

令和元年6月27日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09632

研究課題名(和文) IgA腎症における血液中IgA免疫複合体のプロテオミクス解析

研究課題名(英文) Proteomic analysis of IgA immune complexes in IgA nephropathy

研究代表者

高橋 和男 (Takahashi, Kazuo)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：90631391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：IgA腎症は、わが国に高頻度に認められる慢性糸球体腎炎である。患者血液中に糖鎖異常IgA1を含む免疫複合体が形成され、腎糸球体メサンギウム領域に沈着し炎症を惹起すると考えられる。その血液中IgA免疫複合体の分子量は70万Da以上であり、IgA1はその他のタンパク質と結合していると考えられるが、その詳細な構造は明らかではない。そこで本研究は、高分解能質量分析計を用いて、血液中のIgA免疫複合体に含まれるタンパク質の同定・定量、同定されたタンパク質・IgA1複合体の糸球体からの検出・定量を行った。血液中のIgA免疫複合体の糸球体沈着に関与が示唆される複数のタンパク質を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgA腎症ではIgA免疫複合体が沈着し腎炎を発症すると考えられるため、糸球体沈着性IgA免疫複合体の構造を明らかとすることより、IgA免疫複合体沈着機序の解明、IgA免疫複合体の新規バイオマーカーとしての応用、さらにはIgA免疫複合体をターゲットとした新規創薬に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Serum level of abnormally glycosylated IgA1 is elevated in patients with IgA nephropathy (IgAN) and formation of circulating IgA-immune complexes (IgA-IC) leads glomerular deposition. To address molecular characterization of IgA-IC, we quantitatively identified proteins in IgA-IC as well as in glomeruli derived from IgAN patients. Quantitative assessment of IgA-protein complex identified 38 proteins increasing more in IgAN than healthy control. Within these 38 proteins, 10 proteins were decreasing after treatment. Regarding glomerular proteome, we detected 290 proteins increasing in IgAN. Proteins increasing both in blood and glomerulus seems to be proteins related with glomerular deposition and/or pathogenic pathway. Analysis of both IgA-IC from serum and tissue by proteomic technique is a promising powerful method to identify specific proteins related with the pathogenesis of IgAN.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：IgA腎症 プロテオミクス 質量分析計 免疫複合体 糖鎖

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症 (IgAN; IgA nephropathy) は、わが国の腎生検で診断される疾患の約 1/3 を占める高頻度な腎炎で、20 年の経過で約 40% が末期腎不全に陥る。IgAN は既存マーカーでは診断できず腎生検でのみ確定診断される。IgAN は血液中の IgA を含む免疫複合体が腎臓に沈着し、腎炎を惹起すると考えられるが、その免疫複合体の詳細は不明であり、病因解明の妨げになっている。

IgAN では、糖鎖異常 IgA1 とそれに対応する自己抗体の形成を認めると報告されている。糖鎖異常 IgA1 単独で腎炎は生じず、腎炎惹起には Multi-hit が必要と考えられ、IgA 腎症の病因に Multi-hit mechanism が提唱されている (JASN 2011, NEJM 2013)。すなわち、IgAN 患者では血液中の糖鎖異常 IgA1 が増加し (Hit 1)、糖鎖異常 IgA1 に対する自己抗体 (IgG または IgA type) が産生され (Hit 2)、Hit 3 として、患者血液中に糖鎖異常 IgA1 を含む免疫複合体 (IgA 免疫複合体; IgA-IC) が形成され、メサンギウムへの IgA 沈着と腎炎惹起 (Hit 4) を生じると考えられる。

IgAN 患者血液中には、ヒト培養メサンギウム細胞増殖を促す分子量 (MW) 70 万 Da 以上の IgA-IC が存在する (JCI 1999, KI 2002, 2005, NDT 2011)。その IgA-IC を構成するタンパク質としては、IgG が報告されており、糖鎖異常 IgA1 に対する自己抗体形成の一つの根拠となっている。しかし 2 量体 IgA の MW は約 36 万 Da で、IgG の MW は 15 万 Da であり、総計 MW は 70 万 Da 以下となることから、IgA-IgG 以外のタンパク質の存在が疑われる。また IgAN 患者の一部は上気道感染後に腎炎の悪化を認めることから、IgA の対応抗原が IgA-IC に含まれている可能性もある。IgA-IC の構成を明らかにすることは、病因解明の大きな一助になると考えられる。

### 2. 研究の目的

患者血液中に糖鎖異常 IgA1 を含む免疫複合体が形成され、腎糸球体メサンギウム領域に沈着し炎症を惹起すると考えられる。その血液中 IgA 免疫複合体の分子量は 70 万 Da 以上であり、IgA1 はその他のタンパク質と結合していると考えられるが、その詳細な構造は明らかではない。そこで本研究は、高分解能質量分析計を用い、血液中の IgA-IC に含まれるタンパク質の同定・定量、同定されたタンパク質・IgA1 複合体の糸球体からの検出・定量を行い、IgA-IC の沈着機序の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

血液中の IgA 免疫複合体に含まれるタンパク質の同定・定量

IgAN 患者 (n=10) の治療前及び治療後血清、健常者 (n=8) の血清から IgA-IC を分離し、高分解能質量分析計 (Orbitrap Fusion) にて IgA-IC 含有タンパク質を定量的に同定した。

糸球体タンパク質の同定

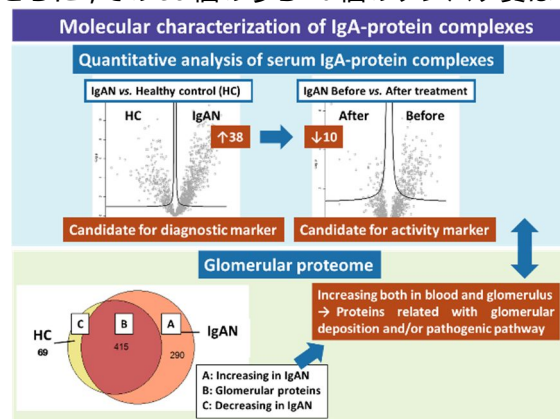
IgAN 患者のパラフィン包埋腎生検組織及び健常者より、Laser microdissection (LMD) にて糸球体を 100 個採取し、Orbitrap Fusion にてタンパク質の定量的同定を行った。

を比較し、共通タンパク質を同定した。

### 4. 研究成果

血液中の IgA-IC に含まれるタンパク質の同定・定量に関して、高分解能質量分析計による non-label の定量的同定法を確立し、IgAN 患者 (n=10)、健常者 (n=8) の血清より affinity purification にて IgA 及び IgA 結合タンパク質を分離し、高分解能質量分析計にてタンパク質の同定・定量を行ったところ、IgA 腎症の血清 IgA は健常者の IgA よりも特定のタンパク質 (38 個) において有意な相互作用を持つことが明らかとなった。さらに、その 38 個のうち 10 個のタンパク質は治療後に有意な低下を認めた (図上段)。

タンパク質・IgA1 複合体の糸球体からの検出・定量について、腎生検パラフィン保存の糸球体のタンパク質の定量的解析基盤を確立し、IgAN 患者腎生検パラフィン切片より LMD 法にて糸球体を分離し、IgA 腎症患者糸球体に有意に増加するタンパク質を 290 個同定した (図下段)。一部のタンパク質は IgAN 患者 IgA と相互作用を持つタンパク質と共通であり、IgA と共に共沈着するタンパク質が明らかとなった。これらタンパク質をターゲットとした新たな検出法の確立を目指すとともにその病的意義について臨床・基礎的な研究を進めている。



### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Ito Y, Tatsukawa H, Yamaguchi H, Takahashi K, Hitomi K, Yuzawa Y. Detection and identification of potential transglutaminase 2 substrates in the mouse renal glomeruli. Arch Biochem Biophys. 660:11-19.2018
- 2) Kondo A, Takahashi K, Yamaguchi H, Inaguma D, Hasegawa M, Hiki Y, Yuzawa Y. (他 5 名) Mass

- spectrometry-based approach for development of biomarkers in IgA nephropathy: a pilot trial. *Fujita Medical Journal*. 4:36-41.2018
- 3) Nakajima K, Kizuka Y, Yamaguchi Y, Hirabayashi Y, Takahashi K, Yuzawa Y, Taniguchi N. Identification and characterization of UDP-mannose in human cell lines and mouse organs: Differential distribution across brain regions and organs. *Biochem Biophys Res Commun*. 495:401-407.2018
  - 4) Kondo A, Takahashi K, Mizuno T, Hiki Y, Yoshida S, Miura K, Yuzawa Y.(他 7 名) The Level of IgA Antibodies to Endothelial Cells Correlates with Histological Evidence of Disease Activity in Patients with Lupus Nephritis. *PLoS One*. 11:e0163085.2016
  - 5) Serino G, Pesce F, Takahashi K, Yuzawa Y, Maruyama S, Imai E, Schena FP(他 12 名) In a retrospective international study, circulating miR-148b and let-7b were found to be serum markers for detecting primary IgA nephropathy. *Kidney Int*. 89:683-92.2016
- [学会発表](計 29 件)
- 1) Ohyama Y, Takahashi K, Yamaguchi H, Matsushita S, Nakajima K, Hayashi H, Koide S, Inaguma D, Hasegawa M, Renfrow MB, Novak J, Hiki Y, Yuzawa Y. Comparison of IgA1 hinge-region O-glycoforms between patients with IgA nephropathy and healthy subjects. *Kidney Week 2018*
  - 2) Ohyama Y, Takahashi K, Yamaguchi H, Matsushita S, Nakajima K, Hayashi H, Koide S, Inaguma D, Hasegawa M, Renfrow MB, Novak J, Hiki Y, Yuzawa Y. Comparison of IgA1 hinge-region O-glycoforms and Gd-IgA level between patients with IgA nephropathy and healthy subjects. *International IgA Nephropathy Symposium 2018*
  - 3) Ohyama Y, Takahashi K, Matsushita S, Yamaguchi H, Nakajima K, Mizuno T, Hayashi H, Koide S, Inaguma D, Hasegawa M, Renfrow MB, Novak J, Hiki Y, Yuzawa Y. Analysis of IgA1 hinge-region O-glycoforms of multiracial healthy subjects by mass spectrometry. *ISN Frontiers Meeting 2018*
  - 4) Ohyama Y, Takahashi K, Matsushita S, Yamaguchi H, Nakajima K, Mizuno T, Hayashi H, Koide S, Inaguma D, Hasegawa M, Novak J, Hiki Y, Yuzawa Y. Racial Comparison of IgA1 Hinge-Region O-Glycoforms by High-Resolution Mass Spectrometry. *Kidney Week 2017*
  - 5) Takahashi K, Yamaguchi H, Ohyama Y, Kato A, Matsushita S, Yoshida Y, Mizuno T, Fukamachi Y, Yokoi Y, Hiki Y, Renfrow MB, Novak J, Yuzawa Y. Comprehensive high-throughput analysis of IgA1 O-glycoforms by a sequential deglycosylation protocol. *16th Human Proteome Organisation World Congress*. 2017
  - 6) Stewart TJ, Takahashi K, Raska M, Placzek WJ, Novak J, Renfrow MB. Analysis of clustered activity of GalNAc-T2 on IgA1 hinge region reveals new roles for initial glycan position on subsequent glycosylation. *ASMS Conference on Mass Spectrometry*. 2017.
  - 7) Takahashi K, Yamaguchi H, Ohyama Y, Kato A, Mizuno T, Hiki Y, Renfrow MB, Novak J, Yuzawa Y. Comprehensive Analysis of IgA1 Hinge-Region O-Glycoforms in Patients with IgA Nephropathy. *Kidney Week 2016*
  - 8) Kato A, Mizuno T, Takahashi K, Yoshida Y, Tatsukawa H, Mizuno M, Hitomi K, Yuzawa Y. Elucidation of the Roles of Tissue Transglutaminase in Mesangial Proliferative Glomerulonephritis. *Kidney Week 2016*
  - 9) Stewart TJ, Takahashi K, Suzuki H, Hall SD, Brown R, Moldoveanu Z, Raska M, Julian BA, Novak J, Renfrow MB. New methods for assessments of clustered O-glycosylation and determining the role of ST6GalNAc-II in the formation of galactose-deficient IgA1 in the autoimmune disease IgA nephropathy. *Society for Glycobiology annual meeting 2016*
  - 10) Takahashi K, Yamaguchi H, Ohyama Y, Kato A, Yoshida Y, Mizuno T, Hiki Y, Renfrow MB, Novak J, Yuzawa Y. Comprehensive analysis of IgA1 hinge-region O-glycoforms by a sequential deglycosylation protocol. *International IgA Nephropathy Symposium 2016*
  - 11) Takahashi K, Mizuno T, Onouchi T, Yoshida Y, Ohyama Y, Akiyama S, Tatsukawa H, Hiki Y, Kusaka M, Nagamatsu T, Tsutsumi Y, Maruyama S, Kitamura H, Novak J, Hitomi K, Yuzawa Y. Mesangial Tissue Transglutaminase Activity in Patients with IgA Nephropathy: Implications for the Pathogenesis. *International IgA Nephropathy Symposium 2016*
  - 12) Takahashi K, Mizuno T, Onouchi T, Yoshida Y, Ohyama Y, Akiyama S, Tatsukawa H, Hiki Y, Kusaka M, Nagamatsu T, Tsutsumi Y, Maruyama S, Kitamura H, Hitomi K, Yuzawa Y. Detection of Mesangial Tissue Transglutaminase Activity in Glomerulonephritis: Implications for the Pathogenesis. *Gordon Research Conference on Transglutaminases in Human Disease Processes*. 2016
  - 13) Stewart TJ, Takahashi K, Raska M, Julian BA, Renfrow MB, Novak J. New methods enabling molecular characterization of autoantigen formation in an autoimmune disease, IgA nephropathy. *Annual Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS) meeting*. 2016
  - 14) 高橋 和男, 湯澤 由紀夫. 腎疾患におけるプロテオーム解析を用いたバイオマーカー開発とその展望. 第 61 回日本腎臓学会学術総会 2018
  - 15) 大山 友香子, 高橋 和男, 山口 央輝, 松下 祥子, 中嶋 和紀, 林 宏樹, 小出 滋久, 稲熊 大城, 長谷川 みどり, 比企 能之, 湯澤 由紀夫. 健常人 IgA1 糖鎖構造人種間比較. 第 61 回日本腎臓学会学術総会 2018
  - 16) 伊藤 辰将, 辰川 英樹, 山口 央輝, 高橋 和男, 人見 清隆, 湯澤 由紀夫. 腎糸球体におけるタンパク質架橋接着酵素 (Transglutaminase 2) の基質候補探索と同一. 第 9 回分子腎

## 臓フォーラム 2018

- 17) 伊藤 辰将, 辰川 英樹, 山口 央輝, 高橋 和男, 人見 清隆, 湯澤 由紀夫. マウス腎系球体内で架橋される組織型トランスグルタミナーゼ基質候補タンパク質の網羅的解析. 第 43 回日本医用マスペクトル学会年会 2018
- 18) 松下 祥子, 高橋 和男, 大山 友香子, 山口 央輝, 中嶋 和紀, 湯澤 由紀夫. 腎系球体病変特異的なタンパク質の解析. 第 45 回 BMS コンファレンス 2018
- 19) 大山 友香子, 高橋 和男, 山口 央輝, 加藤 彰浩, 松下 祥子, 吉田 祐理, 水野 智博, 深町 幸宏, 横井 靖人, 比企 能之, 湯澤 由紀夫. 段階的脱グリコシル化法を用いた正常人 IgA1 O 結合型糖鎖構造の人種間比較. 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 年合同大会 2018
- 20) 大山 友香子, 高橋 和男, 松下 祥子, 山口 央輝, Matthew B. Renfrow, Jan Novak, 比企 能之, 湯澤 由紀夫. IgA1 O 結合型糖鎖構造の人種間比較. 第 41 回 I g A 腎症研究会学術集会 2018
- 21) 高橋 和男, 大山 友香子, 山口央輝, 松下祥子, 中嶋和紀, 比企能之, Matthew B. Renfrow, Jan Novak, 湯澤由紀夫. 糖鎖異常 IgA1 と IgA 腎症. 第 14 回「若手の力」フォーラム. 2017
- 22) 大山 友香子, 高橋 和男, 山口 央輝, 伊藤 辰将, 松下 祥子, 中嶋 和紀, 深町 幸宏, 横井 靖人, 比企 能之, 湯澤 由紀夫. IgA1 O 結合型糖鎖構造の人種間比較. 第 14 回「若手の力」フォーラム. 2017
- 23) 大山 友香子, 高橋 和男, 山口 央輝, 加藤 彰浩, 松下 祥子, 吉田 祐理, 水野 智博, 深町 幸宏, 横井 靖人, 比企 能之, 湯澤 由紀夫. 段階的脱グリコシル化法を用いた正常人 IgA1 O 結合型糖鎖構造の人種間比較. 第 15 回日本プロテオーム学会総会 2017
- 24) 大山 友香子, 高橋 和男, 山口 央輝, 松下 祥子, 加藤 彰浩, 吉田 祐理, 水野 智博, 深町 幸宏, 横井 靖人, 中嶋 和紀, 比企 能之, 湯澤 由紀夫. 正常人 IgA1 O 結合型糖鎖構造の人種間比較. 第 42 回日本医用マスペクトル学会年会 2017
- 25) 松下 祥子, 高橋 和男, 大山 友香子, 中嶋 和紀, 山口 央輝, 山本 幸一郎, 林 宏樹, 小出 滋久, 稲熊 大城, 長谷川 みどり, 湯澤 由紀夫. ネフローゼ症候群により発覚した老人性全身性アミロイドーシスの 1 例. 第 47 回日本腎臓学会西部学術大会. 2017
- 26) 加藤 彰浩, 水野 智博, 高橋 和男, 辰川 英樹, 人見 清隆, 湯澤 由紀夫. 補体刺激による組織トランスグルタミナーゼの細胞外シフトはメサングウム細胞増殖を促す. 第 40 回 I g A 腎症研究会学術集会 2017
- 27) 高橋 和男, 加藤 彰浩, 比企 能之, 吉田 祐理, 水野 智博, 山口 央輝, 林 宏樹, 小出 滋久, 長谷川 みどり, Renfrow Matthew B., Novak Jan, 湯澤 由紀夫. 質量分析による IgA1 ヒンジ部糖鎖異常部位の定量及び同定. 第 59 回日本腎臓学会学術総会 2016
- 28) 加藤 彰浩, 水野 智博, 高橋 和男, 尾之内 高慶, 吉田 祐理, 辰川 英樹, 林 宏樹, 小出 滋久, 長谷川 みどり, 水野 正司, 北村 博司, 人見 清隆, 湯澤 由紀夫. メサングウム増殖性腎炎における組織トランスグルタミナーゼの役割の解明. 第 59 回日本腎臓学会学術総会 2016
- 29) 高橋 和男, 加藤 彰浩, 比企 能之, Matthew B. Renfrow, Jan Novak, 湯澤由紀夫. 質量分析による IgA1 ヒンジ部糖鎖異常部位の定量及び同定法の作成. 第 39 回 I g A 腎症研究会学術集会 2016

## 〔図書〕(計 1 件)

- 1) Kazuo Takahashi, Ryohei Yamamoto, Yukio Yuzawa. Pathogenesis and Treatment in IgA Nephropathy. Springer. 2016

## 〔その他〕

藤田保健衛生大学医学部腎内科学 IgA 腎症研究グループ

<http://fujita-jin.blogat.jp/blog/2013/02/iga-f52d.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：湯澤 由紀夫

ローマ字氏名：Yukio Yuzawa

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：医学部腎臓内科学

職名：教授

研究者番号(8桁): 00191479

研究分担者氏名：水野 智博

ローマ字氏名：Tomohiro Mizuno

所属研究機関名：名城大学

部局名：薬学部薬効解析学

職名：助教

研究者番号(8桁): 40711669

(2)研究協力者

ローマ字氏名：Jan Novak

University of Alabama at Birmingham

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。