

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16734

研究課題名(和文) 不死化B細胞産生IgA異常糖鎖解析による腎移植後IgA腎症再発の病態解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of recurrent IgA nephropathy after renal transplantation by analysis of abnormal O-glycans of immortalized B cell-produced IgA

研究代表者

中澤 成晃(Nakazawa, Shigeaki)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：80759530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：患者由来不死化B細胞株を用いた糖鎖解析により、IgA腎症患者では、健常者と比べて有意にPNA結合性が低いことがわかった。これは、すなわちCore1 0型糖鎖の多くにシアル酸が結合していることを意味している。Core1にシアル酸を結合する糖転移酵素はST3GAL1であるが、IgA腎症患者では、健常者と比べてST3GAL1の発現が有意に上昇していた。そこで、ST3GAL1をターゲットとして不死化B細胞株のST3GAL1をKOすると、細胞表面のPNA結合性は健常者と同等なレベルまで回復した。これまで重要と考えられてきたHPAレクチン結合性に関しては、IgA腎症患者と健常者で有意差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgA腎症にシアル酸が関連しているかについてはこれまでほとんど報告がなかった。本研究によりIgA腎症の病態においてST3GAL1が重要な役割を担っている可能性が示唆された。またこれまで難しかった不死化B細胞下部のシングルセルソーティングに成功し、現在疾患特異的なIgA糖鎖構造解析を進行中である。本研究によってST3GAL1をターゲットとした新規治療法の開発につながれば、難病疾患指定であるIgA腎症の治療法の開発に大きな光となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study, glycan analysis using an immortalized B cell line isolated from a patient revealed that PNA binding was significantly lower in patients with IgA nephropathy than in healthy controls. This means that sialic acid is bound to many of the Core1 O-glycans. The glycosyltransferase that binds sialic acid to Core1 is ST3GAL1, and the expression of ST3GAL1 was significantly elevated in IgA nephropathy patients compared to healthy controls. Therefore, knockout of ST3GAL1 in an immortalized B cell line targeting ST3GAL1 restored cell surface PNA binding to a level comparable to that of healthy individuals. On the other hand, there was no significant difference in HPA lectin binding between IgA nephropathy patients and healthy controls, which had been considered important.

研究分野：腎移植

キーワード：IgA腎症 腎移植 0型糖鎖 不死化B細胞下部

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は 20 年で約 40% の患者が末期腎不全に至る予後不良疾患で、医療費助成対象疾病(指定難病)に認定されている。移植腎にも再発することから全身疾患と考えられており、腎移植後に再発した場合も有効な治療法は確立されておらず、病態解明は喫緊の課題である。免疫グロブリンの一種である IgA には O 型糖鎖が最大で 6 箇所結合しており、IgA 腎症患者では一部の糖鎖が欠損した異常糖鎖が増加していることが報告されている。しかし、同一個体内でも十種類以上の O 型糖鎖の結合パターンが存在し、健常者でも糖鎖異常を認めることから、IgA 腎症特異的な異常糖鎖構造は未だ同定されていない。

2. 研究の目的

患者由来不死化 B 細胞株を樹立し、細胞株産生 IgA を様々な方法を用いて解析し、腎移植後 IgA 腎症再発の病因となる疾患特異的 IgA 糖鎖構造を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

EB ウイルス産生細胞株である B95-8 細胞培養すると培養上清に EB ウイルスが放出される。腎移植レシピエントおよびドナー患者の末梢血より末梢血単核細胞 (PBMC) を採取し、先の EB ウイルス含有培地上清を加えて、EB ウイルスを transfection させ、不死化 B 細胞株 (B リンパ芽球様細胞株:B-LCL) を樹立する。

樹立した不死化 B 細胞株は FACS により IgA 産生 B 細胞株と IgG 産生 B 細胞株に分離する。また IgA 産生 B 細胞株は single cell cloning を行い、single clone から産生される IgA1 が単一糖鎖構造であるかどうかを MALDI-TOF-MS と ELISA 法により検証する。

単一糖鎖構造の産生が確認されれば、抗 IgA 抗体カップリングカラムクロマトグラフィーにより単一糖鎖構造 IgA1 を精製分離する。精製分離された IgA1 を IgG 産生 B 細胞株に反応させて、抗 IgA 自己抗体を産生し、IgA-IgG 免疫複合体を産生するかを ELISA 法より検証する。gA-IgG 免疫複合体を産生が確認されれば、先と同様にカップリングカラムクロマトグラフィーにより自己免疫複合体を精製分離する。

IgA 腎症では異常糖鎖 IgA1 および免疫複合体がメサンギウム細胞に沈着し、メサンギウム細胞の増殖、基質増生を起こすと考えられている。さらにメサンギウム細胞内で補体経路が活性化し、様々なサイトカインを放出することで、IgA 腎症に進展する。そこで、保存血清より精製分離した単一糖鎖構造 IgA1 および IgA-IgG 免疫複合体をヒトメサンギウム細胞の培養上清内に添加し、メサンギウム細胞の変化を観察する。

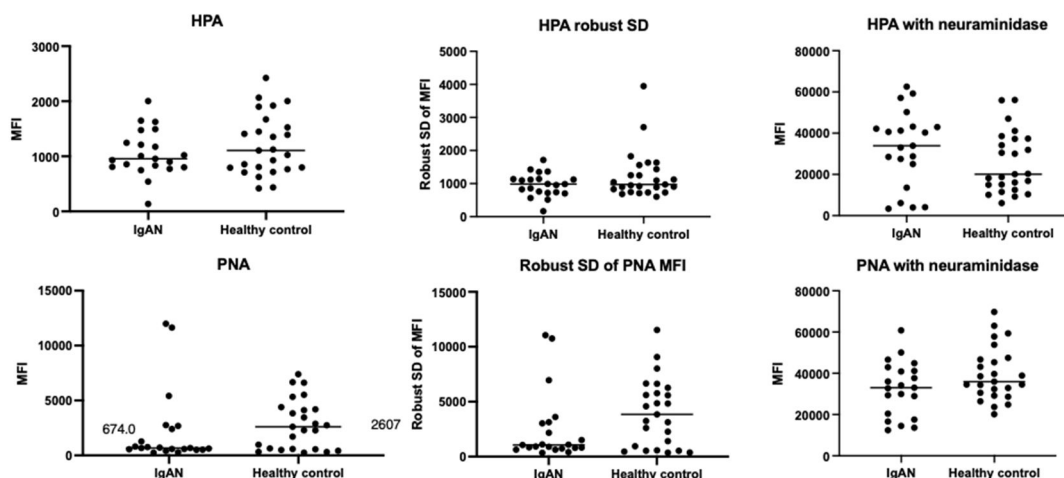
メサンギウム細胞への IgA および IgA-IgG 免疫複合体の沈着はメサンギウム細胞の IgA、IgG、C3 の蛍光抗体染色法で評価する。メサンギウム細胞増殖は、BrdU 発色キットおよび MTS assay の 2 種類で評価する。メサンギウム基質増生は培養上清中に産生されたコラーゲン量を特異的に結合する Direct Red 80 を用いた Collagen assay および Collagen Type 1 polyclonal antibody での免疫組織化学染色により評価する。メサンギウム細胞内での補体経路活性化はメサンギウム細胞より mRNA を抽出し RT-PCR 法により各補体成分の mRNA の発現レベルを解析する。培養上清中の MCP-1、IL-6 などの各種サイトカイン産生量は ELISA 法により評価する。

4. 研究成果

患者由来不死化 B 細胞株の樹立は予定どおり進行し、必要数 (200sample) を確保できた。しかし、その後の IgA 産生 B 細胞株から single cell cloning を行い、single clone を樹立するのに 2 年を要した。そのため、現在樹立した Single clone から IgA を抽出する作業中である。

また、この実験途中において、樹立した IgA 産生 B 細胞株の細胞表面上の糖鎖プロファイルをおこなった。PNA レクチン、HPA レクチンを用いて細胞表面上の結合能力を検定した。

患者由来不死化 B 細胞株を用いた糖鎖解析により、IgA 腎症患者では、健常者と比べて有意に PNA 結合性が低いことがわかった（図 1）。これまで重要と考えられてきた HPA レクチン結合性に関しては、IgA 腎症患者と健常者で有意差を認めなかった。



（図 1）IgA 不死化 B 細胞株表面上の HPA、PNA レクチン結合性

これは、すなわち Core 10 型糖鎖の多くにシアル酸が結合していることを意味している。Core 1 にシアル酸を結合する糖転移酵素は ST3GAL1 であるが、IgA 腎症患者では、健常者と比べて ST3GAL1 の発現が有意に上昇していた。そこで、ST3GAL1 をターゲットとして不死化 B 細胞株の ST3GAL1 を KO すると、細胞表面の PNA 結合性は健常者と同等なレベルまで回復した（図 2）。

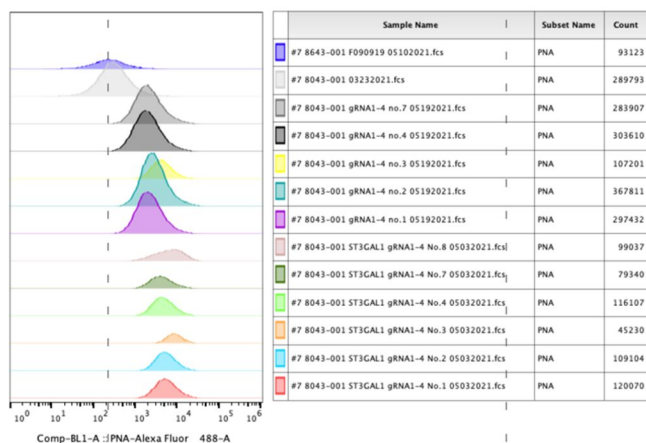


図 2 ST 3 GAL 1 KO 細胞における PNA 結合性の変化

IgA 腎症にシアル酸が関連しているのかについてはこれまでほとんど報告がなかった。本研究により IgA 腎症の病態において ST3GAL1 が重要な役割を担っている可能性が示唆された。またこれまで難しかった不死化 B 細胞下部のシングルセルソーティングに成功し、現在疾患特異的な IgA 糖鎖構造解析を進行中である。本研究によって ST3GAL1 をターゲットとした新規治療法の開発につながれば、難病疾患指定である IgA 腎症の治療法の開発に大きな光となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakazawa S, Imamura R, Kawamura M, Kato T, Abe T, Iwatani H, Yamanaka K, Uemura M, Kishikawa H, Nishimura K, Tajiri M, Wada Y, Nonomura N.	4. 巻 51
2. 論文標題 Evaluation of IgA1 O-glycosylation in Henoch-Schonlein Purpura Nephritis Using Mass Spectrometry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transplant Proc.	6. 最初と最後の頁 1481-1487
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2019.01.122.	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 Nakazawa S, Imamura R, Kawamura M, Kato T, Abe T, Namba T, Iwatani H, Yamanaka K, Uemura M, Kishikawa H, Nishimura K, Oka K, Tajiri M, Wada Y, Nonomura N.	4. 巻 508
2. 論文標題 Difference in IgA1 O-glycosylation between IgA deposition donors and IgA nephropathy recipients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1108-1112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.12.014.	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------