

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17292

研究課題名(和文)糖鎖異常IgA1による補体活性化を介した糸球体障害の機序の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of glomerular injuries and complement activity by galactose-deficient IgA1-containing immune complexes.

研究代表者

牧田 侑子 (Makita, Yuko)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：20838487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：IgA腎症の病態解明のため、糖鎖異常IgA1(Gd-IgA1)およびGd-IgA1免疫複合体(IC)による腎組織障害のメカニズムを検討した。本研究により、Gd-IgA1 ICは糸球体内皮細胞に高い親和性を示し、その結果、糸球体内皮細胞が障害され、糸球体濾過バリア機能不全を引き起こし、メサンギウム領域へのIgA沈着および補体活性化が誘導されることが示唆された。さらに、Gd-IgA1 ICは、糸球体内皮細胞における接着因子や炎症性サイトカインの産生を促進した。Gd-IgA1 ICによる糸球体内皮細胞障害がIgA腎症の病態に関与す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

IgA腎症は世界で最も頻度が高い原発性糸球体腎炎であるが、IgA腎症の原因となる免疫系の異常が特定されておらず、有効な治療法が確立されていない予後不良な疾患である。その病態には糖鎖異常IgA1(Gd-IgA1)とその免疫複合体(IC)が深く関与することが示唆されている。本研究では、Gd-IgA1 ICによって糸球体内皮細胞障害、補体活性化が誘導され、腎炎が増悪することが示唆された。IgA腎症の病態が解明されることにより、新たなIgA腎症治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathogenesis of IgA nephropathy, we investigated the mechanism of renal tissue damage caused by galactose-deficient IgA1 (Gd-IgA1) and Gd-IgA1 immune complex (IC). The results suggest that Gd-IgA1 IC shows high affinity to glomerular endothelial cells and causes glomerular endothelial cell damage, resulting in glomerular filtration barrier dysfunction and inducing IgA deposition and complement activation in the mesangial region. Furthermore, Gd-IgA1 IC promoted the production of adhesion factors and inflammatory cytokines in glomerular endothelial cells, suggesting that Gd-IgA1 IC-induced glomerular endothelial cell damage is involved in the pathogenesis of IgA nephropathy.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：IgA腎症 糖鎖異常IgA1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IgA腎症 (IgAN) は、原発性糸球体腎炎患者の約 25-40%を占め、本邦で最も頻度の高い糸球体腎炎である。IgAN の病理所見は、メサンギウム細胞増多と細胞外基質の増生を認め、さらに同領域への IgA、特に IgA1 を主体とした免疫複合体の沈着を特徴とし、補体活性 (補体 C3 沈着) を伴うことで定義付けられる。IgA1 のヒンジ部には O 結合型糖鎖があり、IgAN 患者では、この O 結合型糖鎖修飾に異常がある、いわゆる糖鎖異常 IgA1 (Gd-IgA1) に富んでいる。これまでの研究で、IgAN 患者では、Gd-IgA1 および Gd-IgA1 を含む免疫複合体 (IC) および Gd-IgA1 特異的 IgG 抗体の血清濃度が上昇していることが示され、IgAN 患者では Gd-IgA1 が特異的に腎糸球体に沈着することが明らかとなった。しかし、IgA1 や Gd-IgA1 IC がメサンギウムに沈着するメカニズムは未だ不明である。

以前の研究で、IgAN 自然発症モデルマウスから分離した糖鎖異常 IgA および IgA-IgG IC を nude mouse に注入すると、糸球体糸球壁に IgA が留まり、メサンギウム領域に沈着することが示され、腎炎を惹起する IgA 含有 IC がメサンギウム領域に沈着するには、糸球体内皮細胞と相互作用している可能性が示唆されている。

糸球体内皮細胞は、血流に出入りする小溶質、タンパク質、炎症細胞の透過性を制御するなど、血管機能を制御している。血管内皮細胞の内腔表面は、多糖類や糖タンパクからなるグライコカリックスで覆われ、タンパク質の自由な通過を防ぐバリアとして機能し、炎症細胞が内皮細胞に付着するのを阻害する。グライコカリックスは、血管透過性を調整する因子のひとつであり、アルブミン尿を呈する糸球体腎炎において、グライコカリックスの消失による血管透過性亢進が病態に関与することが示唆されている。グライコカリックスの消失を評価することで、糸球体内皮細胞障害による透過性亢進、メサンギウム領域への IgA 沈着に関する知見が得られる可能性がある。

2. 研究の目的

Gd-IgA1 IC のメサンギウム沈着は循環に由来すると考えられているが、IgAN ではその詳細やメカニズムはよく分かっていない。我々は、Gd-IgA1 IC による糸球体内皮細胞障害がメサンギウム領域への沈着を誘導し、補体経路が活性化され、腎組織障害が誘導されることが仮説として推測される。この仮説を検証し、内皮細胞傷害に関わる基礎的なメカニズムをより深く理解することにより、IgA 腎症の病態解明や新規治療法の開発に進展することが期待される。

3. 研究の方法

<動物および実験プロトコール>

12 週齢の nude mouse (Balb/cAJcl-nu/nu) は、外来タンパク質に対する抗体形成能力が低下しているため、本研究で使用した。nude mouse は、順天堂大学動物施設で飼育され、実験プロトコールは、順天堂大学動物実験倫理審査委員会の承認を得た。我々は、ヒト Gd-IgA1-IgG IC を nude mouse に注射してメサンギウム領域への免疫グロブリン沈着、補体活性、血管内皮細胞障害を評価した。nude mouse に、Gd-IgA1 および Gd-IgA1 IC を 250 μ g、1 回注射してメサンギウム領域への免疫グロブリン沈着、補体活性、血管内皮細胞障害を評価した (各群 n=5)。メサンギウム沈着と糸球体障害を調べるため、注射 2 時間後に腎臓を採取した。尿サンプルを採取し、尿中アルブミンと血尿を評価した。電子顕微鏡を用いて、内皮細胞傷害と高電子密度沈着物を観

察した。リアルタイムグライコカリックスイメージングは、FITC-labeled wheat germ agglutinin lectin (Triticum vulgare L4895 由来 ; Sigma-Aldrich) を用いて、糖鎖 *N*-アセチルグルコサミン部位を標識した。nude mouse に Gd-IgA1 および Gd-IgA1 IC を頸動脈カニューレから 250 μ g 投与し、グライコカリックスを観察した後、2 時間後に腎臓を摘出した (各群 n=2)。

<ヒト腎糸球体内皮細胞培養>

ヒト腎糸球体内皮細胞 (HRGEC) (KAC) は、Gd-IgA1 および Gd-IgA1 IC で刺激した 72 時間後に評価した。

<糸球体 C4d 染色>

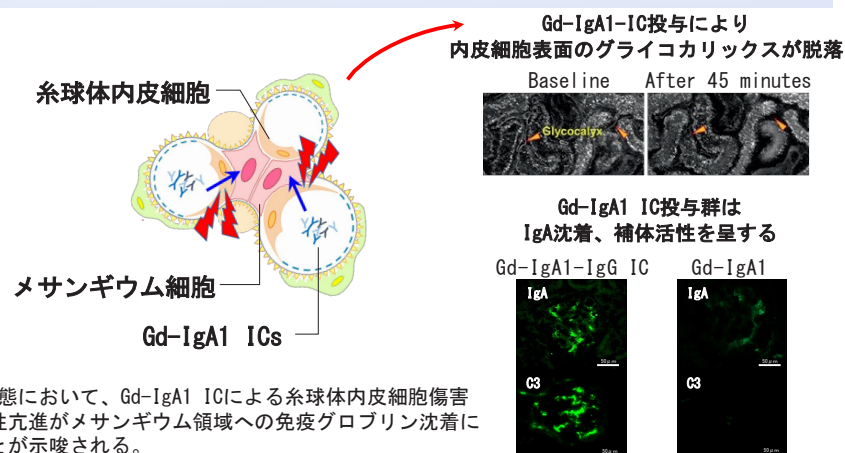
当院で腎生検を施行した IgA 腎症 28 症例の C4d 沈着および Gd-IgA1 を特異的に認識するモノクローナル抗体 : KM55 抗体を用いて Gd-IgA1 の糸球体沈着を評価した。

4. 研究成果

はじめに、Gd-IgA1 および Gd-IgA1 IC による糸球体内皮細胞障害のメカニズムを検討した。糸球体内皮細胞を *in vitro* にて Gd-IgA1 単独と Gd-IgA1 IC で共培養し、比較検討したところ、Gd-IgA1 IC による刺激で培養糸球体内皮細胞における接着分子 ICAM-1、VCAM-1 および E-selectin の発現が上昇し、TNF- α や IL-6 といったサイトカインの発現が増加することが明確になった。

次に、Gd-IgA1 および Gd-IgA1 IC を nude mouse に静脈投与し、*in vivo* での糸球体内皮細胞障害を解析した。腎ライブイメージングでは、Gd-IgA1 IC 投与によって内皮細胞表面からグライコカリックスが剥がれ落ち、電子顕微鏡でも糸球体内皮細胞が障害されることが確認された。さらに、Gd-IgA1 IC を投与した群において腎糸球体の補体活性が誘導され、血尿および蛋白尿を呈した。以上の結果より、Gd-IgA1 IC 形成が、糸球体障害を惹起する病因として重要と考えられた。この研究成果を論文発表した。

Gd-IgA1 ICによる糸球体内皮細胞障害を介したメサンギウム領域沈着メカニズム



続いて、IgA 腎症における補体活性化を介した糸球体障害の機序を解析するため、IgA 腎症において活性化される補体経路を検証した。その結果、IgA 腎症の腎糸球体では C3 が沈着し、

C1q は沈着しないこと、C5 や C5b-9 も染色されることが明らかとなり、つまり、補体第二経路の活性化が腎組織障害に重要であると考えられた。一方、mannose-binding lectin が C4d とともに糸球体に沈着する症例では、腎組織障害度、尿蛋白、腎予後が悪いことから、レクチン経路の活性化により病態が増悪すると考えられている。当院で腎生検を施行した IgA 腎症 28 症例を C4d 陽性 10 症例、陰性 18 症例の 2 群に分けて比較検討した。IgA 腎症診断時の尿蛋白量は C4d 陽性例で有意に高く、組織学的重症度も C4d 陽性例で有意に高いことが明らかになった。さらに、International IgAN prediction tool を用いた検討では、5 年後に末期腎不全に至る確率は、C4d 陽性例で有意に高いことが示された。血中 Gd-IgA1 値と C4d 沈着は相関を認めなかったが、尿中 Gd-IgA1 値と Gd-IgA1 の糸球体沈着面積は C4d 陽性症例で高値となる傾向がみられた。C4d 沈着は IgA 腎症の糸球体組織障害の進展に関与する可能性があり、ヒト IgA 腎症においても Gd-IgA1 糸球体沈着がレクチン経路活性化に寄与し、糸球体障害に関与することが示唆された。

これらの検討から、IgA 腎症では Gd-IgA1 および Gd-IgA1 IC 形成が糸球体内皮細胞障害、補体経路の活性化を誘導し、糸球体障害を引き起こすことが示唆された。

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 0件）

1. 著者名 Makita Yuko, Suzuki Hitoshi, Nakano Daisuke, Yanagawa Hiroyuki, Kano Toshiki, Novak Jan, Nishiyama Akira, Suzuki Yusuke	4. 巻 37
2. 論文標題 Glomerular deposition of galactose-deficient IgA1-containing immune complexes via glomerular endothelial cell injuries	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 1629 ~ 1636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ndt/gfac204	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 牧田侑子、鈴木 仁、中山麻衣子、深尾勇輔、鈴木祐介
2. 発表標題 IgA腎症におけるC4d沈着症例の検討
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuko Makita, Hitoshi Suzuki, Daisuke Nakano, Toshiki Kano, Akira Nishiyama, Yusuke Suzuki
2. 発表標題 Galactose-deficient IgA1-containing immune complexes deposit in mesangium mediated by endothelial cell injuries
3. 学会等名 16th International Symposium on IgA Nephropathy
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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