

第 37 回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

シンポジウム

疾患モデル動物：病態解明と創薬研究における有用性と限界を知る

IgA 腎症

IgA nephropathy

鈴木 仁

Hitoshi SUZUKI

はじめに

IgA 腎症は、多因子疾患ゆえにその病態は非常に複雑であり、遺伝・免疫系・腎臓における異常が複雑に絡み合い成り立っていると考えられる。Berger らによる IgA 腎症の報告から 47 年余り経過し¹⁾、数多くの臨床研究と基礎的研究により、IgA 腎症の病態が解明されつつある。しかし、抗原の多様性や IgA の免疫ネットワークの複雑さなどから、その解析は容易ではない。これらの病態を解明するには臨床研究だけでは限界があり、適切な動物モデルが必要不可欠である。

IgA 腎症自然発症モデル

IgA 分子構造の違いなど、ヒトの IgA 腎症モデルとして完璧に条件を満たす動物モデルは存在しないが、われわれはそのなかでも有用性の高い自然発症モデルである ddY マウスに着目した。ddY マウスは、1920 年代にドイツから日本に持ち込まれ継代された non-inbred マウスであり、1985 年には Imai らによって、糸球体の IgA の沈着を伴ったメサンギウム増殖性腎炎を発症することが確認された²⁾。しかし、このマウスは non-inbred ゆえに IgA 腎症の発症にバラツキが多いことが実験動物としての問題点として指摘されてきた。

そこでわれわれは、約 360 匹の ddY マウスに経時的に腎

生検を施行したところ、生後 20 週齢以前に腎症を発症する早期発症群(約 30%)、20 週以降 40 週齢までに発症する晚期発症群(約 30%)、60 週齢でも腎症を発症しない未発症群(約 30%)の 3 群に分けられることを見出した³⁾。発症した ddY マウスでは、糸球体への C3 の沈着を伴った IgA の顆粒状沈着は必発で、ヒト IgA 腎症に類似したメサンギウム増殖性腎炎を示すことが確認された³⁾。

遺伝因子

当初、IgA 腎症は遺伝疾患とは考えられていなかったが、発症の地理的偏り、民族性、家族内集積などから、本症の発症・進展には遺伝因子が深くかかわることが示唆されている。実際、アジア太平洋地域では腎生検によって確定診断される糸球体腎炎の約半数は IgA 腎症であるのに対し、ヨーロッパでは 20~30%、北米では 10% 程度、南米全体では 6% 程度、アフリカ、インドなどでは非常に稀であり、明らかに地域差が存在している。Caucasian の IgA 腎症の発症率は黒人に比べると高いが、ネイティブインディアンに比べるとはるかに少ないことが知られており、類似した衛生環境下での人種間の明確な差異が存在している。さらに家族内集積例の報告や一卵性双生児における発症例などから、遺伝因子の関与が強く示唆されている。近年、GWAS study により IgA 腎症の疾患感受性マッピングが提唱され、日本をはじめとするアジア地域での遺伝因子の強さが改めて明らかとなった⁴⁾。

ddY マウスは non-inbred であるがゆえに遺伝的に不均一

であり、IgA 腎症の発症と程度にバラツキが多いことが想定された。そこで、早期発症群と未発症群との間で、マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドな遺伝子相関解析を行い、発症にかかわる遺伝子を検証した。その結果、ヒト家族性 IgA 腎症の疾患感受性遺伝子座である IGAN1⁵⁾ と相同する遺伝子領域に高い相関を認めた³⁾。さらに、東京医科学研究所を中心としたグループが報告した selectin 遺伝子近傍にも強い相関を認めた。ヒト IgA 腎症と ddY マウスでは、IgA 分子構造の違いや血尿の有無などの相違点を認めるものの、これらの結果から IgA 腎症の病因の一部はヒトと ddY マウスで共通な遺伝子制御を受けていると考えられ、前述のように群別化した ddY マウスはモデルとして有用であると考えられる。

IgA 腎症の進展における粘膜免疫応答異常の関与

次にわれわれは、早期発症群と晩期発症群との間で相関解析を行い、IgA 腎症の進展にかかわる遺伝子について検討を行ったところ、粘膜免疫に深くかかわる Toll-like receptor (TLR) の会合分子である MyD88 遺伝子近傍に強い相関を認めた⁶⁾。ヒト IgA 腎症では、上気道炎、扁桃炎などによって血尿や蛋白尿の増悪が認められ、粘膜免疫と IgA 腎症進展の関連が示唆されていることから、ddY マウスでの粘膜免疫の関与について検討した。ddY マウスを外来抗原の比較的多い環境下 (conventional condition) と、きわめて少ない環境下 (specific pathogen free : SPF) で飼育したところ、両群間で腎炎発症率には有意な差は認めなかったが、Conventional 群では腎炎の増悪傾向が強く認められた⁶⁾。Conventional 群のマウス脾臓細胞における各種 TLR の発現をみたところ、TLR9 の発現が有意に上昇していた。これを受け、TLR9 のリガンドである非メチル化 DNA (CpG DNA) を SPF 群のマウスに経鼻投与したところ、血清 IgA 免疫複合体値の上昇と、アルブミン尿の増加、糸球体メサンギウム領域への IgA の沈着増加を伴う腎炎の増悪が観察された⁶⁾。つまりマウス IgA 腎症では、上気道粘膜における TLR9-MyD88 という粘膜免疫系の活性化が腎炎の進展にかかわっていると考えられた。

扁桃炎や上気道の粘膜感染で IgA 腎症患者の尿所見異常が増悪することや、扁桃摘出で腎症が改善する症例がみられるといった事実は^{7~9)}、粘膜免疫の関与を裏付けるものと考えられる。興味深いことに、ヒト IgA 腎症患者で TLR9 遺伝子の SNP 解析を行ったところ、SNP (rs35410) における TT genotype と組織学的重症度が強く相関することが明

らかとなった⁶⁾。さらに IgA 腎症患者の摘出扁桃の TLR9 発現量が高い群や TT genotype を有する群では、扁桃摘出およびステロイドパルス (扁桃摘出療法) の治療効果が高いことが確認されていることから¹⁰⁾、粘膜、特に扁桃における外来抗原の曝露が TLR9 の活性化を誘発し、IgA 腎症の進展に重要であることが示唆されている。

IgA 免疫系の異常

IgA 腎症により末期腎不全に至り、腎移植を受けた患者の半数以上に IgA 腎症が再発すること¹¹⁾、逆に、IgA 腎症以外の疾患で腎不全に至った患者に IgA 腎症患者の腎臓をドナーとして移植したところ、糸球体 IgA の沈着が改善したことなどから¹²⁾、IgA 腎症の病因の本質は、腎固有細胞ではなく全身の IgA 免疫系にあることが示唆されている。IgA 腎症患者の血中には多量体 IgA1 が増加し¹³⁾、糸球体に沈着する IgA は主に IgA1 であることが証明されている^{14,15)}。

マウスモデルでの検討では、ddY マウスの血清から精製した IgA は多量体を中心であった。一方、BALB/c マウスの IgA は単量体を中心であり、ヌードマウスへの打ち込み実験では ddY マウス由来の IgA を打ち込むことで、有意に糸球体への IgA 沈着を誘導することができた¹⁶⁾。IgA の糸球体への沈着の詳細なメカニズムについては明らかになっていないが、少なくともこれまでの報告にあるような IgA 受容体で説明がつくものではなく、IgA 分子サイズや分子構造が重要であると考えられる。しかし、時間経過とともに沈着した IgA がクリアランスされることも明らかとなり、持続的な nephritogenic IgA の供給が必須であると考えられた¹⁶⁾。

IgA 分子の構造異常と免疫複合体

IgA 腎症患者の血中および糸球体に沈着する IgA1 には、IgA1 分子のヒンジ部における糖鎖修飾構造が不全である糖鎖異常 IgA1 が増加している^{14,15)}。B 細胞における糖鎖修飾酵素の発現・活性異常で糖鎖異常 IgA1 の産生が亢進すると考えられている¹⁷⁾。しかし、遺伝的に血中糖鎖異常 IgA1 が高値だが腎機能が正常である集団が存在することや、糖鎖異常 IgA1 だけでは培養メサンギウム細胞を活性化しないという実験結果より、糖鎖異常 IgA1 だけではこの疾患の病態は説明できないのではないかと想定されている^{18,19)}。近年 IgA 腎症患者において、糖鎖異常 IgA1 を特異的に認識し、高分子免疫複合体を形成する IgG が同定さ

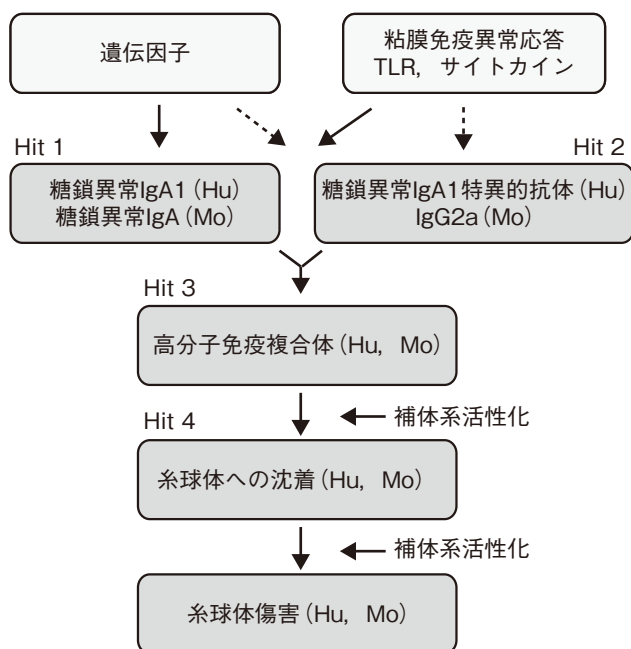


図 IgA 腎症の病態仮説—Multi Hit メカニズム—

Hu：ヒト，Mo：マウス。IgA 腎症の患者では，扁桃炎などの上気道感染を契機に尿所見異常の増悪を認め，扁桃摘出の有効性が示唆されていることから，細菌やウイルス抗原が関与し，粘膜，特に扁桃における外来抗原の曝露が TLR9 の活性化を誘発し，それによって IgA 免疫複合体の形成やサイトカインの産生が誘導されると考えられる。糖鎖異常 IgA1 は，遺伝因子¹⁸⁾のみならず後天的にサイトカインによっても，IgA1 産生 B 細胞における特異的糖鎖修飾酵素の異常が誘導される (Hit 1)³²⁾。一方で，糖鎖異常 IgA1 特異的抗体 (IgG および IgA) の産生が亢進し (Hit 2)，糖鎖異常 IgA1 と免疫複合体を形成する (Hit 3)。この高分子免疫複合体は，肝臓でのクリアランスが遅延するためメサングウム領域へ沈着し，組織障害を誘導すると考えられる (Hit 4)^{21,25)} (文献 25 より引用)

れ²⁰⁾，まず糖鎖異常 IgA1 が産生されること (1st Hit)，そして，糖鎖異常 IgA1 特異的抗体が産生されて (2nd Hit) 免疫複合体を形成することが，IgA 腎症の病態に深く関与していると考えられる²¹⁾。ddY マウスにおいても，腎組織障害度と血中 IgA-IgG2a 免疫複合体量が相関し，高分子 IgA 免疫複合体の病態における重要性については，ヒトもマウスも共通であると考えられる²²⁾。レクチンを用いたマウス IgA の糖鎖解析では，BALB/c と比較して，ddY マウスの IgA には糖鎖不全が認められ²³⁾，ガスクロマトグラフィを用いた糖鎖定量解析でも糖鎖不全が明らかとなった²⁴⁾。以上のことから，ヒトとマウス IgA 腎症では共通して高分子 IgA 免疫複合体が重要な役割を担っており，免疫複合体の形成には IgA 分子の糖鎖修飾異常が重要な役割を担っていると考えられる (図)²⁵⁾。

純系 ddY マウスモデルの確立

IgA 腎症の病態解析において，群別化した ddY マウスの有用性が確認できたが，純系 IgA 腎症発症モデルを作製すべく，前述の早期発症群のみを選択交配させた。20 世代以上の選択的交配を行い，近年，IgA 腎症を 4 週齢で 100% 発症する Grouped ddY マウスを確立した²⁴⁾。これまでの知見を基に，Grouped ddY モデルを用いて特異的治療についての検証を行っている。A proliferation inducing ligand (APRIL) は B 細胞の分化誘導に重要な因子であるが，近年，IgA 腎症患者血中で増加していることが報告され²⁶⁾，nephritogenic IgA の産生系との関連が示唆される。Grouped ddY マウスで APRIL 抗体の効果を検証したところ，血中 IgA や糸球体に沈着する IgA 量の低下だけでなく，尿蛋白量の減少が確認され²⁷⁾，今後ヒトでの検証も考慮される。

臨床応用

1. バイオマーカーを用いた診断と疾患活動性評価への適応

前述のように糖鎖異常 IgA1 や糖鎖異常 IgA1 特異的抗体，糖鎖異常 IgA1 免疫複合体が病因に直接的にかかわると考えられ，われわれは，IgA 腎症，そのほかの腎炎，健常者での予備研究で，これらのバイオマーカーと臨床データ (性別・年齢・血尿・尿蛋白量) も加味した logistic model を用い，そのほかの腎炎と比較し IgA 腎症を特異度 81%，感度 91% で診断できるスコアリングシステムを開発した²⁸⁾。現在多施設共同研究により，さらに精度を上げ，診断スコアリングシステムのブラッシュアップを図っている。さらにこれらのバイオマーカーのうち，特に糖鎖異常 IgA1 特異的抗体は IgA 腎症の疾患活動性評価や予後予測に有用であることが明らかとなった^{29,30)}。

2. IgA 腎症の早期スクリーニングにおけるバイオマーカーの適用

IgA 腎症の初発症状は血尿が主体で，わが国における発見機転は健診時の血尿が大半を占める。これらのバイオマーカーを用いた新規スクリーニングシステムにより，健診・人間ドッグ受診者中の尿潜血陽性者における潜在的 IgA 腎症患者の割合は 0.9 と推定された³¹⁾。今後，大規模コホートによる検証により精度の高いシステムを確立する必要があるが，一般人口における潜在的 IgA 腎症患者の割合を調べることが可能となり，IgA 腎症の早期発見・診断・治療のための行政施策に向けた基礎となるエビデンスの構

築ができるものと考えられる。

おわりに

IgA 腎症の病因は、粘膜、骨髄、腎臓それぞれの異常が複雑に絡み合い成り立っていることと推察される。マウス IgA はヒト IgA1 分子と構造が異なること、マウス IgA 腎症では血尿がみられないなど相違点はあるものの、種々の共通点を明確にし工夫することで、これらの複雑性を読み解く重要な手がかりとなる。腸管免疫の解析など、ヒトでの臨床研究では倫理上困難なこともあり、その点で Grouped ddY マウスモデルによる多面的な解析を行い、その結果をヒトへフィードバックすることは、本症の病態解明および特異的治療法の開発に非常に有用なツールになると思われる。

謝 辞

本研究業績は、ご指導いただきました富野康日己先生、白土 公先生、鈴木祐介先生(順天堂大学腎臓内科学)、白井俊一先生、広瀬幸子先生(順天堂大学第二病理学)に深謝するとともに、純系 ddY マウスモデルの継代、維持にご協力いただいた山路研二先生、相澤昌史先生、中田純一郎先生、佐竹健至先生、木原正夫先生、佐藤大介先生、梶山忠弘先生、岡崎圭子先生、橋本 梓先生、柳川宏之先生、毎熊政行先生、武藤正浩先生、牧田侑子先生、高畑暁子先生、柴田輝美助手(順天堂大学腎臓内科学講座)に感謝申し上げます。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

- Berger J, Hinglais N. Intracapillary deposits of IgA-IgG. *J Urol Nephrol* 1968 ; 74 : 694-695.
- Imai H, Nakamoto Y, Asakura K, Miki K, Yasuda T, Miura AB. Spontaneous glomerular IgA deposition in ddY mice : an animal model of IgA nephritis. *Kidney Int* 1985 ; 27 : 756-761.
- Suzuki H, Suzuki Y, Yamanaka T, Hirose S, Nishimura H, Toei J, Horikoshi S, Tomino Y. Genome-wide scan in a novel IgA nephropathy model identifies a susceptibility locus on murine chromosome 10, in a region syntenic to human IGAN1 on chromosome 6q22-23. *J Am Soc Nephrol* 2005 ; 16 : 1289-1299.
- Kiryuk L, Li Y, Sanna-Cherchi S, Rohanizadegan M, Suzuki H, Eitner F, Snyder HJ, Choi M, Hou P, Scolari F, Izzi C, Gigante M, Gesualdo L, Savoldi S, Amoroso A, Cusi D, Zamboli P, Julian BA, Novak J, Wyatt RJ, Mucha K, Perola M, Kristiansson K, Viktorin A, Magnusson PK, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, Boland A, Metzger M, Thibaudin L, Wanner C, Jager KJ, Goto S, Maixnerova D, Karnib HH, Nagy J, Panzer U, Xie J, Chen N, Tesar V, Narita I, Berthoux F, Floege J, Stengel B, Zhang H, Lifton RP, Gharavi AG. Geographic differences in genetic susceptibility to IgA nephropathy : GWAS replication study and geospatial risk analysis. *PLoS Genet* 2012 ; 8 : e1002765.
- Gharavi AG, Yan Y, Scolari F, Schena FP, Frasca GM, Ghiggeri GM, Cooper K, Amoroso A, Viola BF, Battini G, Caridi G, Canova C, Farhi A, Subramanian V, Nelson-Williams C, Woodford S, Julian BA, Wyatt RJ, Lifton RP. IgA nephropathy, the most common cause of glomerulonephritis, is linked to 6q22-23. *Nat Genet* 2000 ; 26 : 354-357.
- Suzuki H, Suzuki Y, Narita I, Aizawa M, Kihara M, Yamanaka T, Kanou T, Tsukaguchi H, Novak J, Horikoshi S, Tomino Y. Toll-like receptor 9 affects severity of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008 ; 19 : 2384-2395.
- Hotta O, Miyazaki M, Furuta T, Tomioka S, Chiba S, Horigome I, Abe K, Taguma Y. Tonsillectomy and steroid pulse therapy significantly impact on clinical remission in patients with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2001 ; 38 : 736-743.
- Xie Y, Chen X, Nishi S, Narita I, Gejyo F. Relationship between tonsils and IgA nephropathy as well as indications of tonsillectomy. *Kidney Int* 2004 ; 65 : 1135-1144.
- Komatsu H, Fujimoto S, Hara S, Sato Y, Yamada K, Kitamura K. Effect of tonsillectomy plus steroid pulse therapy on clinical remission of IgA nephropathy : a controlled study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008 ; 3 : 1301-1307.
- Sato D, Suzuki Y, Kano T, Suzuki H, Matsuoka J, Yokoi H, Horikoshi S, Ikeda K, Tomino Y. Tonsillar TLR9 expression and efficacy of tonsillectomy with steroid pulse therapy in IgA nephropathy patients. *Nephrol Dial Transplant* 2012 ; 27 : 1090-1097.
- Floege J, Burg M, Kliem V. Recurrent IgA nephropathy after kidney transplantation : not a benign condition. *Nephrol Dial Transplant* 1998 ; 13 : 1933-1935.
- Cuevas X, Lloveras J, Mir M, Aubia J, Masramon J. Disappearance of mesangial IgA deposits from the kidneys of two donors after transplantation. *Transplant Proc* 1987 ; 19 : 2208-2209.
- Barratt J, Feehally J. IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005 ; 16 : 2088-2097.
- Allen AC, Bailey EM, Brenchley PE, Buck KS, Barratt J, Feehally J. Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation : Observations in three patients. *Kidney Int* 2001 ; 60 : 969-973.
- Hiki Y, Odani H, Takahashi M, Yasuda Y, Nishimoto A, Iwase H, Shinzato T, Kobayashi Y, Maeda K. Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2001 ; 59 : 1077-1085.
- Yamaji K, Suzuki Y, Suzuki H, Satake K, Horikoshi S, Novak J, Tomino Y. The kinetics of glomerular deposition of nephritogenic IgA. *PLoS One* 2014 ; 9 : e113005.
- Suzuki H, Moldoveanu Z, Hall S, Brown R, Vu HL, Novak L, Julian BA, Tomana M, Wyatt RJ, Edberg JC, Alarcón GS, Kimberly RP, Tomino Y, Mestecky J, Novak J. IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *J Clin Invest* 2008 ; 118 : 629.

18. Gharavi AG, Moldoveanu Z, Wyatt RJ, Barker CV, Woodford SY, Lifton RP, Mestecky J, Novak J, Julian BA. Aberrant IgA1 glycosylation is inherited in familial and sporadic IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008 ; 19 : 1008-1014.
19. Novak J, et al. IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells. *Kidney Int* 2005 ; 67 : 504-513.
20. Suzuki H, Tomana M, Matousovich K, Brown R, Hall S, Novak L, Julian BA, Wyatt RJ, Mestecky J. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *J Clin Invest* 2009 ; 119 : 1668-1677.
21. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr AB, Renfrow MB, Wyatt RJ, Scolari F, Mestecky J, Gharavi AG, Julian BA. The pathophysiology of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011 ; 22 : 1795-1803.
22. Suzuki H, Suzuki Y, Aizawa M, Yamanaka T, Kihara M, Pang H, Horikoshi S, Tomino Y. Th1 polarization in murine IgA nephropathy directed by bone marrow-derived cells. *Kidney Int* 2007 ; 72 : 319-327.
23. Hashimoto A, Suzuki Y, Suzuki H, Ohsawa I, Brown R, Hall S, Tanaka Y, Novak J, Ohi H, Tomino Y. Determination of severity of murine IgA nephropathy by glomerular complement activation by aberrantly glycosylated IgA and immune complexes. *Am J Pathol* 2012 ; 181 : 1338-1347.
24. Okazaki K, Suzuki Y, Otsuji M, Suzuki H, Kihara M, Kajiyama T, Hashimoto A, Nishimura H, Brown R, Hall S, Novak J, Izui S, Hirose S, Tomino Y. Development of a model of early-onset IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012 ; 23 : 1364-1374.
25. Suzuki H, Suzuki Y, Novak J, Tomino Y. Development of animal models of human IgA nephropathy. *Drug Discov Today Dis Models* 2014 ; 11 : 5-11.
26. McCarthy DD, Kujawa J, Wilson C, Papandile A, Poreci U, Porfilio EA, Ward L, Lawson MA, Macpherson AJ, McCoy KD, Pei Y, Novak L, Lee JY, Julian BA, Novak J, Ranger A, Gommerman JL, Browning JL. Mice overexpressing BAFF develop a commensal flora-dependent, IgA-associated nephropathy. *J Clin Invest* 2011 ; 121 : 3991-4002.
27. Kim YG, Alvarez M, Suzuki H, Hirose S, Izui S, Tomino Y, Huard B, Suzuki Y. Pathogenic role of a proliferation-inducing ligand (APRIL) in murine IgA nephropathy. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0137044.
28. Yanagawa H, Suzuki H, Suzuki Y, Kiryluk K, Gharavi AG, Matsuoka K, Makita Y, Julian BA, Novak J, Tomino Y. A panel of serum biomarkers differentiates IgA nephropathy from other renal diseases. *PLoS One* 2014 ; 23 : e98081.
29. Berthoux F, Suzuki H, Thibaudin L, Yanagawa H, Maillard N, Mariat C, Tomino Y, Julian BA, Novak J. Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012 ; 23 : 1579-1587.
30. Suzuki Y, Matsuzaki K, Suzuki H, Okazaki K, Yanagawa H, Ieiri N, Sato M, Sato T, Taguma Y, Matsuoka J, Horikoshi S, Novak J, Hotta O, Tomino Y. Serum levels of galactose-deficient immunoglobulin (Ig) A1 and related immune complex are associated with disease activity of IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 2014 ; 18 : 770-777.
31. 鈴木 仁, 鈴木祐介. IgA 腎症早期発見のための新規バイオマーカーを用いた血尿の2次スクリーニングの試み. *腎・高血圧の最新治療* 2015 ; 4 : 28-33.
32. Suzuki H, Raska M, Yamada K, Moldoveanu Z, Julian BA, Wyatt RJ, Tomino Y, Gharavi AG, Novak J. Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes. *J Biol Chem* 2014 ; 289 : 5330-5339.