎組織との相関を統計学的に解析する。それにより寛解に到達する臨床病理学的予測式を算出して治療効果の実態を把握し、その臨床病理学的適応基準を作成する。一方、IgA 腎症における扁桃炎と腎炎発症との組織学的連関に関する因子を求め、さらに、扁桃摘出療法を分子生物学的に解析して扁桃の IgA 腎症発症に関する機序を解析する。

3. 研究の方法

(1) 腎生検による IgA 腎症扁桃摘出療法の治療効果の予測に関する研究

IgA 腎症に対する扁桃摘出療法症例について、治療実施後1年時点での扁桃摘出療法の寛解基準に従って、A群（血尿陰性、蛋白尿陰性）、B群（血尿陽性、蛋白尿陰性）、C群（血尿陰性、蛋白尿陽性）、D群（血尿陽性、蛋白尿陽性）の4群にわける。一方、治療開始前の腎生検組織像について、オックスフォード基準により IgA 腎症の組織学的重症度分類ならびに各病変の定量化を行う。そして、以下の作業仮説のもとに A 群～D 群を選別する臨床病理学的因子を統計学的に検討する。

(2) IgA 腎症の扁桃炎と腎系球体病変との連関に関する分子病理学的研究

IgA 腎症扁桃炎、移植後の IgA 腎症扁桃炎、そして、慢性扁桃炎の扁桃を用いて、B 細胞と T 細胞の分布構成、リンパ濾胞の構造変化、担 IgA、IgG 形質細胞の分布構成、HLA-DR 陽性細胞と血管内皮 (CD34) の分布、樹状細胞 (CD208, CD209, CD303) の分布構成、陰窩上皮の網状化とリンパ上皮共生の阻害を定量的に調べ、IgA 腎症扁桃炎の特殊性を慢性扁桃炎と比較することにより浮き彫りにする。さらにオックスフォードの定義による各種系球体病変と上記の扁桃病変との定量的関連を統計学的に解析する。扁桃で産生される分子（免疫グロブリン、サイトカイン、TLR）や扁桃に存在するリンパ球が、血流を介して腎臓に到達して炎症を惹起していることを想定して、扁桃摘出後の患者血清中の炎症性サイトカインを測定する。また、扁桃のケモカイン産生リンパ球、regulator T 細胞を解析して、系球体病変を惹起する細胞性免疫の諸因子を追跡する。これらの分子の発現は、酵素抗体法、定量 RT-PCR 法、トランスクリプトーム解析などの分子生物学的手法を用いて検討される。

4. 研究成果

(1) 腎生検による IgA 腎症扁桃摘出療法の治療効果の予測

に関する研究

JCHO 仙台病院において、2009年～2011年に扁桃パルス療法を施行されたIgA腎症症例のうち、治療1年後の血尿寛解により治療の有効性が確認された194例を対象とし、1年後の尿蛋白寛解に寄与する臨床病理学的因子を統計学的に解析した。腎生検時の臨床病理因子と1年後の尿蛋白寛解の相関はロジスティック解析にて行い、尿蛋白寛解に関連する因子のカットオフ値はROC解析にて決定した。194症例のうち尿蛋白寛解症例は157例(81%)であった。1年後の尿蛋白寛解に関連する因子として、間質線維化%(IF)と腎生検時の一日蛋白尿の程度(PU)が選ばれた。1年後の蛋白尿寛解・非寛解を振り分けるカットオフ値は、IFが25%(AUC=0.70)、PUは0.43g(AUC=0.79)であった。そこで、194症例を一日蛋白尿0.43g以上・未満、間質線維化25%以上・未満の基準で振り分けてスコア化し、蛋白尿非寛解をエンドポイントとしてロジスティック多変量解析を行った結果、間質線維化%IF(OR, 3.0; $p < 0.05$)と腎生検時の一日蛋白尿の程度PU(OR, 9.3; $p < 0.01$)は独立した予後予測因子であった。次に、この2つの因子を用いて蛋白尿非寛解に関する予測方程式を作製した($\text{Logit } P = f_{\text{PU}}(x) + f_{\text{IF}}(x) + \text{constant}$ ($f_{\text{PU}}(0)=0, f_{\text{PU}}(1)=2, f_{\text{IF}}(0)=0, f_{\text{IF}}(1)=1, \text{PU}(0) < 0.43\text{g/day}, \text{PU}(1) \geq 0.43\text{g/day}, \text{IF}(0) < 25\%, \text{IF}(1) \geq 25\%, \text{AUC } 0.78$)。IgA腎症患者の扁桃パルス1年後の寛解が、この予測式から78%の確率で予測できた。さらに、この予測式の実用性について検討した。東京都保健医療公社大久保病院の43症例を用い、一日蛋白尿0.43g、間質線維化25%の分岐点を用いた予測式による実測値では、60%の予測性は50%に低下した。しかし、一日蛋白尿の分岐

点を0.64gに挙げると60%の予測性が維持された。一日尿蛋白量と間質の線維化が治療1年後の蛋白尿非寛解を規定する臨床病理学的因子であったが、一日蛋白尿の分岐点の設定に施設間にズレが生じた。

(2) IgA腎症の扁桃炎と糸球体病変との関連に関する分子病理学的研究

IgA腎症の新しい治療法として、扁桃パルス療法が主流になったが、どうして従来のパルス療法に加えて扁桃が必要なのかの理由がわかっていない。そこで、IgA腎症における扁桃病変と糸球体病変との関連に着目した。これまでに、腎生検にて確認されたIgA腎症扁桃炎(Tons A)、IgA腎症の末期を意味するIgA腎症移植患者の扁桃(Tons TxA)そして、血尿を伴わない慢性扁桃炎(Tons C)の組織像を比較したところ、第1に、Tons AがTons Cに比して担IgA形質細胞の担IgG形質細胞に対する比率が高くなり、Tons TxAではその傾向が増強された。第2に、Tons AがTons Cに比較して、CD208陽性樹状細胞(DC-LAMP-3)と共局在を示すHLA-DR陽性細胞の集簇巣を中心にしたT細胞結節(T cell nodules: TNS)が優勢であった。第3に、リンパ上皮共生を示す陰窩上皮の網状化阻害(Involution of Lymphoepithelial symbiosis: ILES)がTons AとTons TxAにおいて目立っていた。

次に、TNSとILESの2つの病変を定量化して、Tons AとTons Cの特性を比較し、糸球体病変との関連を解析した。その結果、TCNスコアーではTons Aが 3.9 ± 0.7 、Tons Cが 3.0 ± 1.0 、ILESスコアーではTons Aが 1.9 ± 1.0 、Tons Cが 1.0 ± 0.9 とTons Aで有意に上昇していた

($p < 0.01$)。また、Tons A, Tons TxA (10例) Tons C の散布図において、カットオフ値を TCN スコアー 4, ILES スコアー 2 とすると、IgA 腎症診断の診断に関する特異度 (specificity) は 93.5%、感度 sensitivity は 71.6% であった。

Tons A の IgA 腎症系球体病変との関連においては、TCN スコアーと ILES スコアーが症例中の活動性半月体と分節性硬化の頻度にそれぞれ有意に相関した (線形重回帰 $p < 0.01$)。さらに、TCN スコアーと ILES スコアーは、パルス先行型 IgA 腎症扁桃炎と扁桃摘先行型 IgA 腎症扁桃炎において有意な差がなかった。以上、TCN スコアーと ILES スコアーは Tons A の指標となり、前者は系球体の活動性半月体に、後者は慢性分節性硬化に関連したが、パルス療法の影響を受けなかった。さらに、TCN の中心に DC LAMP-3 を認めたため、パルス療法単独で扁桃機能が回復したのちも、DC LAMP-3 により教育された memory T 細胞が、引き続き扁桃の輸出リンパ管から放出され、IgA 腎症の系球体毛細血管炎の発症に関与している可能性が示唆された。そのことにより、IgA 腎症治療においてパルス療法に扁桃が併用される根拠が示された。

扁桃に由来し、系球体病変を惹起する諸因子の扁桃内での分子発現を、分子生物学的手法を用いて IgA 腎症患者の扁桃を検討した。凍結した IgA 腎症患者の扁桃 (5 検体) と慢性扁桃炎の扁桃 (4 検体) の Total RNA を定量 RT-PCR 法にて増幅し、Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, Inc) によるトランスクリプトーム解析 (38,500 遺伝子) を行った。その結果、対照群に用いた慢性扁桃炎の扁桃に対

し、IgA 腎症患者の扁桃で異なる RNA 発現パターンを示す遺伝子は、Cancer 関連やリンパ腫関連などの 17 個の遺伝子に絞られた。

共同研究の成果として、IgA 腎症患者扁桃の慢性刺激に伴う Toll-Like Receptor (TLR) 9 が、扁桃におけるリンパ濾胞明中心の B 細胞を介して TNF family member a proliferation-inducing ligand (APRIL) の過剰産生を誘導して、糖鎖不全 IgA 1 の過剰産生に関与した。さらに、担 IgA 形質細胞の増加による IgA 産生能 (IgA class switching) を促進する因子として、リンパ濾胞の樹状細胞に発現する thymic stromal lymphopoietin (TSLP) が関与した。今回の定量 RT-PCR 法を用いたトランスクリプトーム解析により確認された遺伝子群と IgA 産生亢進に関与する分子との関連も解析する。

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 21 件)

a. 英文原著

1. Tanaka H, Joh K (3人中2番目)
Treatment of pediatric-onset lupus nephritis: a proposal of optimal therapy.
Clin Exp Nephrol. 2017 Mar 3. doi: 10.1007/s10157-017-1381-1. [Epub ahead of print] (査読有)
2. Muto M, Joh K (12人中4番目)
Toll-Like Receptor 9 Stimulation Induces Aberrant Expression of a Proliferation-Inducing Ligand by Tonsillar Germinal Center B Cells in IgA Nephropathy. J Am Soc Nephrol 2017;28:1227-1238.

- doi: 10.1681/ASN.2016050496. (査読有)
- 3 . Bellur SS, Joh K(47人中32番目)
Evidence from the Oxford Classification cohort supports the clinical value of subclassification of focal segmental glomerulosclerosis in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2017 ;91:235-243. (査読有)
doi: 10.1016/j.kint.2016.09.029.
 - 4 . Meng H, Joh K(19人中15番目)
Thymic stromal lymphopoietin in tonsillar follicular dendritic cells correlates with elevated serum immunoglobulin A titer by promoting tonsillar immunoglobulin A class switching in immunoglobulin A nephropathy. *Transl Res.* 2016 ;176:1-17. doi: 10.1016/j.trsl.2016.04.008. (査読有)
 - 5 . Hisano S, Joh K(7人中2番目)
Reproducibility for pathological prognostic parameters of the Oxford classification of IgA nephropathy: a Japanese cohort study of the Ministry of Health, Labor and Welfare. *Clin Exp Nephrol.* 2017 ;21:92-96. doi: 10.1007/s10157-016-1258-8. (査読有)
 - 6 . Imaizumi T, Joh K (10人中9番目)
Interferon-Stimulated Gene 15, a Type I Interferon-Dependent Transcript, Is Involved in a Negative Feedback Loop in Innate Immune Reactions in Human Mesangial Cells. *Nephron.* 2016;132(2):144-52. doi: 10.1159/000443934. (査読有)
 - 7 . Katafuchi R, Joh K(9人中3番目)
Pathological sub-analysis of a multicenter randomized controlled trial of tonsillectomy combined with steroid pulse therapy versus steroid pulse monotherapy in patients with immunoglobulin A nephropathy. *Clin Exp Nephrol.* 2016 20:244-52. doi: 10.1007/s10157-015-1159 (査読有)
 - 8 . Nakamura Y, Joh K(10人中10番目)
Solution for infusion prevents saline-induced ultrastructural artifacts of renal biopsy specimens. *Pathol Int.* 2015 Jul ; 65(7):374-8. doi: 10.1111/pin.12302. (査読有)
 - 9 . Ito T, Joh K (8人中7番目)
Severe intrinsic acute kidney injury associated with therapeutic doses of acetaminophen. *Pediatr Int.* 2015 Apr ; 7(2):e53-5. doi: 10.1111/ped.12607. (査読有)
 - 10 . Abe M, Joh K (12人中2番目)
Prominent hyperplasia of renin-producing juxtaglomerular apparatus after chronic and complete blockade of the renin-angiotensin system in adult IgA nephropathy. *CEN Case Rep.* 2015 Nov;4(2):228-32. DOI 10.1007/s13730-015-0177-y (査読有)
 - 11 . Suzuki Y, Joh K (8人中5番目)
Proposal of remission criteria for IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol.* 2014. 18:481-6. doi: 10.

1007/s10157-013-0849-x. (査読有)

1 2 . Imaizumi T , Joh K (10人中9番目)

Toll-like receptor3 signaling contributes to the expression of a neutrophil chemoattractant, CXCL1 in human mesangial cells . Clin Exp Nephrol. 2015 : 19:761-70.

doi: 10.1007/s10157-014-1060-4.

(査読有)

1 3 . Wilhelmus S, Joh K(11人中7番目) The Revisited Classification of GN in SLE at 10 Years: Time to Re-Evaluate Histopathologic Lesions. J Am Soc Nephrol.

2015 ;26(12):2938-46. doi:

10.1681/ASN.2015040384. (査読有)

1 4 . Miyazaki Y, Joh K (23人中3番目) Overestimation of the risk of progression to end-stage renal disease in the poor prognosis' group according to the 2002

Japanese histological

classification for immunoglobulin A nephropathy. Clin Exp Nephrol.

2014.18:475-80. doi:

10.1007/s10157-013-0848-y. (査読

有)

1 5 . Suzuki Y, Joh K (8人中5番目)

Proposal of remission criteria for IgA nephropathy. Clin Exp Nephrol.

2014 18:481-6. doi:

10.1007/s10157-013-0849-x. (査読

有)

1 6 . Joh K

Renal pathology : SY23-2 a case of a new disease entity : Podocytic infolding glomerulopathy.

Pathology 2014 ;46 Suppl 2:S41.

doi: 10.1097/01.PAT.

0000454228.44878.31. (査読無)

b. 和文原著

1 . 松尾 清一、城 謙輔 (42人中27番目)。

エビデンスに基づく IgA 腎症診療ガイドライン 2014。日本腎臓学会誌 575-137。(査読有)

2 . 城 謙輔、堀田 修、渡邊健一。

IgA 腎症扁桃炎の病理学的特性とその糸球体腎炎との関連

日本口腔・口腔科学会雑誌 2014;27:109-14 (査読無)

3 . 星野慈恵, 城 謙輔 (8人中8番目)

原発性IgA腎症で生体腎移植を受けた27症例の摘出扁桃の検討 . 日本臨床腎移植学会雑誌 2014;2:184-9(査読有)

【図書】(計2件)

1 . 城 謙輔。腎生検電顕アトラス、南山堂、東京、2016。pp1-pp219 (査読無)

2 . Joh K, McNamara KM. Differences of Histological Classification Between the Japanese Histological Grade Classification and the Oxford Classification. Springer Japan, 2016, pp69-88. (査読無)

【産業財産権】

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

【その他】

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

城 謙輔 (Joh, Kensuke)

東北大学・医学系研究科・客員教授

研究者番号: 1 0 0 5 7 0 8 6

(2)研究分担者

中村保宏 (Nakamura, Yasuhiko)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号: 8 0 3 9 6 4 9 9

(3)連携研究者()

研究者番号:

(4)研究協力者

武藤正浩 (Muto, Masahiro) (順天堂大学腎臓内科)

Meng M (山形大学病理診断学講座)