

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590951

研究課題名（和文）

扁桃における糖鎖転移酵素発現異常とIgA糖鎖不全の解析によるIgA腎症の成因解明

研究課題名（英文）Role of tonsillar lymphocyte glyco genes in the pathogenesis of IgA nephropathy

研究代表者

杉山 斉 (SUGIYAMA HITOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60325090

研究成果の概要：

IgA腎症の成因には粘膜免疫、特に扁桃が注目され、IgA分子O型糖鎖不全が証明されている。この糖鎖不全IgAの産生機序、原因解明のためIgA腎症扁桃B細胞における糖転移酵素遺伝子（glycogene）発現を検討したところ、IgA腎症扁桃CD19陽性B細胞では β 3GalT、pp-GalNAc-T2、Cosmc遺伝子発現低下を認めた。なかでも β 3GalT遺伝子発現は腎障害と有意な相関関係が認められ、IgA腎症の成因には扁桃B細胞における糖転移酵素遺伝子発現異常が存在することが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学

1. 研究開始当初の背景

IgA腎症は慢性糸球体腎炎を呈する疾患のうち最多の約40%を占める腎炎である。1968年フランスの病理学者ベルジェにより報告され、当初は血尿を呈するのみで腎機能予後は良好である疾患とされた。しかしながら本疾患の長期経過が検討される

につれ、発症後20年で約40%が末期腎不全に陥る予後不良な疾患であることが明らかとなった。さらに最近提唱された慢性腎臓病においては、その腎機能低下の程度に応じて心血管疾患の発症率が飛躍的に増加することから、本疾患の成因を明らかにし有効な治療法を開発してゆくことは患者

生命予後の改善につながる最重要課題であると認識される。

I g A腎症患者の日常診療においては、上気道感染後に肉眼的血尿が出現することはしばしば経験される。さらに最近当科で施行したI g A腎症に対する扁桃摘出術・ステロイドパルス併用療法の臨床的検討においては、尿所見（尿潜血、尿蛋白）の著明な改善や腎機能保持効果が認められる。このことは、I g Aの主要産生臓器の一つであり粘膜免疫を司る扁桃組織が、I g A腎症の成因として重要性を有し、扁桃組織の解析がI g A腎症の成因解明につながる可能性を強く示唆する。

I g A分子はimmune glycoproteinと称されるほど糖鎖構造による多彩な修飾を受けている（Yoo, Clin Immunol 116:3;2005）。比企、Novakらの先駆的な一連の研究により末梢血に存在するI g A分子は質的異常、すなわち免疫グロブリン重鎖をつなぐヒンジ部におけるO型糖鎖（ガラクトースおよびシアル酸）の欠損を有することが明らかとなった。ヒンジ部は20個のアミノ酸から構成され、このうち9個のSer/Thr残基は5種類の不全型糖鎖構造を有する。

このO型糖鎖不全を有するI g A分子は互いに凝集し、他の抗原や細胞外基質成分と結合し易くなり、その結果糸球体メサンギウムへ沈着してメサンギウム増殖性腎炎を惹起する可能性が示唆されている。しかしながら、なぜI g A分子の糖鎖不全（ガラクトース欠損、シアル酸欠損、またはその両者）が生ずるのか、言い換えるとなぜ異常糖鎖が合成されるのかその機序に関しては全く不明である。すなわち扁桃組織におけるI g A分子ヒンジ部の異常糖鎖合成のメカニズムを解明することこそが、I g

A腎症の成因解明の一つとして現時点でも重要であると考えられる。

一方で、現在ポストゲノム、プロテオームの時代を迎え、翻訳され成熟した蛋白質は更に糖鎖による表面構造の修飾を受け、糖鎖修飾の差違により同じ蛋白質でも異なった機能を発揮することが明らかとなった。そして、近年の糖鎖生物学の進歩により免疫グロブリンの糖鎖構造を修飾する多数の糖鎖転移酵素群がクローニングされ、糖鎖の生物学的多様性を制御する一因となっていることが報告されている。これら酵素群はガラクトース転移酵素（galactosyltransferase）やシアル酸転移酵素（sialyltransferase）から構成され、分子シャペロンを有し複雑な修飾を受けることから糖鎖合成が巧妙な発現調節を受けることが推察される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)扁桃より分離したI g A産生CD19陽性Bリンパ球における糖鎖転移酵素群遺伝子発現の解析、(2)扁桃における糖鎖不全型I g Aを検出するシステムの開発（I g A分子ヒンジ部の糖鎖不全を検出するレクチン結合アッセイ）、(3)最新の質量分析装置であるHPLC-Chip/MS、FT-ICR MS/MSを用いた扁桃由来I g A糖鎖構造の解析、を行うことにより扁桃において糖鎖不全型I g A分子が産生されるメカニズムの一端を明らかにし、進行性糸球体腎炎であるI g A腎症の成因解明を扁桃からのアプローチにより行う。

3. 研究の方法

(1) 扁桃Bリンパ球における糖鎖転移酵素群の遺伝子発現異常の解析

① 扁桃からのI g A陽性Bリンパ球分離

扁桃摘出術時に得られた扁桃組織を細切、ガラスホモジナイザーでホモジナイズしリンパ球分離培地LSMによりバフィーコートで分離した。細胞分離装置を使用しCD19陽性磁気ビーズにより、さらにカラムを用いてIgA表出CD19陽性Bリンパ球の分離を行った。疾患群としてIgA腎症患者20例、コントロールとして尿異常のない慢性扁桃炎10例および睡眠時無呼吸症候群10例より摘出した扁桃組織を用いた。(大学院生:井上達之と協力)

② 糖鎖転移酵素群の遺伝子発現の検討

分離したIgA陽性Bリンパ球よりmRNAを抽出し、ライトサイクラーを用いてreal-time PCR法を行うことにより糖鎖転移酵素群の遺伝子発現を検出した。

IgA分子ヒンジ部のO型糖鎖転移に重要な酵素として α 1,3 Galactosyltransferase (α 3GalT)、 α 2,3Gal-sialyltransferase (ST3Gal)、 α 2,6GalNAc-sialyltransferase I/II/III (ST6GalNAc I/II/III)、N-acetylgalactosaminyl-transferase (pp-GalNAc-T) に特異的なプライマーを用いて遺伝子発現レベルを検討した。疾患群としてIgA腎症患者、コントロールとして尿異常のない慢性扁桃炎および睡眠時無呼吸症候群患者より摘出した扁桃組織を用いた。

③ 糖鎖転移酵素遺伝子発現と臨床指標・腎生検病理指標との関連

②において検出したIgA腎症患者扁桃のIgA陽性Bリンパ球におけるO型糖鎖転移酵素遺伝子発現レベルと、尿異常(蛋白尿・血尿)・腎機能(Cr・eGFR)・予後など臨床指標や、糸球体・尿細管間質病変、活動性・慢性化病変など腎生検病理組織指標との相関を検討した。

(2) 扁桃由来IgA分子における糖鎖不全

の定量解析

① 糖鎖レクチン結合アッセイ法の確立

扁桃組織からの抽出液を抗IgA抗体固相化プレートと反応させた後、HRPまたはビオチン標識した種々のレクチンとの結合性をマイクロプレートリーダーを用いて測定し、扁桃由来IgA分子の糖鎖不全レベルを定量解析した。コントロールとして慢性扁桃炎群ならびに睡眠時無呼吸症候群扁桃IgAの糖鎖不全レベルと比較検討を行った。レクチン種として安定な植物由来レクチンであり、O型糖鎖末端のシアル酸、ガラクトース、GalNAcを認識可能なVVL (Vicia Villosa), PNA (Arachis hypogaea), MAA (Maackia amurensis), Jacalineを用いた。

② IgA糖鎖不全レベルと糖鎖転移酵素遺伝子発現、臨床・病理指標との関連

IgA腎症患者において、(2)-①において検出したレクチン結合性による扁桃IgA分子糖鎖不全の程度と、(1)-②により検出した扁桃糖鎖転移酵素遺伝子発現レベルとの相関関係の検討を行った。さらに糖鎖不全の程度と尿異常(蛋白尿・血尿)・腎機能(Cr・eGFR)・予後など臨床指標や、糸球体・尿細管間質病変、活動性・慢性化病変など腎生検病理組織指標との相関を検討した。

(3) HPLC-Chip/MS、FT-ICR MS/MSを用いた扁桃IgA1分子ヒンジ部糖鎖構造の解析

① 扁桃抽出液からのIgA分子ヒンジ部の分離と精製

扁桃組織抽出液を硫酸分画で分離した後、抗IgAセファロースカラムで抽出を行い、ピリジルエチル化に引き続いてトリプシン処理を行いIgA断片を得た。さらにJacalineカラムによりIgA分子ヒンジ部を分離し、HPLCにより精製後、凍結乾燥保存した。

② マススペクトロメトリー (質量分析) による糖鎖構造の解析

(3)-①で精製したサンプルをHPLC-Chip/MS装置 (Agilent technologies社製) に供し、IgA腎症患者扁桃由来のIgA分子ヒンジ部糖鎖構造の解析を行った。慢性扁桃炎群ならびに睡眠時無呼吸症候群扁桃抽出液中より同様の分離・精製処理を行い、得られたIgA分子糖鎖構造を比較検討した。
MS : mass spectrometry

FT-ICR MS/MS装置 (Bruker社製) を用いてIgA腎症患者扁桃由来のIgA分子ヒンジ部糖鎖構造の解析を行った。慢性扁桃炎群ならびに睡眠時無呼吸症候群扁桃抽出液中のIgA分子糖鎖構造と比較検討した。
FT-ICR : Fourier transform ion cyclotron resonance

4. 研究成果

IgA腎症扁桃組織よりCD19陽性B細胞を特異的に分離することが可能であった。IgA腎症扁桃CD19陽性B細胞では睡眠時無呼吸症候群、慢性扁桃炎群に対し有意な β 3GalT、pp-GalNAc-T2遺伝子発現の低下、また睡眠時無呼吸症候群に対し有意なCosmc遺伝子発現低下を認めた。なかでも β 3GalT遺伝子発現は推算GFR (eGFR)、蛋白尿の程度、糸球体または間質障害スコアと有意な相関関係を認めた。さらに β 3GalT蛋白は免疫染色にてIgA産生細胞に一致して発現し、Western blotによる定量解析で睡眠時無呼吸症候群、慢性扁桃炎群に比し有意な発現低下が認められた。

IgA腎症では扁桃組織B細胞における糖転移酵素遺伝子発現異常が存在する。特に扁桃B細胞における β 3GalT遺伝子発現低下は、IgA腎症の重症度と関連する。これらの知見より、粘膜免疫を司る扁桃組織における糖転移酵素遺伝子発現異常が、IgA腎症の成因

に重要な役割を果たしていることが示唆された。

尚、扁桃における糖鎖不全型IgAを検出するシステム、すなわちIgA分子ヒンジ部の糖鎖不全を検出するレクチン結合アッセイ (VVL, PNA, MAA, Jacaline) について検討を行ったが、各レクチン毎に再現性のある結果が得られていない。質量分析についてIgA腎症患者、慢性扁桃炎群ならびに睡眠時無呼吸症候群扁桃由来のIgA分子ヒンジ部糖鎖構造の解析を行ったが再現性のある結果が得られず、発表は行っていない。

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4件)

① Sugiyama H, Maruyama M, Morinaga H, Inoue T, Takiue KI, Kikumoto Y, Kinomura M, Sada KE, Akagi S, Kitamura S, Maeshima Y, Makino H.: Unique microstructures and podocytic infolding in glomerular basement membrane associated with collagen diseases: a report of three cases. Clin. Exp. Nephrol. 12:450-454, 2008 査読有

② Kinomura M, Sugiyama H, Saito T, Matsunaga A, Sada K, Kanzaki M, Takazawa Y, Maeshima Y, Yanai H, Makino H: A novel variant apolipoprotein E Okayama in a patient with lipoprotein glomerulopathy. Nephrol Dial Transplant., 23(2):751-756, 2008 査読有

③ Inoue T., Sugiyama H., Kikumoto Y., Fukuoka N., Maeshima Y., Hattori H., Fukushima K., Nishizaki K., Hiki Y., Makino

H.: Downregulation of the beta1,3-galactosyltransferase gene in tonsillar B lymphocytes and aberrant lectin bindings to tonsillar IgA as a pathogenesis of IgA nephropathy. Contrib Nephrol. 157:120-124, 2007 査読有

④Maruyama M., Sugiyama H., Sada K., Kobayashi M., Maeshima Y., Yamasaki Y., Makino H.: Desmin as a marker of proteinuria in early stages of membranous nephropathy in elderly patients. Clin. Nephrol. 68(2):73-80, 2007 査読有

[学会発表] (計3件)

① Inoue T, Sugiyama H., et al.: Differential expression of glycogenes in tonsillar B cells in association with proteinuria and renal function in IgA nephropathy. The 40th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 1-4th, 2007, San Francisco, USA

② 井上達之, 杉山 斉, 他: IgA腎症患者の扁桃における糖転移酵素遺伝子発現の解析. 第50回日本腎臓学会学術総会. 2007年5月27日 浜松

③井上達之, 杉山 斉, 他: IgA腎症に対する扁桃摘出術・ステロイドパルス療法の尿所見寛解への影響を及ぼす因子の検討. 第50回日本腎臓学会学術総会. 2007年5月27日 浜松

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 斉 (SUGIYAMA HITOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 60325090

(2) 研究協力者

井上 達之 (INOUE TATSUYUKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生