

令和元年6月26日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09607

研究課題名(和文) 腎系球体メサンギウム細胞とIgA1の相互作用および関連分子による修飾機構

研究課題名(英文) Interaction between glomerular mesangial cell and IgA1 and its modification by related molecules

研究代表者

金子 佳賢 (Kaneko, Yoshikatsu)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：80444157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：IgA腎症は腎系球体メサンギウム領域へのIgA1の沈着を特徴とする。IgA1はメサンギウム細胞に発現するインテグリン $\alpha 1 / \beta 1$ および $\alpha 2 / \beta 1$ を介して沈着するが、IgA1との結合によりメサンギウム細胞に細胞内情報伝達物質のリン酸化を引き起こすのはインテグリン $\alpha 2 / \beta 1$ であった。またトランスグルタミナーゼ2 (TGM2) は、インテグリン同士やインテグリンと細胞外基質を結合させる働きが報告されているが、TGM2の発現を同様にノックダウンさせ、IgA1と反応させたところ、IgA1の添加による遺伝子発現が抑制されており、IgA1とインテグリン $\alpha 2$ の結合にTGM2が関与していることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgA腎症においてどのようにIgAが腎系球体メサンギウム細胞に沈着し、系球体腎炎を生じるかについては完全には明らかにされておらず、またIgAが沈着しても系球体腎炎が進行して末期腎不全に至る場合もあれば、ほとんど系球体腎炎が進行しない場合もあり、どのように予後が分かれるかについては明らかではない。本研究はIgAの沈着メカニズムを明らかにしただけではなく、2種類のインテグリンの発現バランスにより、IgAが沈着してもメサンギウム細胞の反応が異なる可能性を指摘しており、インテグリンの発現バランスをみることでIgA腎症の予後予測が可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：IgA nephropathy is characterized by glomerular mesangial IgA deposition. We revealed that IgA1 binds mesangial cell through integrin $\alpha 1 / \beta 1$ and $\alpha 2 / \beta 1$. We discovered that interaction between IgA1 and integrin $\alpha 2 / \beta 1$ activated signal transduction in cultured mesangial cells. Transglutaminase 2, a highly complex multifunctional protein, collaborates with integrins through a direct noncovalent interaction and forms stable ternary complexes with both integrins and extracellular matrices. Knock-down of TGM2 by siRNA reduced gene expressions induced by interaction between IgA1 and mesangial cells, suggesting that TGM2 would be essential in the interaction between IgA1 and integrin $\alpha 2$.

研究分野：腎臓病学

キーワード：IgA腎症 インテグリン メサンギウム細胞

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は腎系球体メサンギウム細胞の増殖性変化とメサンギウム領域への IgA1 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、発症後約 20 年で 20% から 30% の患者に腎機能低下が認められ、末期腎不全に至る主要な原疾患のひとつである。IgA 腎症の発症機序は徐々に解明されつつあり、ある遺伝的背景をもとに、IgA1 のヒンジ領域に存在する O-グリカンに糖鎖異常を持つ IgA1 が、扁桃を主体とする上気道感染に伴い産生され、単独で、もしくは糖鎖異常 IgA1 に対する IgG または IgA1 型自己抗体あるいは可溶性 Fc α 受容体 (sFc α R) と複合体を形成し、メサンギウム細胞に沈着し、メサンギウム細胞の増殖および細胞外基質の増生を促して腎炎を発症する、多段階発症メカニズムが提唱されているが、IgA1 のメサンギウム細胞沈着およびその後の情報伝達、遺伝子発現における詳細なメカニズムに関しては未だ解明されていない点も残されている。

2. 研究の目的

我々はかつて、メサンギウム細胞上の IgA1 受容体としてインテグリン α 1/ β 1 および α 2/ β 1 を同定し、報告した (Kaneko Y et al. *Int Immunol* 2012)。さらに、IgA1 との反応で、メサンギウム細胞にインテグリン α 1 および α 2 の発現が促進され、IgA1 に応答した細胞外基質の産生はインテグリン α 1 が欠損しても保たれているが、インテグリン α 2 欠損下では減弱しており、インテグリン α 1 は抑制的に働いている可能性が示唆された。そこで申請者らは、IgA1 がメサンギウム細胞のインテグリン α 1/ β 1 および α 2/ β 1 と結合した際の細胞内情報伝達メカニズムの違いや生体への作用を解明し、さらに IgA1 の受容体と考えられているトランスフェリン受容体 (TfR)、あるいはメサンギウム細胞への IgA1 の沈着に関与していると報告されている sFc α R、トランスグルタミナー 2 (TGM2) 等の関連分子との相互作用を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

IgA 腎症に特徴的とされるメサンギウム細胞への IgA1 の沈着には、上記のようにインテグリン α 1 および α 2 を介している。そこで siRNA を用いてインテグリン α 1、 α 2 ならびに、IgA1 の受容体として報告されている TfR をそれぞれ特異的にノックダウンしたメサンギウム細胞を用いて、IgA1 との共培養によるメサンギウム細胞内の情報伝達物質を解析した。また、TGM2 は、インテグリン同士やインテグリンと細胞外基質を結合させる働きが報告されている。そこで siRNA を用いて TGM2 の発現を同様にノックダウンさせ、IgA1 と反応させた。さらに、TGM2 および sFc α R が IgA1 とメサンギウム細胞の結合に果たす役割を解明するため、リコンビナント蛋白の作成を試みた。

4. 研究成果

インテグリン α 1 をノックダウンしたメサンギウム細胞では、コントロール用 siRNA を反応させたメサンギウム細胞と同様に、IgA1 の添加により ERK 1/2、WNK をはじめとする各種情報伝達物質のリン酸化が認められたが、TfR をノックダウンしたメサンギウム細胞ではこれらのリン酸化が減弱ないし消失しており、さらにインテグリン α 2 をノックダウンしたメサンギウム細胞ではそのほとんどが消失していた。このことから、IgA1 によるメサンギウム細胞の情報伝達は、一部 TfR を介するものの、その主要部分はインテグリン α 2 を介したものであると考えられた。また、TGM2 の発現を siRNA にてノックダウンし、IgA1 と反応させたところ、コントロール用 siRNA を反応させたメサンギウム細胞と比較して IgA1 の添加によるインテグリン α 1、 α 2 や細胞外基質の発現が抑制されており、IgA1 とインテグリン α 2 の結合に TGM2 が関与していることが推察された。また、TfR のリガンドであるトランスフェリンを IgA1 とともにメサンギウム細胞に添加したが、発現遺伝子に違いは見られなかった。

TGM2 は非共有結合的にインテグリンヘテロダイマーのクラスターを形成し、細胞外基質とインテグリンを結びつける作用を有することから、TGM2 が過剰に存在した場合にはメサンギウム細胞の反応性が增強されることが想定されたため、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と TGM2 の融合リコンビナント蛋白作成を試み、pGEX 発現ベクターの GST の C 末端にヒト TGM2 遺伝子を組み換えたベクターを作成した。大腸菌に形質転換し、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシドにて蛋白合成誘導を行ったが、GST 単独では産生誘導されるものの、GST-TGM2 融合蛋白は大腸菌内にて誘導されなかった。反応温度や反応時間、イソプロピル- β -チオガラ

トピラノシド濃度など各種条件で誘導を試みたが、融合蛋白合成はできなかつたため、ヒト TGM2遺伝子をpHEK293発現ベクターに組換えて、メサンギウム細胞内でTGM2を発現させる方針とし、発現ベクターを作成したが、この方法でもTGM2の発現は認められなかつた。

また、IgAと複合体を形成するsFcαRのリコンビナント蛋白を作成する実験も数種の発現ベクターで試みたが、こちらも蛋白の発現が認められなかつた。発現誘導条件を数種類試みたがいずれも成功せず、蛋白が発現しない原因は不明であつた。

本研究の主題はインテグリンを介したメサンギウム細胞とIgAの相互作用の解明であり、研究計画に記載したリコンビナント蛋白の作成がいずれも成功しなかつたため、実験手法を根本的に改め、インテグリン欠損マウスを用いたin vivoでの相互作用を解明することに方針転換した。B-cell activating factor of the TNF family (BAFF)遺伝子のトランスジェニックマウスでは、腸内細菌の存在下で高IgA血症と腎糸球体メサンギウム細胞へのIgAの沈着、ならびにアルブミン尿、糸球体硬化を発症させることが報告されている (McCarthy DD et al. *J Clin Invest* 2011)。そこでマウス腎糸球体メサンギウム細胞にIgAが沈着するモデルを作成するため、BAFF遺伝子を持つ発現プラスミドベクターを静水圧法で肝細胞に導入したところ、遺伝子導入1か月後に高IgA血症ならびにメサンギウム細胞にIgAが沈着するモデルの開発に成功した。さらに、BAFF遺伝子導入7か月後にはアルブミン尿が出現することが明らかとなつた。今後はこのモデルをインテグリンα1やインテグリンα2遺伝子欠損マウスに応用してIgA沈着後にアルブミン尿、糸球体硬化におけるインテグリンの役割を解明できるとともに、IgA沈着後の糸球体内の遺伝子発現の網羅的解析により、IgA腎症の発症・進展に重要な遺伝子の同定、さらにその遺伝子を欠損あるいは過剰発現させたマウス作成により、IgA腎症の発症・進展様式の解明に使用できる実験系の構築に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Yoshikatsu Kaneko, Takamasa Cho, Yuya Sato, Kei Goto, Suguru Yamamoto, Shin Goto, Michael P Madaio, Ichiei Narita: Attenuated macrophage infiltration in glomeruli of aged mice resulting in ameliorated kidney injury in nephrotoxic serum nephritis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 73, 1178-1186, 2018. doi: 10.1093/gerona/gly019.
2. Hirofumi Watanabe, Shin Goto, Daisuke Kondo, Takuma Takata, Hajime Yamazaki, Michihiro Hosojima, Suguru Yamamoto, Yoshikatsu Kaneko, Ryuji Aoyagi, Ichiei Narita: Comparison of methods of steroid administration combined with tonsillectomy for IgA nephropathy patients. *Clin Exp Nephrol* 21, 257-265, 2017. doi: 10.1007/s10157-016-1282-8.
3. Kei Goto, Yoshikatsu Kaneko, Yuya Sato, Tadashi Otsuka, Suguru Yamamoto, Shin Goto, Keiko Yamamoto, Tadashi Yamamoto, Hiroshi Kawachi, Michael P Madaio, Ichiei Narita: Leptin deficiency down-regulates IL-23 production in glomerular podocyte resulting in attenuated immune response in nephrotoxic serum nephritis. *Int Immunol* 28, 197-208, 2016. doi: 10.1093/intimm/dxv067.
4. Yoshikatsu Kaneko, Kazuhiro Yoshita, Emiko Kono, Yumi Ito, Naofumi Imai, Suguru Yamamoto, Shin Goto, Ichiei Narita: Extracapillary proliferation and arteriolar hyalinosis are associated with long-term kidney survival in IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 20, 569-577, 2016. doi: 10.1007/s10157-015-1185-0.

〔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：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.niigata-u.ac.jp/nephrol/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：成田 一衛

ローマ字氏名：(NARITA, Ichiei)

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：教授

研究者番号（8 桁）：20272817

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。