

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09554

研究課題名(和文) IgG4関連疾患における、補体活性化能をもつIgG4の構造的解析

研究課題名(英文) Structural analysis of IgG4 in patients with IgG4-related disease with hypocomplementemia.

研究代表者

渡辺 浩志 (Watanabe, Hiroshi)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40336467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：補体の低下を示すIgG4関連疾患患者血清よりIgG4を分離し、糖鎖解析を試みた。1. 健常人IgG4の糖鎖とIgG4関連疾患患者IgG4の糖鎖の比較では、健常人と比べIgG4関連疾患ではガラクトース欠損IgG4糖鎖濃度およびフコース化IgG4糖鎖濃度が有意に増加しており、2. IgG4関連疾患における低補体血症、腎病変、膵病変、リンパ節腫脹の有無とIgG4糖鎖濃度の比較検討を行った結果、低補体血症を呈するIgG4関連疾患患者より分離したIgG4の糖鎖は、フコースが欠損したIgG4糖鎖濃度が低下していたが、IgG4関連疾患における各病態間においては、IgG4の糖鎖に相違は見られなかった。

研究成果の概要(英文)： This study determined the concentration of N-linked glycans (N-glycan) released from serum IgG4 in IgG4RD patients and compared the difference of glycosylation changes to those in healthy controls. We also compared the concentration of each IgG4 glycoform between patients with and without hypocomplementemia and individual organ involvement (kidney, pancreas, lymph node) in IgG4RD. Significant increases of IgG4 G0 N-glycan and IgG4 fucosylated N-glycan (F1 N-glycan) concentrations were observed in IgG4RD compared with healthy controls. Although we observed decreased levels of IgG4 F0 glycan in IgG4RD with hypocomplementemia, there were no significant differences in the galactosylation and sialylation of IgG4 N-glycans. Furthermore, there were no significant differences in the glycosylation of IgG4 N-glycans between patients with and without individual organ involvement of IgG4RD.

研究分野：リウマチ膠原病

キーワード：IgG4 補体

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患患者において、30%~50%の患者が低補体血症(低 C3、低 C4、低 CH50 血症)を示すことが報告されている(Pancreas 2006;32:16-21, Clin Exp Nephrol 2011;15:615-626)。また、免疫複合体が病態に関与するという報告もある(Am J Surg Pathol 30;1537-1545:2006, Am J Surg Pathol 2007;31:1586-1597)。しかし、IgG4 は古典的経路を介した補体活性化能を持たないことが定説であり、他のサブクラスが IgG4 関連疾患における低補体血症に関与していると考えられてきた。申請者らは、低補体血症を示す IgG4 関連疾患患者の IgG4 は補体の活性化能を持つという仮説をたて、C1q binding assay を行ったところ、低補体血症を示す IgG4 関連疾患患者の IgG4 は C1q に結合することを見出した(IgG4 サブクラスの抗 C1q 抗体でないことは確認済)。さらに、患者血清からポリエチレングリコールを用いて免疫複合体を沈降させ、ウェスタンブロッティングでどの IgG サブクラスが免疫複合体を形成しているか調べたところ、IgG4 が免疫複合体を形成していることが判明した。補体消費試験では、低補体血症を示す IgG4 関連疾患患者群より分離した免疫複合体でのみ正常人の補体を消費した。さらに、補体の経路ごとに活性を測定したところ、低補体血症を呈した患者から分離した免疫複合体を加えた正常血清では古典経路及びレクチン経路の活性が著明に低下していた。以上の所見は、低補体血症を呈する IgG4 関連疾患患者の IgG4 は、古典的経路およびレクチン経路を介して補体を活性化する能力があることを示している。

2. 研究の目的

補体古典経路が活性化されるには、IgG と C1q の結合が必要不可欠である。IgG4 が C1q に結合しない最も主要な理由は、IgG CH2 領域 348 番目のアミノ酸がプロリンでなくセリンであることであり(J Bio Chem 269;3469-3474:1994) 古典的経路を介して補体を活性化する能力を持つ IgG4 では、その部位のアミノ酸配列が正常人の IgG4 とは異なる可能性が考えられる。

一方、IgG4 によるレクチン経路の活性化については、IgG の糖鎖異常の関与が考えられる。例えば、膜性腎症の患者では IgG4 クラスの抗 phospholipase A2 receptor 抗体が出現するが、この IgG4 は抗体の H 鎖の CH2 部位の糖鎖末端のガラクトースが欠損していて、露出した糖鎖に

レクチンが結合し、補体レクチン経路が活性化されるという報告(第 6 回国際補体治療法会議)や、関節リウマチではガラクトース欠損 IgG によるレクチン経路の活性化が関節炎に影響するという報告がある(Nature Med 1995;1:237-243)。さらにクリオグロブリン血症では IgG の糖鎖形成不全で抗体が凝集し古典的経路が活性化されるというセオリーが考えられており、レクチン経路以外でも補体経路の活性化に関与している可能性が考えられる。

以上の理由より、我々は低補体血症を呈する IgG4 関連疾患患者より補体活性化能をもつ IgG4 を分離し、その CH2 領域のアミノ酸配列および糖鎖構造について解析し、正常人および血清補体正常な IgG4 関連疾患患者の IgG4 と比較検討することを目的とする。

3. 研究の方法

低補体血症を呈する IgG4 関連疾患患者血清より補体活性化能をもつ IgG4 を分離し、その CH2 領域のアミノ酸配列および糖鎖構造について、正常人および血清補体の正常な IgG4 関連疾患患者の IgG4 と比較検討を行う。

当初の計画では以下のとおり。

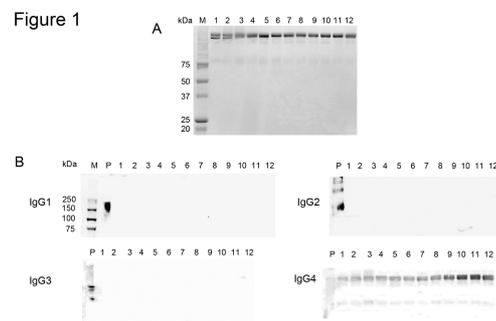
アミノ酸配列の解析: 患者血清からの IgG の分離 抗 IgG4 抗体を用いたアフィニティカラムによる IgG IgG4 の分離

Fc 部分の分離 Fc をポリフッ化ビニリデン膜へ転写 アミノ酸配列の決定。

糖鎖構造の解析: IgG4 の分離まではアミノ酸配列の解析 ~ と同じ。糖鎖の切り出しとピリジルアミノ化 HPLC による糖鎖パターンの解析。

4. 研究成果

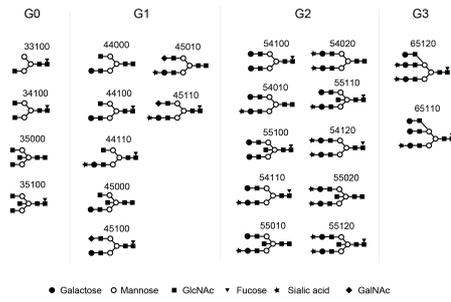
患者血清からの IgG4 の分離について、当初は抗 IgG4 抗体を用いたアフィニティカラムを用いたが、他の IgG サブクラスの混入があり、分離に難渋した。そこで、Capture Select IgG4 を購入し、分離を試みたところ、他のサブクラスの混入がほぼない IgG4 の分離に成功した。



患者より分離した IgG4 を用いた糖鎖解析については、当初の予定と異なり、MALDI-TOF MS による自動糖鎖解析プラットフォーム

GlycanMap を用いて、IgG4 の N-glycan の組成について解析した。

Figure 3



その結果、IgG4 関連疾患患者の IgG4G0 および F1glycan 濃度は健常人より高く、

Figure 9

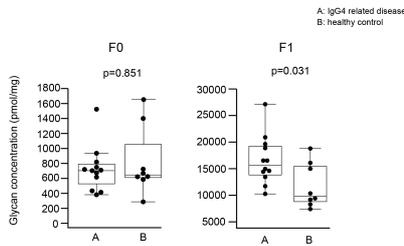
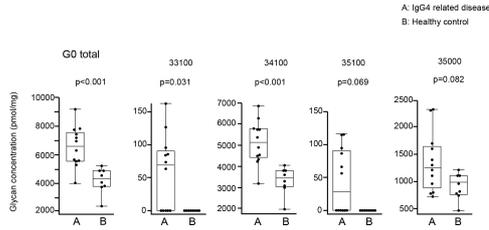


Figure 4



	Hypocomplementemia (+) Patients 1 - 7 (n = 7) Median (range)	Hypocomplementemia (-) Patients 8 - 12 (n = 5) Median (range)	p value
G0 (%)	36.1 (30.7 - 44.7)	36.6 (32.8 - 48.2)	0.876
G0 (pmol/mg)	7204.8 (5322.8 - 7817.3)	5641.9 (4039.6 - 9210.5)	0.432
G1 (%)	23.8 (22.5 - 24.3)	24.7 (21.6 - 27.2)	0.530
G1 (pmol/mg)	4048.8 (3694.5 - 5036.2)	3434.9 (2724.5 - 6065.8)	0.343
G2 (%)	39.3 (32.2 - 45.5)	37.5 (27.7 - 45.5)	0.343
G2 (pmol/mg)	6201.3 (5542.9 - 9337.7)	4283.0 (3505.8 - 12763.2)	0.202
G3 (%)	0.5 (0.0 - 1.1)	0.5 (0.0 - 0.7)	0.876
G3 (pmol/mg)	74.7 (0.0 - 251.2)	64.0 (0.0 - 102.5)	0.755
F0 (%)	3.5 (2.0 - 4.4)	6.5 (2.8 - 9.6)	0.030
F0 (pmol/mg)	626.8 (394.8 - 4.4)	784.2 (722.6 - 1537.1)	0.030
F1 (%)	96.5 (95.6 - 98.0)	93.5 (90.4 - 97.2)	0.030
F1 (pmol/mg)	16,583.9 (14,760.6 - 21,205.5)	13,592.5 (10,324.5 - 27,255.3)	0.106
S0 (%)	61.0 (52.8 - 64.8)	63.5 (55.7 - 69.7)	0.343
S0 (pmol/mg)	10,824.6 (8952.8 - 12,251.5)	9343.9 (7009.4 - 15,631.6)	0.268
S1 (%)	23.7 (21.1 - 26.1)	22.0 (19.5 - 27.5)	0.530
S1 (pmol/mg)	3854.4 (3600.0 - 5552.0)	2835.0 (2432.1 - 7002.6)	0.343
S2 (%)	15.4 (13.7 - 21.2)	14.0 (10.7 - 19.3)	0.202
S2 (pmol/mg)	2622.0 (2412.5 - 4374.0)	1930.0 (1358.1 - 5405.3)	0.106

低補体血症を伴う IgG4 関連疾患患者では、低補体血症のない IgG4 患者と比べ、IgG4F0glycan 濃度が低く (上表)

IgG4 関連患者におけるそれぞれの臓器障害の有無と糖鎖の組成には関連がないことを見出した。
膵病変の有無と糖鎖組成の比較

	Autoimmune pancreatitis (+) n = 4 Median (range)	Autoimmune pancreatitis (-) n = 8 Median (range)	p value
G0 (%)	35.8 (35.09 - 44.7)	37.3 (30.7 - 48.2)	NS
G0 (pmol/mg)	5458.4 (4039.6 - 7698.2)	7079.9 (5641.9 - 9210.5)	NS
G1 (%)	24.5 (22.5 - 27.0)	23.3 (21.6 - 27.2)	NS
G1 (pmol/mg)	3786.5 (2724.5 - 4318.8)	4328.0 (3240.0 - 6065.8)	NS
G2 (%)	38.1 (32.2 - 40.6)	38.5 (27.7 - 45.5)	NS
G2 (pmol/mg)	5765.3 (4283.5 - 6157.5)	6750.1 (3505.8 - 12763.2)	NS
G3 (%)	0.3 (0 - 0.5)	0.5 (0 - 1.1)	NS
G3 (pmol/mg)	40.9 (0 - 91.1)	69.3 (0 - 251.2)	NS
F0 (%)	5.1 (2.7 - 9.6)	3.6 (2.0 - 6.5)	NS
F0 (pmol/mg)	674.7 (414.2 - 1537.1)	735.0 (394.8 - 942.5)	NS
F1 (%)	94.9 (90.4 - 97.3)	96.4 (93.5 - 98.0)	NS
F1 (pmol/mg)	14602.9 (10324.5 - 16583.9)	17751.7 (11901.2 - 27255.3)	NS
S0 (%)	61.2 (58.5 - 64.8)	61.8 (52.8 - 69.7)	NS
S0 (pmol/mg)	9148.3 (7009.4 - 11160.7)	10737.9 (8817.4 - 15631.6)	NS
S1 (%)	22.9 (21.1 - 27.5)	23.3 (19.5 - 26.1)	NS
S1 (pmol/mg)	3618.8 (2432.1 - 4393.2)	4157.1 (2470.9 - 7002.6)	NS
S2 (%)	14.3 (14.0 - 17.3)	15.0 (10.7 - 21.2)	NS
S2 (pmol/mg)	2328.8 (1605.7 - 2622.0)	2565.0 (1358.1 - 5405.3)	NS

腎病変の有無と糖鎖組成の比較

	Kidney disease (+) n = 6 Median (range)	Kidney disease (-) n = 6 Median (range)	p value
G0 (%)	39.3 (30.7 - 48.2)	36.0 (35.0 - 44.6)	NS
G0 (pmol/mg)	7079.9 (5702.5 - 9210.5)	5617.9 (4039.6 - 7817.3)	NS
G1 (%)	22.6 (21.6 - 24.1)	24.5 (22.9 - 27.2)	NS
G1 (pmol/mg)	3963.7 (3240.0 - 6065.8)	4006.6 (2724.5 - 5036.2)	NS
G2 (%)	36.5 (28.6 - 45.5)	38.2 (27.2 - 40.6)	NS
G2 (pmol/mg)	5963.8 (4132.5 - 12763.2)	6072.6 (3505.8 - 8925.2)	NS
G3 (%)	0.5 (0.0 - 1.0)	0.3 (0.0 - 1.1)	NS
G3 (pmol/mg)	82.9 (0.0 - 198.4)	32.0 (0.0 - 251.2)	NS
F0 (%)	3.6 (2.6 - 6.5)	4.8 (2.0 - 9.6)	NS
F0 (pmol/mg)	710.4 (448.8 - 942.5)	734.0 (394.8 - 1537.1)	NS
F1 (%)	96.4 (93.5 - 97.4)	95.2 (90.4 - 98.0)	NS
F1 (pmol/mg)	16,557.6 (13,592.5 - 27,255.3)	14602.9 (10,324.5 - 21,205.5)	NS
S0 (%)	61.8 (52.8 - 67.2)	61.1 (54.9 - 69.7)	NS
S0 (pmol/mg)	10,737.9 (9620.3 - 15,631.6)	9148.3 (7009.4 - 12,251.5)	NS
S1 (%)	23.2 (19.5 - 26.1)	23.4 (19.5 - 27.5)	NS
S1 (pmol/mg)	3793.7 (2835.0 - 7002.6)	3996.6 (2432.1 - 5552.0)	NS
S2 (%)	15.0 (13.3 - 21.2)	14.3 (10.7 - 19.9)	NS
S2 (pmol/mg)	2452.4 (1930.0 - 5405.3)	2433.6 (1358.1 - 4374.0)	NS

リンパ節腫脹と糖鎖組成の比較

	Lymphadenopathy (+) n = 7 Median (range)	Lymphadenopathy (-) n = 5 Median (range)	p value
G0 (%)	36.1 (32.8 - 48.2)	36.4 (30.7 - 44.7)	NS
G0 (pmol/mg)	7204.8 (5322.8 - 9210.5)	5641.9 (4039.6 - 7698.2)	NS
G1 (%)	23.8 (21.6 - 24.3)	24.7 (22.5 - 27.2)	NS
G1 (pmol/mg)	4048.8 (3240.0 - 6065.8)	3878.6 (2724.5 - 4667.2)	NS
G2 (%)	39.3 (28.6 - 45.5)	37.5 (27.7 - 45.5)	NS
G2 (pmol/mg)	6201.3 (4132.5 - 12763.2)	5542.9 (3505.8 - 9337.7)	NS
G3 (%)	0 (0.0 - 1.1)	0.5 (0.0 - 1.0)	NS
G3 (pmol/mg)	0 (0 - 251.2)	81.7 (0.0 - 198.4)	NS
F0 (%)	2.8 (2.0 - 6.5)	5.9 (3.5 - 9.6)	NS
F0 (pmol/mg)	696.2 (394.8 - 942.5)	724.6 (626.8 - 1537.1)	NS
F1 (%)	97.2 (93.5 - 98.0)	94.1 (90.4 - 96.5)	NS
F1 (pmol/mg)	16,531.2 (13,592.5 - 27,255.3)	14,445.1 (10,324.5 - 19,782.0)	NS
S0 (%)	61.0 (54.9 - 67.2)	63.5 (52.8 - 69.7)	NS
S0 (pmol/mg)	10,651.2 (8952.8 - 15,631.6)	9343.9 (7009.4 - 11,160.7)	NS
S1 (%)	23.7 (19.5 - 25.2)	22.0 (19.5 - 27.5)	NS
S1 (pmol/mg)	3854.4 (2835.0 - 7002.6)	3637.5 (2432.1 - 5342.6)	NS
S2 (%)	15.4 (13.3 - 19.9)	14.0 (10.7 - 21.2)	NS
S2 (pmol/mg)	2622.0 (1930.0 - 5405.3)	2245.1 (1358.1 - 4339.3)	NS

残念ながらアミノ酸解析については、IgG4 の分離およびFc部分の精製までは成功したが、アミノ酸解析が可能であるペプチド残基数まで調整ができず、今回の研究期間内に終了できなかった。

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 1件)

Changes in N-glycans of IgG4 and its relationship with the existence of hypocomplementemia and individual organ involvement in patients with IgG4-related disease.

Konno N, Sugimoto M, Takagi T, Furuya M, Asano T, Sato S, Kobayashi H, Migita K, Miura Y, Aihara T, Komatsuda A, Ohira H, Watanabe H.

PLoS One. 2018 Apr 19;13(4):e0196163. doi: 10.1371/journal.pone.0196163. eCollection 2018.

PMID: 29672582

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 浩志 (WATANABE, Hiroshi)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40336467

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号:

(4)研究協力者 ()