

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	後藤 孝
-------	----	----	------

### 学位論文題目

#### Increase in B-cell-activation factor (BAFF) and IFN- $\gamma$ productions by tonsillar mononuclear cells stimulated with deoxycytidyl-deoxyguanosine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) in patients with IgA nephropathy

(邦題：IgA 腎症患者における CpG-ODN 刺激による扁桃単核細胞の BAFF と IFN- $\gamma$  産生の増加)

#### 共著者名

坂東 伸幸、吉崎 智貴、野澤 はやぶさ、高原 幹、  
上田 征吾、林 達哉、原渕 保明

#### 掲載雑誌

Clinical Immunology 126:260-269 (2008)

#### I. 研究目的

IgA 腎症は、慢性糸球体腎炎の約 30%以上を占め、適切な治療をしなければ発症後 20 年でその約 40%が末期腎不全に陥る疾患である。急性扁桃炎によって発症し、もしくは症状が悪化することが知られている。近年、扁桃病巣疾患の代表的疾患として認識されるようになり、その治療として扁桃摘出術の有効性が数多く報告されている<sup>1)</sup>。

本疾患では、腎糸球体メサンギウム領域に IgA の沈着を認め、血清中の IgA 値や IgA 免疫複合体の上昇を認めることから、IgA の過剰産生が病因として考えられている。また、IgA 腎症患者由来の扁桃単核球では IgA 陽性細胞の増加や IgA 産生の亢進がみられることから、扁桃は IgA 過剰産生の中心となっている組織として注目されている。しかし、そのメカニズムについては不明な点が多い。

IgA 腎症の発症として、細菌やウイルスなどの上気道に存在する共通抗原に対する扁桃の自然免疫を介した異常な粘膜免疫応答がトリガーになっていることが報告されている。CpG-ODN (deoxycytidyl-deoxyguanosine oligodeoxynucleotides) は自然免疫を誘導する共通抗原である細菌 DNA 由来の物質である。末梢血リンパ球では、CpG-ODN の生体外刺激によって IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IL-6 などのサイトカイン産生を介した免疫グロブリン産生が誘導される。一方、マウスの動物実験では、CpG-ODN の鼻腔内投与によって上気道や全身に IgA 抗体産生応答が誘発される<sup>2)</sup>。したがって、CpG-ODN で模倣される細菌 DNA は、IgA 腎

症発症のトリガーとなる共通抗原の候補として推測される。

近年、自然免疫系でT細胞を介さないT細胞非依存性経路による免疫グロブリン産生過程が存在することが発見され、その過程においてBAFF(B cell activating factor belonging to the TNF family)という物質がB細胞の活性化や免疫グロブリンの産生に重要な役割を果たしていることが明らかになった。最近では、BAFF遺伝子を導入したマウスでは血清IgAの上昇や腎糸球体にIgAの沈着を認める<sup>3)</sup>ことから、IgA腎症の発症にBAFFが関与している可能性が示唆されている。しかし、IgA腎症の扁桃におけるBAFFの役割については情報が無い。

本研究では、IgA腎症の扁桃におけるIgA過剰産生のメカニズムを明らかにすることを目的として、以下の解析を行った。すなわち、i) CpG-ODNの生体外刺激によって扁桃単核球のIgAやBAFFの産生が亢進するか否か、ii) BAFFが扁桃単核球のIgA産生に関与しているか否か、iii) どのようなサイトカインが扁桃単核球のIgA産生やBAFF産生に関与しているか、についてIgA腎症群と対照群を比較、検討した。

## II. 材料と方法

1. 検体：旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科において扁桃摘出術によって得られた扁桃組織が本研究に用いられた。その内訳としては、IgA腎症患者37例(16-66歳、中央値31歳)、対照群として腎疾患を有しない習慣性扁桃炎患者29例(11-58歳、中央値30歳)であった。

2. 培養：扁桃の一部を小切片に破碎したのち、比重遠心法にて単核球を分離し、使用した。扁桃単核球を10%FBS添加RPMI1640培養液中に浮遊させた後、CpG-ODNを加え37°C、5%CO<sub>2</sub>下で3日間培養し、上清中のBAFF、IgA、サイトカインの濃度を測定した。IgA産生の抑制実験は、CpG-ODNとともにBAFF中和抗体ならびにIFN- $\gamma$ 中和抗体を単独または両者を加えて同様に培養した。IFN- $\gamma$ の刺激実験では、IFN- $\gamma$ を加え同様の環境で培養し、BAFF産生とBAFF発現を解析した。

3. Two-color flow cytometry: BAFF発現、BAFF受容体(BR3, TACI, BCMA)、BAFF結合能およびIFN- $\gamma$ 発現はそれぞれのFITC標識抗体とPE標識の抗CD1c抗体、抗CD19抗体または抗CD3抗体で二重染色後、two-color flow cytometryにて解析した。

4. ELISA：培養液上清中のBAFF、IgAおよびサイトカインはELISA kitを用いて測定した

5. 統計学的解析:2因子間の検討にはMann-Whitney U検定、Wilcoxon検定を行った。いずれも $p < 0.05$ を有意とした。

## III. 結果

1. 分離直後の扁桃単核球におけるBAFFとBAFF受容体の発現：CD1c細胞のBAFF発現およびCD19細胞のBAFF受容体(BR3, TACI, BCMA)発現をIgA腎症群(n=15)と対照群(n=8)で比較したが、明らかな差は認めなかった。

2. CpG-ODN刺激による扁桃単核球のBAFFおよびIgA産生：IgA腎症群(n=6)と対照群(n=10)で比較したところ、BAFFの産生は非刺激下では差を認めなかったが、CpG-ODN刺激下ではIgA腎症群で有意に上昇していた(0.44:0.30-0.53 ng/ml vs. 0.24:0.20-0.29 ng/ml,  $p < 0.005$ )。一方、IgAの産生は非刺激下、CpG-ODN

刺激下ともに IgA 腎症群で有意に上昇していた(非刺激 370.4:303.2-433.7 ng/ml, vs. 249.1:200.7-274.9 ng/ml,  $p < 0.05$ ; CpG-ODN 刺激 436.4:402.2-453.9 ng/ml, vs. 268.5:193.6-339.7 ng/ml;  $p < 0.05$ )。また、CpG-ODN 刺激による IgA 産生は BAFF 中和抗体にて濃度依存性に抑制されることが確認された。

3. CpG-ODN 刺激による扁桃単核球のサイトカイン (IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IL-6) 産生: IFN- $\alpha$  および IL-6 の産生は非刺激下、CpG-ODN 刺激下ともに IgA 腎症群(n=8)と対照群(n=6)で差を認めなかった。一方、IFN- $\gamma$  の産生は非刺激下、CpG-ODN 刺激下ともに IgA 腎症群で有意に上昇していた(非刺激 553.1:260.2-782.0 pg/ml vs. 362.7:46.7-465.9 pg/ml,  $p < 0.05$ ; CpG-ODN 刺激 887.9: 774.4-1013 pg/ml vs. 693.8:220.4-1024.2 pg/ml;  $p < 0.05$ )。

4. IFN- $\gamma$  刺激による扁桃 CD1c 細胞の BAFF 発現と扁桃単核球の BAFF 産生: BAFF 発現および BAFF 産生は両者共に非刺激下では IgA 腎症群(n=7)と対照群(n=5)で差を認めなかったが、IFN- $\gamma$  刺激下では両者共に IgA 腎症群で有意に上昇していた(BAFF 発現 11.0:8.8-12.8% vs. 7.8:5.6-9.4%;  $p < 0.05$ ; BAFF 産生 1.3:1.0-1.6ng/ml vs. 0.8:0.6-0.9 ng/ml,  $p < 0.05$ )。

5. BAFF 中和抗体および IFN- $\gamma$  中和抗体による IgA 産生の抑制: CpG-ODN 刺激による IgA 産生 (199.3:105.1-221.6 ng/ml)は IFN- $\gamma$  中和抗体単独(180.1: 98.2-209.6 ng/ml,  $p < 0.05$ )、BAFF 中和抗体単独(130.1:89.8-184.1 ng/ml,  $p < 0.05$ )で加えても有意に抑制された。両者を共に加える(124.9: 88.9-149.1 ng/ml,  $p < 0.05$ )と、IFN- $\gamma$  中和抗体単独より一層抑制された( $p < 0.05$ )が、BAFF 中和抗体単独による抑制とは変わりがなかった。

6. 分離直後の扁桃単核球における IFN- $\gamma$  の発現: CD3 細胞における IFN- $\gamma$  の発現は IgA 腎症群(n=15)では対照群(n=9)に比較して有意に上昇していた(2.16: 1.51-3.53% vs. 1.36: 0.76-1.96%,  $p < 0.05$ )。

#### IV. 考察

本研究において、CpG-ODN の生体外刺激による扁桃単核球の BAFF、IFN- $\gamma$  および IgA 産生は IgA 腎症では対照と比較して有意に上昇していた。この結果から、IgA 腎症の扁桃では細菌由来の DNA に対し過剰な免疫応答を有することが示唆された。一方、IgA 腎症の扁桃単核球は抗原刺激がなくても IFN- $\gamma$  産生と IgA 産生が高く、分離直後の扁桃単核球における IFN- $\gamma$  の発現も亢進していたことは、IgA 腎症の扁桃では生体内において既に細菌由来の DNA に慢性的に刺激されていることを反映していると考えられる。また、CpG-ODN 刺激による IFN- $\alpha$  および IL-6 の産生は IgA 腎症群と対照群で差を認めなかったが、IFN- $\gamma$  の産生は IgA 腎症群で有意に上昇していた。CpG-ODN 刺激による IgA 産生は BAFF 中和抗体、IFN- $\gamma$  中和抗体を単独で加えても有意に抑制され、両者を共に加えると、IFN- $\gamma$  中和抗体単独より一層抑制されたが、BAFF 中和抗体単独による抑制とは変わりがなかった。これらの2つの所見は、IgA 腎症の扁桃における CpG-ODN 刺激による過剰な IgA 産生の機序として、IFN- $\gamma$  により調節された BAFF 産生の亢進が関与していることを示唆している。加えて、IFN- $\gamma$  刺激による扁桃単核球の BAFF 発現および BAFF 産生は IgA 腎症群で有意に上昇していたことから、IgA 腎症の扁桃では細菌由来の DNA (CpG-ODN) のみならず、IFN- $\gamma$  に対しても高い反応性を有する可能性があることが示唆される。

本研究成果は、IgA 腎症の扁桃では IgA の過剰産生と細菌に対する過剰免疫応答が存在するという従来の

報告を支持するとともに、扁桃における IgA 過剰産生のメカニズムとして、細菌 DNA (CpG-ODN) に対する過剰免疫応答と IFN- $\gamma$  に対する高反応性によって生じる BAFF 産生の亢進が関与していることを明らかにした。よって、本研究成果は過剰免疫応答を起こす場である扁桃を取り去る扁桃摘出術が IgA 腎症の治療法のひとつとして有用であることを示すエビデンスになり得ると考えられた。

## V. 結論

1. IgA 腎症では CpG-ODN 刺激による扁桃単核球の BAFF、IgA および IFN- $\gamma$  産生が上昇していた。
2. CpG-ODN 刺激による IgA 産生は BAFF 中和抗体、IFN- $\gamma$  中和抗体の単独および両者の添加で抑制された。
3. IgA 腎症では IFN- $\gamma$  刺激による扁桃 CD1c 細胞の BAFF 発現と扁桃単核球の BAFF 産生が上昇していた。
4. IgA 腎症では分離直後の扁桃単核球における IFN- $\gamma$  の発現が上昇していた。
5. 以上の結果より、IgA 腎症の扁桃における IgA 過剰産生のメカニズムとして、細菌 DNA に対する過剰免疫応答と IFN- $\gamma$  に対する高反応性によって生じる BAFF 産生の亢進が関与していることが明らかにされた。

## VI. 引用文献

1. Y. Xie, S. Nishi, M. Ueno, N. Imai, M. Sakatsume, I. Narita, Y. Suzuki, K. Akazawa, H. Shimada, M. Arakawa, F. Gejyo: The efficacy of tonsillectomy on long-term renal survival in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int* 63: 736-743, 2003.
2. M.J. McCluskie, R.D. Weeratna, H.L. Davis: Intranasal immunization of mice with CpG DNA induces strong systemic and mucosal responses that are influenced by other mucosal adjuvants and antigen distribution. *Mol Med* 6: 867-877, 2000
3. D.D. McCarthy, S. Chiu, Y. Gao, L.E. Summers-deLuca, J.L. Gommerman: BAFF induces a hyper-IgA syndrome in the intestinal lamina propria concomitant with IgA deposition in the kidney independent of LIGHT. *Cell Immunol* 241: 85-94, 2006

## VII. 参考文献

1. H. Nozawa, M. Takahara, T. Yoshizaki, T. Goto, N. Bandoh, Y. Harabuchi: Selective expansion of T cell receptor (TCR) V beta 6 in tonsillar and peripheral blood T cells and its induction by in vitro stimulation with *Haemophilus parainfluenzae* in patients with IgA nephropathy. *Clin Exp Immunol* 151: 25-33, 2007
2. 後藤 孝, 坂東伸幸, 吉崎智貴, 高原 幹, 野中 聡, 原渕保明: IgA 腎症に対する扁桃摘出術の臨床効果と予後予測因子の検討. *日耳鼻* 110 : 53-59, 2007

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	後藤 孝
<p>審査委員長 立野正敏 ㊟</p> <p>審査委員 長谷部直幸 ㊟</p> <p>審査委員 原 淵保明 ㊟</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Increase in B-cell-activation factor (BAFF) and IFN-<math>\gamma</math> productions by tonsillar mononuclear cells stimulated with deoxycytidyl-deoxyguanosine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) in patients with IgA nephropathy</p> <p>(邦題: IgA 腎症患者における CpG-ODN 刺激による扁桃単核細胞の BAFF と IFN-<math>\gamma</math> 産生の増加)</p>			
<p>慢性糸球体腎炎の3分の1以上を占めるIgA腎症は、適切な治療をしなければ発症後20年でその約40%が末期腎不全に陥る疾患である。近年、扁桃病巣疾患の代表的疾患として認識されるようになり、その治療として扁桃摘出術の有効性が数多く報告されている。病因としてIgAの過剰産生が考えられており、扁桃の自然免疫を介した異常な粘膜免疫応答の関与が報告されている。細菌DNA由来の共通抗原であるCpG-ODN (deoxycytidyl-deoxyguanosine oligonucleotides)により誘導される自然免疫は、IgA腎症発症のトリガーとなる共通抗原の候補でもあり、また近年、自然免疫系でT細胞非依存性経路としてBAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family)を介する機序が明らかにされ、IgA腎症発症における役割も推測されている。本論文は、IgA腎症の扁桃単核球を用いてCpG-ODNの生体外刺激によるIgA、BAFFおよびサイトカインの産生を検討し、IgA過剰産生に及ぼす役割を考察したものである。</p> <p>論文提出者はIgA腎症における扁桃単核細胞(TMC: tonsillar mononuclear cell)がIgA産生過剰に働く機序を明らかにする目的でIgA腎症37例と腎疾患を有しない習慣性扁桃炎患者29例を対象として、摘出術で得られた扁桃組織からTMCを分離し比較検討を行った。その結果、IgA患者TMCについて以下の結果を得た。1)非刺激下でINF-<math>\gamma</math>とIgA産生が増加している。2)細胞内INF-<math>\gamma</math>陽性T細胞数が増加している。</p>			

3) CpG-ODN 刺激後 INF- $\gamma$ , BAFF, IgA 産生が増加する。4) IgA 産生は INF- $\gamma$ , BAFF に対する中和抗体の単独あるいは両者の添加で抑制される。5) INF- $\gamma$  の刺激により扁桃 CD1c 細胞の BAFF の発現と TMC による BAFF 産生が亢進する。6) BAFF 結合受容体の発現は健常者 TMC との間に差が見られない。

以上の結果から IgA 腎症の扁桃単核球は IgA を過剰に産生することが確認され、そのメカニズムとして、CpG-ODN で模範される細菌 DNA に対する過剰免疫応答と INF- $\gamma$  に対する高反応性による BAFF 産生の亢進が関与していることが明らかにされた。加えて、IgA 腎症の扁桃単核球は非刺激の培養においても IgA と INF- $\gamma$  の産生が高く、分離直後の INF- $\gamma$  発現も高かったことから、IgA 腎症の扁桃は生体内において既に細菌由来の DNA に慢性的に刺激されていることが示唆された。よって、本研究成果は、過剰免疫応答を起こす場である扁桃を取り去る扁桃摘出術が IgA 腎症の治療法のひとつとして有用であることを示す基礎的エビデンスになりえると考えられ、臨床的にも意義深いと考えられた。

論文の構成・手法も適切であり、また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。尚、本論文は既に2008年のClinical Immunology誌に掲載済みである。