

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 山口 浩毅
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 998 号
学位授与の日付 令和3年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Aberrant mucosal immunoreaction to tonsillar microbiota in immunoglobulin A nephropathy.
(IgA 腎症における扁桃細菌叢に対する異常粘膜免疫応答)

論文審査委員 主査 教授 河内 裕
副査 教授 片貝 智哉
副査 准教授 福住 好恭

博士論文の要旨

背景と目的

IgA 腎症はメサングウム領域への多量体 IgA の沈着を特徴とする、最も頻度の高い原発性糸球体腎炎であり、慢性腎不全の主な原疾患の一つでもある。その発症には、扁桃の共生細菌に対する粘膜免疫応答が関与すると推測されており、ヒンジ部 O 結合型糖鎖不全 IgA1 (GdIgA1) を中心とする腎炎惹起性の多量体 IgA が産生され、免疫複合体を形成し糸球体に沈着する機序が想定されている。本邦では扁桃病巣感染を考慮し、IgA 腎症患者に対する口蓋扁桃摘出術と副腎皮質ステロイドパルス療法が広く施行されており、実際に高い寛解率を示すが、現在まで腎炎発症に関与する細菌群は同定されていない。また粘膜の表面における IgA は、細菌抗原の刺激による樹状細胞の APRIL と BAFF の発現を介した T 細胞非依存性経路のクラススイッチによって産生され、多様な細菌叢へ選択的に結合し凝集・弱毒化させることで、宿主との共生関係の構築に関与している。近年、抗 IgA 抗体を用いた FACS にて IgA 結合細菌を分離し、次世代シーケンサー (NGS) を用いた 16S-rRNA 遺伝子解析にて IgA 結合細菌組成を網羅的に解析する IgA-SEQ 法が提唱され、主に腸管粘膜にて広く研究が行われ、疾患発症に関与する細菌群集を同定できる可能性が示唆されている。加えて、組織や血液サンプルから抽出した RNA から、NGS により免疫グロブリンの抗原結合領域を網羅的に解析する免疫グロブリンレパトア解析が開発され、抗原抗体反応の包括的な探索が可能となった。申請者らは、扁桃陰窩検体に IgA-SEQ 法と免疫グロブリンレパトア解析を応用し、口蓋扁桃における IgA 結合細菌群と IgA レパトアの網羅的解析を行うことで、IgA 腎症の病態に関与する扁桃細菌群の探索を試みた。

方法

2012 年 7 月から 2018 年 6 月までに口蓋扁桃摘出術を施行された症例について、摘出直後の口蓋扁桃の陰窩深部組織を採取した。このうち、IgA 腎症 (IgAN) 62 例および習慣性扁桃炎 (RT) 28 例を解析対象とした。扁桃組織からの蛋白抽出溶液、および血清中の APRIL、BAFF および GdIgA1 濃度を ELISA にて定量し、病理学的指標との相関解析を行った。次に扁桃深部陰窩の IgA 結合細菌について、抗 IgA 抗体を用いた FACS で

IgA 結合細菌と非結合細菌に分離後、16S 解析で細菌組成を解析し(IgA-SEQ)、各細菌の IgA 結合度を IgA index として算出した。さらに扁桃陰窩から RNA を抽出して相補鎖 DNA を作成し、IgA 定常領域に対する特異的プライマーを用いた adaptor-ligation PCR 法にて IGHA の V, D, J 領域を含む可変領域を増幅して配列決定した後、IMGT 参照配列との相同性解析にて各領域の相対存在比を算出し (IgA レパトア解析)、扁桃 APRIL および BAFF 濃度と、各細菌群の IgA index 値との相関解析を行った。また患者血清を用いて、ゲル濾過クロマトグラフィにより分画した多量体 IgA を分離し、全 IgA および GdIgA1 濃度を ELISA にて測定した後、摘出扁桃から単離培養した細菌株と IgA の親和性を FACS にて解析した。

結果

扁桃 APRIL 濃度は、IgAN 群で RT 群より有意に高い値を示し、免疫組織染色では IgAN 群の扁桃 APRIL 低値例と比較し、高値例にて胚中心および濾胞周辺領域に APRIL の強い染色を認めた。扁桃 BAFF 濃度も、IgAN 群にて RT 群より有意に高い値を示し、免疫組織染色では IgAN 群の扁桃 BAFF 低値例と比較し、高値例にて胚濾胞周辺領域に BAFF の強い染色を認めた。一方、扁桃 GdIgA1 値は、IgAN 群の扁桃 GdIgA1 値は糸球体における GdIgA1 染色割合と、病理学的指標である Oxford 分類のメサンギウム増殖と相関を示した。IgA-SEQ 解析では、IgA 結合細菌群は非結合群と比較して Bacteroidetes 門が有意に高く存在し、その下位に属する Prevotella 属等の嫌気性細菌群が有意に多く認められた。IgA index の比較では、Bacteroidetes 門群が IgAN 群で RT 群より有意に高かった。IgA レパトア解析では、IGHA1 における IGHV 配列の比較にて、IGHV3-30 と IGHV3-38 の存在比が IgAN 群で有意に高値を示した。IGHA1 における IGHV3-30 の存在比は、Bacteroidetes 門群の IgA index と有意な正の相関関係を認めた。また、IGHV3-30 の存在比は扁桃 APRIL 値と、IGHV3-38 の存在比は扁桃 BAFF 値と有意な相関を示した。FACS による培養細菌株に対する IgA 親和性解析では、血清多量体 IgA 分画の GdIgA1 および GdIgA1/IgA 値は、IgAN 群で RT 群より有意に高い値を示し、血清多量体 IgA 分画は Bacteroidetes 門に属する Porphyromonas gingivalis と Prevotella intermedia に対して強い親和性を示した。その結合度は IgAN 群で RT 群より有意に高く、多量体 IgA 分画の GdIgA1 値と有意な正の相関を示した。

考察

申請者らは IgA 腎症患者において、扁桃陰窩の Porphyromonas 属を中心とする Bacteroidetes 門細菌群が IgA により多く被覆され、かつ GdIgA1 を多く含有する血清多量体 IgA とより強く結合することを示した。加えて、扁桃組織を用いた IgA レパトア解析により、IgA 腎症患者の扁桃 IgA1 クローンにおける IGHV3-30 の発現が有意に高く、その発現が IgA-SEQ 法にて算出した Bacteroidetes 門細菌群への IgA 結合度と有意な相関を示すことを明らかにした。以上の結果から、扁桃陰窩における Bacteroidetes 門細菌群が、粘膜由来の高分子 IgA の発現と特定の IgA クローンを介して、粘膜免疫との相互作用に強く関与している可能性が示唆された。

また申請者らは、IgA 腎症患者の扁桃における APRIL と BAFF の発現が亢進していることを明らかにしたが、BAFF トランスジェニックマウスでは、腸管細菌叢依存性に反応した多量体 IgA が、粘膜バリアーの破綻を通じて末梢分画へ移動し、糸球体に沈着して腎炎が惹起されることが報告されている (McCarthy DD, et al. J Clin Invest 2011)。本研究では、血清中の多量体 IgA 分画における GdIgA1 が IgA 腎症群にて有意に高い値を示すことを明らかにしており、上述の知見と結果を考慮すると、IgA 腎症患者の扁桃粘膜では、BAFF トランスジェニックマウスと同様に T 細胞非依存性経路の異常な亢進と粘膜バリアーの破綻を生じ、粘膜由来の多量体 IgA が全身循環に移動し、最終的に糸球体へ沈着して腎炎を発症する機序が生じているものと考えられる。

結論

IgA 腎症患者の扁桃陰窩では、特定の IgA レパトアを介して Bacteroidetes 門細菌群に対する免疫応答

が亢進している。

審査結果の要旨

IgA 腎症 (IgAN) の発症には、扁桃の共生細菌に対する粘膜免疫応答が関与すると推測され、ヒンジ部0結合型糖鎖不全 IgA1 (GdIgA1) を中心とする腎炎惹起性の多量体 IgA を含む免疫複合体が糸球体に沈着する機序が想定されているが詳細は不明である。申請者は、扁桃陰窩検体に IgA-SEQ 法と免疫グロブリンレパトア解析を応用し、口蓋扁桃における IgA 結合細菌群と IgA レパトアの網羅的解析を行い、IgAN の病態に関与する細菌群を探索した。IgAN 62 例および習慣性扁桃炎 (RT) 28 例を解析した。扁桃 a proliferation-inducing ligand (APRIL) および B-cell activating factor (BAFF) 濃度は、IgAN 群で RT 群より有意に高値を示し、IgAN 群の扁桃 GdIgA1 値は糸球体における GdIgA1 染色割合と、メサンギウム増殖と相関を示した。IgA-SEQ 解析による IgA 結合細菌では Bacteroidetes 門、その下位に属する Prevotella 属等の嫌気性細菌群が有意に多く認められた。IgA レパトア解析では、IGHA1 における IGHV3-30 の存在比において Bacteroidetes 門群の IgA index と有意な正相関を認めた。さらに FACS による培養細菌株に対する IgA 親和性解析では、血清多量体 IgA 分画の GdIgA1 および GdIgA1/IgA 値は、IgAN 群で RT 群より有意に高値を示し、血清多量体 IgA 分画は Bacteroidetes 門 Porphyromonas gingivalis と Prevotella intermedia に対して強い親和性を示した。その結合度は IgAN 群で RT 群より有意に高く、多量体 IgA 分画の GdIgA1 値と有意な正の相関を示した。

以上、本研究は IgAN 患者の扁桃陰窩で特定の IgA レパトアを介して Bacteroidetes 門細菌群に対する免疫応答が亢進していることを示したものであり、IgAN の発症機序を理解する上で重要な示唆を与えた点に博士論文としての価値を認める。