

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 8 月 1 日現在

機関番号：84416

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08399

研究課題名（和文）免疫グロブリン糖鎖異常の関節リウマチにおける役割

研究課題名（英文）The role of glycosylation of the serum IgG in rheumatoid arthritis

研究代表者

大島 至郎 (Shiro, Ohshima)

独立行政法人国立病院機構（大阪南医療センター臨床研究部）・その他部局等・部長

研究者番号：50362728

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）：関節リウマチ（RA）症例の血清中のIgGの糖鎖構造を解析した。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）と質量分析法（MS）を用いてガラクトース欠損IgG（G0）シアル酸欠損IgG（S0）の割合を解析し、変形性関節症症例と比較した。RA症例ではG0、S0の割合がコントロールに比較してそれぞれ著明に上昇していた。これらの異常は発症早期から認められ、寛解において低下することも明らかになった。IgG糖鎖異常はRAの診断や活動性、寛解のマーカーとして有用であると考えられる。さらに、RAにおけるIgG糖鎖異常（G0、S0の割合の上昇）が病因、病態を解明する上で重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RAは病因が明らかでないため、長期間の治療継続を余儀なくされることは、医学的問題のみならず、医療費においても大きな社会的問題となっている。分子標的治療の登場により、臨床的寛解が現実的な目標となり更にその先に薬剤を中止してなお維持するいわゆるbio free寛解も目指せるようになった。今回、免疫グロブリンの糖鎖異常の測定が免疫学的寛解のマーカーとして有用性が明らかになったことで、投与薬剤の中止や減量の指標となり、医療費の削減にも繋がる可能性があると考えられる。さらに糖鎖異常のメカニズムが明らかになれば、RAの診断、予後評価に繋がるマーカーの開発や根本的な治療につながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the sugar chain structure of IgG in RA using the novel technique, and examined its value as a marker for early diagnosis. IgG was extracted from the serum of RA patients, and the proportion of galactose-deficient IgG (G0) and sialic acid-deficient IgG (S0) was analyzed by a sugar chain analysis method combining high performance liquid chromatography (HPLC) and mass analysis (MS). Furthermore, the addition rate of sialic acid was examined using MS. The proportions of G0 and S0 were significantly higher in RA than in healthy subjects. Furthermore, MS revealed that the rate of S0 was high in RA. These abnormalities were observed from the early stage of onset, and it was also confirmed that they decreased in remission. Glycosylation abnormalities may be useful as markers for RA diagnosis, activity, and remission. Furthermore, it was suggested that these abnormalities might play an important role in the etiology and pathophysiology.

研究分野：免疫学

キーワード：関節リウマチ 免疫グロブリン 糖鎖異常

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) の病因は未だ明らかになっていない。RA における免疫グロブリンの糖鎖異常に関しては、1985 年 RA 症例の血清 IgG において、ガラクトースを欠損した糖鎖の割合が著しく増加するという報告がなされた (Nature 316, 452-457, 1985) がその病因病態への関与については明らかになっていない。ヒト IgG は、CH2 領域の 297 番目のアスパラギンに 2 本の糖鎖 (N 結合型糖鎖) を有する。我々は液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた糖鎖解析の手法 (Anal Biochem 219, (1), 21-5 1994) により RA の血清中の IgG の糖鎖構造を詳細に解析した。この糖鎖構造は基本的に 2 本鎖であり、ガラクトースの欠損以外にも、フコース、N-アセチルグルコサミンにも欠損がみられることがあり多様性が見られる。糖鎖は全身のほとんどの細胞に存在しており、タンパク質や脂質に結合して細胞の表面や細胞の中に多く存在する。それらの糖鎖は非常に多様な生命現象、特に細胞のコミュニケーションや識別に関連するプロセスで重要な役割を果たしており、ヌクレオチド (RNA/DNA) とペプチド (タンパク質) に続く「第三の生命鎖」と呼ばれている。IgG は Fc 部分に複合型糖鎖を有しており、その糖鎖構造の違い、特にフコースを欠損した IgG は Fc 受容体 (Fc R) に対する親和性が向上し抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性が著しく上昇することが知られている (Genes Cells. Nov;16(11):1071-80, 2011)。また、大海らは IgG 上のシアル酸を欠損したマウスを作成し、そのマウスに関節炎を誘発した結果、シアル酸を欠損したマウスはより重篤となることが判明した。つまり IgG 上の糖鎖異常 (シアル酸の減少) が関節炎症状の増悪に働くことが示唆され、さらにシアル酸を付加した IgG を関節炎モデルマウスに投与することにより症状が抑制されることを明らかにした (Nat Commun. 7, 11205, 2016)。このような炎症に対する糖鎖修飾の影響がどのようなメカニズムによって引き起こされるかについては十分に明らかになっていない。

“RA における免疫グロブリンの糖鎖異常が RA の発症にどのように関わり、その後慢性的な炎症の病態にどのようにして影響を与えるか”を最新の糖鎖合成技術・解析技術を用いて解析することによりこれらを明らかにすることは、糖鎖をターゲットとした炎症制御における新規創薬に繋がり、さらには自己抗体産生を誘導するメカニズムが解明されれば、関節リウマチの根本的な治療につながると考えられる。また、抗サイトカイン療法など分子標的治療の登場により、臨床的寛解の達成率と、更にその先に薬剤を中止してなお維持するいわゆる drug free 寛解の達成症例が増えている。薬剤の中止・減量が予測できる免疫学的寛解のマーカーとして免疫グロブリンの糖鎖異常が利用できれば、投与薬剤の減量の指標となり、ひいては医療費の削減にも繋がる可能性があると考えられる。RA の治療は病因が明らかでないため依然として対症療法が中心となり、長期間の継続を余儀なくされることは、患者さんの不利益のみならず、医療費においても大きな社会的問題となっている。本研究により糖鎖異常のメカニズムが明らかになれば、RA の診断、予後評価に繋がるマーカーの開発や根本的な治療につながるものと考えられ、多くの RA 患者さんにとって大きな福音となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、関節リウマチの病因・病態における免疫グロブリン糖鎖異常の関与を明らかにすることである。

3. 研究の方法

免疫グロブリン糖鎖異常の検討はこれまでガラクトース欠損 (G0) の解析が殆どであった。研究分担者の大海は近年マウス関節炎において炎症におけるシアル酸欠損 (S0) の重要性を明らかにしたが、このことは RA の病態への関与を考える上で G0 以上に S0 が病態に重要である可能性を示唆する。G0 に関しては、IgG の重要な生理機能である補体の活性化や Fc 受容体への結合能を損なうことが明らかになっているが、S0 に関しては未だ詳細な検討は行われていない。またこれまで技術的にも S0 の解析は HPLC では困難であったが、今回、質量分析法によって解析した。(G0S0 G+S0 G+S+を分けて解析する)

RA 症例の血清中の免疫グロブリンの糖鎖構造の異常と臨床データの関連を詳細に検討することによって、RA の早期診断や免疫学的寛解のマーカーとして有用であるかを検討した。

4. 研究成果

疾患マーカーとしての有用性

RA においては、健常人や変形性関節症の症例に比して、ガラクトースを欠損した糖鎖を有する IgG の割合が極めて高いという特徴を確認し報告した。(Glycoscience: Biology and Medicine 1297-1301 2015) 関節リウマチ (RA) 症例の血清中の IgG の糖鎖構造を解析した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と質量分析法 (MS) を用いてガラクトース欠損 IgG (G0) シアル酸欠損 IgG (S0) の割合を解析し、変形性関節症症例と比較した。未治療の早期関節炎、健常者計 52 検体の解析を終え、RA 症例では G0, S0 の割合がコントロールに比較してそれぞれ著明に上昇していた。S0 の早期診断マーカーとしての有用性を確認し、日本リウマチ学会で発表した。(2022 年日本リウマチ学会) IgG 糖鎖異常は RA の診断や活動性、寛解のマーカーとして有用

であると考えられる。さらに、RAにおけるIgG糖鎖異常（G0 S0の割合の上昇）が病因、病態を解明する上で重要であることが示唆された。さらに免疫学的寛解のマーカーとしての有用性の検討に関しては、分子標的治療薬の治療により寛解を達成した症例の検体のIgG糖鎖解析を行い、その後1年間の再燃の有無によって免疫学的寛解のマーカーとしての有用性を検討した。今般の新型コロナウイルス感染パンデミックの状況から協力施設からの検体の収集が困難であったが、61症例集まった。現在論文投稿中である。

病態への関与のメカニズムの研究：

コロナ禍において実験が遅れたため、実験を継続中である。
ガラクトース、シアル酸を欠損したB細胞に、ガラクトースおよびシアル酸を発現させるために、ガラクトース転移酵素とシアル酸転移酵素をトランスフェクションさせたB細胞の作製を行い、またシアル酸の付加率の上がった細胞株の作成に成功している。さらに骨髄腫の細胞株から産生されるIgGに人工的に高率にシアル酸付加されたIgGの精製し、シアル酸転移酵素を強発現させたB細胞と欠損させたB細胞由来のIgGを用いて滑膜細胞や免疫担当細胞の機能に及ぼす影響について検討する予定である。

病因への関与についての研究：

コロナ禍において実験が遅れたため、実験を継続中である。
ガラクトースおよびシアル酸を高発現した糖鎖を有するIgGを産生するB細胞株の作製を試みたが、細胞株の培養に失敗した。再度作成を試み、比較的シアル酸の発現比率の比較的高い糖鎖を有するIgGを産生するB細胞株を樹立した。今後この細胞株にHLA-DRをトランスフェクションしたときに、シアル酸の発現していないIgGを産生するB細胞株に比較してHLA-DRにIgGが結合する割合と、自己抗体の産生能を比較する予定である。また、骨髄腫の細胞株から産生されるIgGに人工的にシアル酸付加することによってより高い付加率のIgGの精製し、シアル酸転移酵素を強発現させたB細胞と欠損させたB細胞由来のIgGを用いてHLA-DRにIgGが結合する割合と、自己抗体の産生能を比較する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Liu Yafei, Ohshima Shiro, Arase Hisashi, et al.	4. 巻 184
2. 論文標題 An infectivity-enhancing site on the SARS-CoV-2 spike protein targeted by antibodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 3452 ~ 3466.e18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2021.05.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Saeki Yukihiro, Okita Yasutaka, Igashira-Oguro Eri, Udagawa Chikako, Murata Atsuko, Tanaka Takashi, Mukai Junji, Miyazawa Keiji, Hoshida Yoshihiro, Ohshima Shiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Modulation of TNFR 1-triggered two opposing signals for inflammation and apoptosis via RIPK 1 disruption by geldanamycin in rheumatoid arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 2395 ~ 2405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10067-021-05579-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okita Yasutaka, Yoshimura Maiko, Katada Yoshinori, Saeki Yukihiro, Ohshima Shiro	4. 巻 -
2. 論文標題 A mechanistic target of rapamycin inhibitor, everolimus safely ameliorated lupus nephritis in a patient complicated with tuberous sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology Case Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mrcr/rxac033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Isoda Kentaro, Tsuji Shigeyoshi, Harada Yoshinori, Yoshimura Maiko, Nakabayashi Akihiko, Sato Megumi, Nagano Hiromichi, Kim Dong-seop, Hashimoto Jun, Ohshima Shiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Potential of the prognostic nutritional index to determine the risk factor for severe infection in elderly patients with rheumatoid arthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mr/roac001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大島至郎
2. 発表標題 関節リウマチにおけるIgG糖鎖異常の解析
3. 学会等名 日本リウマチ学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 大島至郎
2. 発表標題 高齢関節リウマチに対するトシリズマブの長期治療例の検討
3. 学会等名 日本リウマチ学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	和田 芳直 (Wada Yoshinao) (00250340)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター (研究所)・その他部局等・母性内科・医師 (84408)	
研究分担者	大海 雄介 (Ohmi Yusuke) (10584758)	中部大学・生命健康科学部・助教 (33910)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------