

## 学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	大 高 隆 輝
<p>学位論文題目</p> <p>Up-regulation of CX3CR1 on tonsillar CD8-positive cells in patients with IgA nephropathy (IgA 腎症患者の扁桃 CD8 陽性細胞における CX3CR1 の発現亢進)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>高原 幹、上田 征吾、長門 利純、岸部 幹、野村 研一郎、 片田 彰博、林 達哉、原湊 保明</p> <p>掲 載 雑 誌</p> <p>HUMAN IMMUNOLOGY 78(4):375-383 (2017)</p> <p>研 究 目 的</p> <p>IgA 腎症は IgA が腎糸球体に沈着することが特徴とされる、最も一般的な糸球体腎炎である。当初予後良好と考えられていたが、その後、発症 20-30 年後には患者の 30-40% が末期腎不全に陥る予後不良であることが明らかにされている。本疾患は上気道炎、特に扁桃炎に伴い悪化し、以前から耳鼻咽喉科領域では代表的な扁桃病巣疾患として知られてきた。最近では扁桃摘出術+ステロイドパルス療法がその長期予後に有効であることが示され、腎臓内科の分野でも標準的治療としてガイドラインに示されている。我々はこのように臨床的に実証されている口蓋扁桃と IgA 腎症の関係性について基礎的なエビデンスを追求してきた。その結果、IgA 腎症患者の口蓋扁桃からの IgA 過剰産生に BAFF (B cell activating factor of the TNF family) が関与していることを明らかにした(1)。しかし、まだその全貌が理解されているとは言えない。</p> <p>IgA 免疫複合体の腎糸球体への沈着以外に、それに続発する T 細胞の浸潤も IgA 腎症進展に重要な役割を果たしていることが報告されている。腎組織に浸潤している T 細胞上に発現しているケモカインレセプターの中で、CX3CR1 はその血尿の程度と末梢血 CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞上の CX3CR1 発現に相関があり、CX3CR1 のリガンドであるフラクタルカインが腎糸球体に発現していることが近年報告された(2)。以前我々は IgA 腎症扁桃、末梢血での T 細胞レパトア解析を行い、扁桃 T 細胞が IgA 腎症の腎組織に浸潤する可能性を示した(3)。したがって、扁桃 CX3CR1 陽性 T 細胞がその浸潤を担っている可能性がある。しかし、IgA 腎症扁桃における CX3CR1 を検討した報告はない。</p> <p>今回我々は、①IgA 腎症患者扁桃組織や単核球での CX3CR1 の発現、<i>in vitro</i> における微生物 DNA (CpG-ODN) 等の刺激による CX3CR1 の発現変化、フラクタルカインへの遊走能 ②IgA 腎症患者末梢血単核球での CX3CR1 の発現と、口蓋扁桃摘出による発現変化について検討し、扁桃 CX3CR1 陽性細胞の IgA 腎症の病態における関わりについて考察した。</p>			

## 対 象・方 法

### 1. 患者検体

2012年から2014年までに旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科で口蓋扁桃摘出術を施行したIgA腎症患者20名、非IgA腎症患者25名の患者検体(扁桃、腎生検組織、末梢血)を使用した。全検体はインフォームドコンセントを得た上で研究に使用された。

### 2. 免疫組織染色

口蓋扁桃、腎生検のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し、抗CX3CR1、抗フラクタルカイン抗体を用いて免疫染色を行った。扁桃において顕微鏡下にCX3CR1陽性細胞数をカウントし、 $1\text{mm}^2$ の陽性細胞数を計測した。

### 3. 細胞分離

口蓋扁桃を細断、濾過し比重遠沈法にて扁桃単核球を分離、無菌PBSで5回洗浄した。扁桃摘出前と1ヶ月後に患者より採血を行い、末梢血より末梢血単核球を同様に分離した。

### 3. Two-color flow cytometry

PE標識抗CX3CR1抗体、FITC標識抗CD8抗体を用いて扁桃単核球、末梢血単核球におけるCD8+CX3CR1+細胞数の割合を測定した。

### 4. Cell culture

RPIM 1640培地3mlに $1 \times 10^6$ /mlのTMCsを添加し、12時間培養後、各ウェルに $1 \mu\text{M}$  CPG-ODN、 $1 \mu\text{M}$  non-CPG(Control) ODN、 $50\text{ng/ml}$  recombinant IFN- $\gamma$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$  LPSを添加した。24時間後細胞を回収、two-color flow cytometryを行った。

### 5. Chemotaxis assay

扁桃単核球のフラクタルカインへの遊走能をmigration plateを用いてChemotaxis assayを施行した。3種類の濃度( $0\text{ng/ml}$ 、 $50\text{ng/ml}$ 、 $500\text{ng/ml}$ )のrecombinant フラクタルカインにて12時間培養の後、遊走した細胞数を測定し、遊走能を検討した。

### 6. 統計学的解析

2因子間の検討にはMann-Whitney U検定とSpearmanの順位相関係数、連続変数の検討にはWilcoxonの順位和検定を用いた。いずれも $p < 0.05$ を有意とした。

## 結 果

### 1. 免疫染色によるCX3CR1陽性、フラクタルカイン陽性細胞の分布

IgA腎症患者扁桃濾胞間に、非IgA腎症患者扁桃に比べ有意に多くの陽性細胞数を認めた。IgA腎症患者腎組織でも糸球体、間質、尿細管にCX3CR1陽性細胞を認めた。また、過去の報告と同様、糸球体、間質、尿細管にフラクタルカインの強い染色を認めた。

### 2. 扁桃、末梢血単核球でのTwo-color flow cytometryによるCX3CR1の発現

扁桃単核球においてIgA腎症群でのCD8+CX3CR1+細胞数の割合は非IgA腎症群と比較し有意に増加していた。また、末梢血単核球においてIgA腎症群でのCD8+CX3CR1+細胞数の割合は非IgA腎症群と比較して有意に増加し、口蓋扁桃摘出後その割合は有意に減少していた。また、口蓋扁桃摘出後の血尿が消失した患者( $n=10$ )では末梢血CD8+CX3CR1+細胞数の割合は減少した一方、消失しなかった患者( $n=3$ )ではその割合は減少していなかった。

### 3. CpG-ODN 刺激による IgA 腎症患者扁桃 CD8 陽性 T 細胞の CX3CR1 の発現変化

各種刺激を施行した結果、CpG-ODN 刺激にて、IgA 腎症群での扁桃単核球 CD8+CX3CR1+細胞数の割合は有意に増加していた。しかし、非 IgA 腎症群では増加は認められなかった。また IFN- $\gamma$  刺激においては IgA 腎症群、非 IgA 腎症群の両群ともに陽性細胞数の割合が有意に増加していた。control-ODN と LPS による刺激では両群において変動は認められなかった。

### 4. TMCs のフラクタルカインへの走化反応

Chemotaxis assay の結果、フラクタルカイン濃度 500ng/ml において、IgA 腎症群の扁桃単核球では非 IgA 腎症群と比較して有意に高い遊走能を認めた。

## 考 案

本研究の結果から、IgA 腎症扁桃 CD8 陽性リンパ球は微生物 DNA に高頻度で含まれる CpG 刺激にて IFN- $\gamma$  を介して CX3CR1 を過剰発現し、体循環に放出され、フラクタルカインを発現する腎糸球体にホーミングし、腎炎を促進させる可能性が示唆された。近年、IgA 腎症は IgA 免疫複合体微小血管炎による糸球体腎炎と考えられている。また、CX3CR1 陽性細胞は細胞傷害活性のある CD8 陽性の T 細胞あるいは NK 細胞に発現し、フラクタルカインとの結合により血管炎を来すことが報告されている。よって扁桃由来の CD8+CX3CR1+細胞が腎組織にて血管炎を惹起している可能性がある。我々や Cox ら(2) が示した血尿との関連はその血管炎により促されているかもしれない。さらに、以前より知られている上気道炎や扁桃炎にて血尿が悪化するメカニズムに扁桃由来の CD8+CX3CR1+陽性細胞が関与している可能性がある。

微生物 DNA に高頻度で含まれる CpG は TLR9 に結合し、免疫反応を引き起こす。以前我々は、CpG-ODN 刺激により、IgA 腎症扁桃単核球からの IFN- $\gamma$  と BAFF の産生が増加することを示した(1)。今回の検討においても IgA 腎症扁桃での CpG-ODN による過剰免疫反応が根幹となっている可能性が示唆される。マウスモデルでの CpG 鼻腔噴霧により、血中の IgA 値が上昇し、腎糸球体に IgA が沈着する報告や、TLR9 遺伝子の polymorphism が IgA 腎症の病勢に関与している報告は CpG-TLR9 がその病態に深く関与していることを物語る。これらの結果は TLR9 やその下流にある IFN- $\gamma$ 、CX3CR1 が扁桃との関連性を示すマーカーとして、あるいは治療の標的因子として将来的に応用できる可能性があると考えられた。

## 結 論

1. IgA 腎症群における扁桃 CD8+CX3CR1+細胞数の割合は非 IgA 腎症群と比較して有意に増加していた。
2. CpG-ODN 刺激において、IgA 腎症群での扁桃 CD8+CX3CR1+細胞数の割合は有意に増加していた。
3. IgA 腎症群における末梢血単核球の CD8+CX3CR1+細胞数の割合は非 IgA 腎症群と比較して有意に増加しており、扁桃摘出後有意に減少した。
4. IgA 腎症群での扁桃単核球のフラクタルカインへの遊走能は有意に亢進していた。
5. これらのことから、扁桃由来の CD8+CX3CR1+細胞が IgA 腎症の病態に関与している可能性が示唆された。




## 引用文献

1. Goto T, Bandoh N, Yoshizaki T, Nozawa H, Takahara M, Ueda S, Hayashi T, Harabuchi Y. 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. Clin Immunol.126:260-269. (2008)
2. Nozawa H, Takahara M, Yoshizaki T, Goto T, Bandoh N. and Harabuchi Y. 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)
3. Cox SN, Sallustio F, Serino G, Loverre A, Pesce F, Gigante M, Zaza G, Stifanelli PF, Ancona N, Schena FP. Activated innate immunity and the involvement of CX3CR1-fractalkine in promoting hematuria in patients with IgA nephropathy. Kidney Int. 82:548-560. (2012)

## 参考論文

1. 大高 隆輝, 高原 幹, 野村 研一郎, 坂東 伸幸, 林 達哉, 原渕 保明. 両側 Fan-shaped flap 法にて再建した下口唇扁平上皮癌例. 耳鼻咽喉科臨床 105:193-1197(2012)
2. 大高 隆輝, 片田 彰博, 林 達哉, 原渕 保明. コルヒチンが有効であった再発性多発性軟骨炎の1例. 喉頭 23:119-123(2011)
3. 大高 隆輝, 坂東 伸幸, 野村 研一郎, 高原 幹, 林 達哉, 原渕 保明. 頸部食道に発生した神経鞘腫例. 頭頸部外科 20:63-68(2010)
4. 大高 隆輝, 坂東 伸幸, 小林 祐希, 東谷 敏孝, 太田 亮, 高原 幹, 安部 裕介, 片田 彰博, 林 達哉, 原渕 保明. 耳下腺 salivary duct carcinoma の3例と本邦における臨床的検討. 耳鼻咽喉科臨床 102:131-137(2009)
5. 大高 隆輝, 安部 裕介, 上田 征吾, 高原 幹, 坂東 伸幸, 林 達哉, 原渕 保明. Basaloid squamous cell carcinoma の2例. 耳鼻咽喉科臨床 101:943-949(2008)

## 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	大高 隆輝
		審査委員長	小林 博也 
		審査委員	武井 英博 
		審査委員	藤野 貴行 
<p>学位論文題目</p> <p><b>Up-regulation of CX3CR1 on tonsillar CD8-positive cells in patients with IgA nephropathy</b></p> <p>(邦題: IgA 腎症患者の扁桃 CD8 陽性細胞における CX3CR1 の発現亢進)</p> <p>掲載雑誌: HUMAN IMMUNOLOGY 78 (4) : 375-383 (2017)</p>			
<p>論文提出者は、扁桃病巣疾患である IgA 腎症腎に浸潤する T 細胞に発現の可能性がある CX3CR1 (リガンド: フラクタルカイン) に注目し扁桃 T 細胞の腎浸潤について評価すべく習慣性扁桃炎・IgA 腎症患者より摘出された口蓋扁桃、末梢血、腎生検検体を用いて各種実験検討を行った。その結果、免疫組織染色で IgA 腎症扁桃に有意に多くの CX3CR1 陽性細胞数を認め、腎組織でも CX3CR1 陽性細胞とフラクタルカインの強い染色も認めた。サイトメトリーにて IgA 腎症扁桃単核球 CD8<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>細胞数の割合は有意に増加し、扁桃単核球へ CpG-ODN 刺激をすると IgA 腎症扁桃単核球 CD8<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>細胞数の割合は有意に増加した。IFN-<math>\gamma</math> 刺激では IgA 腎症、習慣性扁桃炎の両群の陽性細胞数の割合が有意に増加した。ケモタキシスアッセイで IgA 腎症扁桃単核球は有意に高い遊走能を認めた。末梢血単核球において IgA 腎症で CD8<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>細胞数の割合は有意に増加し口蓋扁桃摘出後その割合は有意に減少した。また口蓋扁桃摘出後血尿が消失した患者では末梢血 CD8<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>細胞数の割合は減少したが消失しなかった患者では減少しなかった。以上の結果から、IgA 腎症扁桃 CD8 陽性 T 細胞は微生物 DNA 刺激にて IFN-<math>\gamma</math> を介して CX3CR1 を過剰発現し、体循環に放出され、フラクタルカインを発現する腎糸球体にホーミングし、血尿発生、腎炎の促進に関与していることが示唆された。</p> <p>本論文の内容は独創的で、データ解析も十分なされていた。論文提出者は、各審査委員の諮問において当該論文および関連領域に関する質問に的確に答え、十分な知識を有することが確認された。また本論文は国際的学術雑誌である HUMAN IMMUNOLOGY 誌に採択済みである。以上より本審査委員会は、本論文が博士(医学)の学位に値するものと判断した。</p>			