

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 2 日現在

機関番号：13101
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008 ～ 2011
 課題番号：20390234
 研究課題名（和文） 糖鎖不全 IgA に対する新規受容体の同定と解析による IgA 腎症発症機序の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of the pathogenic mechanism of IgA nephropathy through identification and functional analysis of the receptor for the insufficient glycosylated IgA molecules
 研究代表者 成田 一衛（NARITA ICHIEI）
 新潟大学・医歯学系・教授
 研究者番号：20272817

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、IgA 腎症の病因に直結していると考えられているヒンジ部糖鎖不全 IgA1 分子が、全身循環血中に存在するにもかかわらず、糸球体メサンギウム細胞に特異的に沈着する機序を明らかにすることである。糖鎖不全 IgA1 プローブは、精製 IgA を Neuraminidase 処理による脱シアル化と β -galactosidase 処理による脱ガラクトシル化を行い、蛍光標識ラベルしてプローブとした。この蛍光標識プローブを培養ヒトメサンギウム細胞に結合させる実験系を確立し、メサンギウム細胞表面に発現する IgA 1 受容体（親和性）を DNA アレイなどを用いて同定した。結果、糖鎖不全 IgA1 が collagen IV と複合体を形成し、 $\alpha 2/\beta 1$ インテグリンを介してメサンギウム細胞に結合し、その結果細胞増殖刺激を惹起していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：IgA nephropathy is characterized by mesangial deposition of IgA1 and galactose-deficient IgA1 is assumed to play a pathogenic role. However, the identity of the receptor for IgA1 is still controversial. Hence, the aim of this study was to explore the receptor for galactose-deficient IgA1. Human monoclonal IgA1 was treated with exoglycosidase and FITC-conjugated galactose-deficient IgA1 was used as a probe to detect the receptor in cultured human mesangial cells. According to comprehensive gene expression analysis, we revealed that galactose-deficient IgA1-collagen complex formation would be proposed as one of the candidate mechanisms of IgA1 deposition and proliferative signal transduction via integrin $\alpha 2/\beta 1$ heterodimer in human mesangial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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：IgA 腎症、糖鎖不全、慢性糸球体腎炎、メサンギウム細胞、受容体、インテグリン、コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

糸球体メサンギウム領域への免疫グロブリンA(IgA)沈着を特徴とするIgA腎症は、最も頻度の高い原発性糸球体腎炎であり、末期慢性腎不全の主要な原疾患でもある。本症の原因は未だ不明であり、現在のところ特異的な予防法・治療法はない。近年、血清IgA1分子のヒンジ部糖鎖異常が本症の発症・進展に関わっている可能性が指摘されている。すなわち、糖鎖不全IgA分子は自己凝集、代謝遅延、メサンギウム細胞・基質への高親和性などの性質があることが知られており、IgA腎症発症の根本的な原因に直接関連していると考えられている。

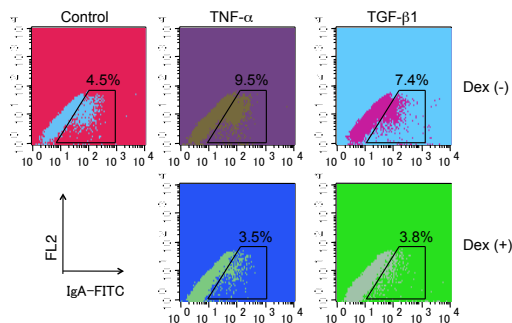
一方、この糖鎖不全IgA1は少なくとも一部は粘膜で産生され、血行性に糸球体に達する。つまり、全身の臓器が糖鎖不全IgA分子に曝されていることになるが、では何故糸球体メサンギウムに特異的に沈着するのか。現在のところ、この点については全く不明である。

2. 研究の目的

IgAN腎症において、糖鎖不全IgA1分子が糸球体メサンギウム細胞に特異的に結合する機序を明らかにする。

3. 研究の方法

糖鎖不全IgA1をプローブとして、培養ヒトメサンギウム細胞に結合する条件を検索した結果、TGF- β およびTNF- α などの刺激により結合活性が上昇することが示された。(下図)



糖鎖不全IgAのメサンギウム細胞への結合がTNF- α 、TGF- β 刺激で亢進し、デキサメタゾン前処理により抑制される。

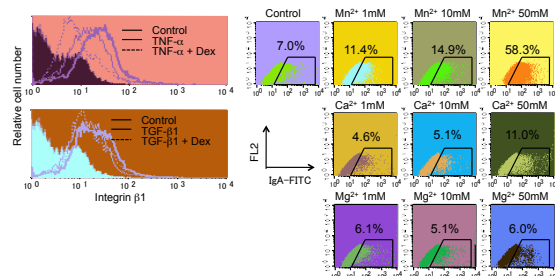
この培養条件において発現が上昇する遺伝子を、DNAマイクロアレイを用いて網羅的に検索した。

さらにこの遺伝子の発現上昇が、IgAN腎症においてどのようにIgA I沈着に働いているのかを解析し、併行してヒトIgA腎症腎生検病理標本上で、これらの分子の発現や沈着の状況を解析した。

4. 研究成果

培養メサンギウム細胞の網羅的遺伝子発現解析により、糖鎖不全IgA1の受容体候補分子として、インテグリン β 1鎖が同定された。この分子がどのようにIgA1沈着に関与するのかについて、下記の結果が得られた。

①インテグリンを活性化するマンガンイオン(Mn^{2+})は、この結合を促進すること。(下図) 一般にインテグリンの活性化において、マンガンイオンが重要であることが知られており、この事実はインテグリンが糖鎖不全IgA1の受容体であることを支持する結果であった。またこの現象はカルシウムなどの他の2価の陽イオンでは見られなかった。



左図: インテグリン β 1発現がTNF- α 、TGF- β 1で亢進する。

右図: Mn^{2+} 添加でIgA結合が亢進するが、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} では亢進しない。

②ヒトIgA腎症の腎生検標本の免疫組織学的解析により、 α 2インテグリン鎖と β 1鎖とがヘテロダイマーを形成して糸球体に沈着することが示された。これは、 α 2インテグリン特異的RNAiを作用させるとIgA1分子のメサンギウム細胞への結合が著しく阻害されることから、証明された。

③糖鎖不全IgAとIV型コラーゲンが結合すると、この結合活性がさらに増強することが確認された。

以上から、糖鎖不全 IgA1 が collagen IV と複合体を形成し、 $\alpha 2/\beta 1$ インテグリンを介してメサンギウム細胞に結合し、その結果細胞増殖刺激を惹起していることが IgA 腎症の原因であると考えられた。従来、全身を循環する糖鎖不全 IgA1 が糸球体メサンギウム細胞に沈着する機序は不明であったが、この研究により、ホスト側のメサンギウムにおけるインテグリン発現が上昇することが、その因子の一つであることが初めて示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- (1) Ogasawara S, Hosojima M, Kaseda R, Kabasawa H, Yamamoto-Kabasawa K, Kurosawa H, Sato H, Iino N, Takeda T, Suzuki Y, Narita I, Yamagata K, Tomino Y, Gejyo F, Hirayama Y, Sekine S, Saito A. Significance of Urinary Full-Length and Ectodomain Forms of Megalin in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2012. in press (査読あり)
- (2) Iguchi A, Wada Y, Kobayashi D, Sato H, Oyama T, Nakatsue T, Murakami S, Kuroda T, Nakano M, Narita I. A case of MPO- and PR3-ANCA-positive hypertrophic cranial pachymeningitis with elevated serum IgG4. *Mod Rheumatol* 2012. in press (査読あり)
- (3) Kaneko Y, Otsuka T, Tsuchida Y, Gejyo F, Narita I. Integrin $\alpha 1/\beta 1$ and $\alpha 2/\beta 1$ as a receptor for IgA1 in human glomerular mesangial cells in IgA nephropathy. *Int Immunol* 2012. in press (査読あり)
- (4) Yoshita K, Kawano M, Mizushima I, Hara S, Ito Y, Imai N, Ueno M, Nishi S, Nomura H, Narita I, Saeki T. Light-microscopic characteristics of IgG4-related tubulointerstitial nephritis: distinction from non-IgG4-related tubulointerstitial nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2012. in press (査読あり)
- (5) Wang X, Sakatsume M, Sakamaki Y, Inomata S, Yamamoto T, Narita I. Quantitative Histological Analysis of SM22alpha (Transgelin) in an Adriamycin-Induced Focal Segmental Glomerulosclerosis Model. *Nephron Exp Nephrol* 2011; 120: e1-e11. (査読あり)
- (6) Nozawa Y, Sato A, Piao H, Morioka T, Narita I, Oite T. The effect of renal administration of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor or stable prostaglandin I(2) analog on the progression of sclerotic glomerulonephritis in rats. *Clin Exp Nephrol* 2011. in press (査読あり)
- (7) Wakasugi M, Narita I, Iseki K, Moriyama T, Yamagata K, Tsuruya K, Yoshida H, Fujimoto S, Asahi K, Kurahashi I, Ohashi Y, Watanabe T. Weight gain after 20 years of age is associated with prevalence of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2011. in press (査読あり)
- (8) Takeyama A, Sato H, Soma-Nagae T, Kabasawa H, Suzuki A, Yamamoto-Kabasawa K, Hosojima M, Kaneko R, Higuchi F, Kaseda R, Ogasawara S, Narita I, Saito A. Megalin is downregulated via LPS-TNF-alpha-ERK1/2 signaling pathway in proximal tubule cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 407: 108-112 (査読あり)
- (9) Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Hasegawa H, Yamada T, Imai N, Narita I, Kawachi H, Polkinghorne KR, Nikolic-Paterson DJ, Uchiyama M. Identification of alternatively activated macrophages in new-onset paediatric and adult immunoglobulin A nephropathy: potential role in mesangial matrix expansion. *Histopathology* 2011; 58: 198-210. (査読あり)
- (10) Sakamaki Y, Sakatsume M, Wang X, Inomata S, Yamamoto T, Gejyo F, Narita I. Injured kidney cells express SM22alpha (transgelin): Unique features distinct from alpha-smooth muscle actin (alphaSMA).

Nephrology (Carlton) 2011; 16: 211-218.
(査読あり)

- (11) Koda R, Zhao L, Yaoita E, Yoshida Y, Tsukita S, Tamura A, Nameta M, Zhang Y, Fujinaka H, Magdeldin S, Xu B, Narita I, Yamamoto T. Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. *Cell Tissue Res* 2011; 343: 637-648. (査読あり)
- (12) Miura T, Goto S, Iguchi S, Shimada H, Ueno M, Nishi S, Narita I. Membranoproliferative pattern of glomerular injury associated with complement component 9 deficiency due to Arg95Stop mutation. *Clin Exp Nephrol* 2011; 15: 86-91. (査読あり)
- (13) Inomata S, Sakatsume M, Sakamaki Y, Wang X, Goto S, Yamamoto T, Gejyo F, Narita I. Expression of SM22alpha (transgelin) in glomerular and interstitial renal injury. *Nephron Exp Nephrol* 2011; 117: e104-113. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

- (1) Tsuchida Y, Kaneko Y, Saito A, Yamamoto S, Narita I. Prolactin receptor was up-regulated in the proximal tubules of the kidney in the cardio-renal syndrome model mice. American Society of Nephrology Kidney Week 2011, 2011.11.8-13, Philadelphia, USA
- (2) Goto S, Tsukaguchi H, Wada M, Narita I. Genome-wide linkage scan of Japanese families with IgA nephropathy, American Society of Nephrology Kidney Week 2011, 2011.11.8-13, Philadelphia, USA
- (3) Narita I. Symposium/
Membranoproliferative glomerulonephritis. Advancement in Treatment of Nephrotic Syndrome. 2011.6.14, Yokohama
- (4) Kaneko Y, Tsuchida Y, Narita I. Integrin $\alpha 2/\beta 1$ as a novel galactose-deficient IgA1 receptor on Human mesangial cells. World Congress of Nephrology 2011, 2011.4.10,

Vancouver, Canada

[図書] (計 1 件)

(1) 成田一衛 他編. Annual Review腎臓
2012、総ページ数 231、中外医学社、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田 一衛 (NARITA ICHIEI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：20272817

(2) 研究分担者

坂爪 実 (SAKATSUME MINORU)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：70334662

金子 佳賢 (KANEKO YOSHIKATSU)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：80444157