

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790943

研究課題名（和文） グライコミクスを応用した IgA 腎症の炎症制御機構解明とバイオマーカー開発

研究課題名（英文） The development of the mechanism of inflammation regulation and the biomarker in IgA nephropathy with the use of glycomics

## 研究代表者

井上 達之（INOUE TATSUYUKI）

京都大学・iPS 細胞研究所・研究員

研究者番号：60598564

## 研究成果の概要（和文）：

IgA 腎症における糖鎖不全 IgA による糸球体炎症制御機構を解析した。糖鎖不全 IgA 刺激にて培養ヒト糸球体細胞はアディポネクチンが発現低下し、IgA 腎症の糸球体にてその発現が低下した。

生体における糖鎖不全 IgA の証明を行った。腎組織の糖鎖不全 IgA を HA レクチン染色で証明した。尿中糖鎖不全 IgA 検出法としてレクチンを組み合わせた方法を開発し IgA 腎症は他疾患と比較し有意な糖鎖不全 IgA を認めた。

## 研究成果の概要（英文）：

We analyzed the mechanism of glomerular inflammation by the aberrantly glycosylated IgA. The expression of adiponectin was downregulated in cultured human glomerular cells stimulated by the deglycosylated IgA, and was also in glomeruli in the patients of IgA nephropathy.

We developed the methods of the aberrantly glycosylated IgA in patients with IgA nephropathy. The deglycosylated IgA in the renal tissue was certified by the staining of HA lectin. The urine deglycosylated IgA I was certified by the methods combined with two lectins, the urine deglycosylated IgA in the patients with IgA nephropathy was significantly increased compared with the other kidney disease.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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・IgA 腎症

## 1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は慢性糸球体腎炎で最多かつ末期腎不全に至る予後不良な疾患である。本疾患の病因、発症進展機序については不明な点が多いため、より特異的な治療法の開発には、これらを解明することが求められている。これまでに我々は、扁桃における IgA1 分子の

糖転移を特異的に調節する糖転移酵素遺伝子の発現異常を証明し、IgA 腎症発症における扁桃の重要性を報告した。（Inoue T et al. Clin Immunol. 2010）我々をはじめとし、近年 IgA 腎症では血液中や沈着糸球体における O 型糖鎖不全 IgA1 の存在が報告されており、本疾患の発症、進展に寄与する主要

因子と考えられている。

糖鎖修飾は生体蛋白の相互作用、機能に重要な役割を果たすとされ、近年 Glycobiology の進歩により糖転移酵素遺伝子(Glycogene) やレクチンを用いた糖鎖研究法の開発がなされた。ポストゲノムの最重要課題と考えられる機能的グライコミクスを応用し、疾患モデルおよび臨床に利用可能とすることは、本疾患の病態解明ばかりでなく治療戦略への鍵となることが予想される。

## 2. 研究の目的

ポストゲノムの重要課題である機能的グライコミクスを応用し、糖鎖修飾やレクチン結合アッセイを用いて、(1)IgA 腎症における炎症制御機構の解明、(2)糖鎖不全 IgA の検出によるバイオマーカーの開発を行う。

## 3. 研究の方法

(1)糖鎖不全 IgA1 による糸球体の炎症制御機構

### ① 糖鎖不全 IgA による炎症制御

- ・ヒトメサンギウム細胞およびヒト糸球体内皮細胞に対する糖鎖不全 IgA1 の影響を解明する
- ・糖鎖不全 IgA1 刺激によるアディポネクチンの炎症制御機構を明らかにする。

### ② ヒト IgA 腎症患者由来の血清 IgA による炎症制御

- ・ヒト IgA 腎症患者血清から分離した IgA をもちいて培養実験を行う。

③アディポネクチンをはじめとする 1)で同定された因子のヒト腎生検標本における発現ならびに意義の検討

- ・①で同定した因子の IgA 腎症患者の腎生検組織における発現を免疫染色、in situ hybridization にて解析する。

(2)腎組織及び尿における糖鎖不全 IgA の証明

### ①腎組織における糖鎖不全 IgA の証明

- ・IgA 腎症患者の腎生検組織における糖鎖不全 IgA1 沈着を、特異的レクチン染色 (HA、SNA レクチン) にて明らかにする。

②糖鎖不全 IgA の尿中バイオマーカーとしての有用性の検討

- ・尿中 IgA の糖鎖不全を、レクチン結合アッセイにて定量化する。
- ・尿中糖鎖不全 IgA の程度が疾患特異性、また疾患活動性との相関関係を解析し、バイオマーカーとしての有用性を検討する。

## 4. 研究成果

(1)糖鎖不全 IgA による炎症制御を解明するため、培養ヒト糸球体メサンギウム細胞(図1)並びにヒト糸球体血管内皮細胞に対する、糖鎖不全 IgA 刺激によるサイトカインアレイ解析を行った。糖鎖切断酵素により脱ガラクトース、脱シアル酸処理した IgA(deGal/deSial IgA)を作製し、以下の実験を行った。

糖鎖不全 IgA はいずれの細胞においてもアディポネクチンがダウンレギュレーションされた。アディポネクチンの腎生検標本上での発現解析の検討では、IgA 腎症においてはその発現が糸球体において低下した。なお、IgA 腎症患者血清からの IgA 分離することができず、患者血清由来 IgA による培養細胞実験は実施できなかった。

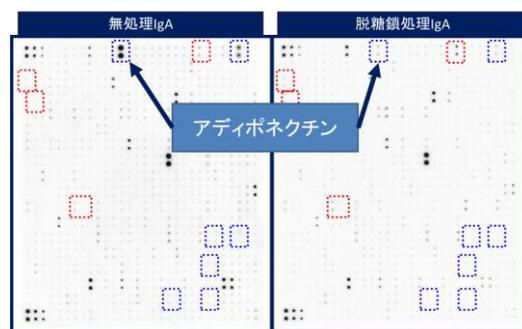


図1：培養ヒトメサンギウム細胞に対する脱糖鎖 IgA によるサイトカインアレイ

アディポネクチンは主に脂肪細胞から分泌され多量体形成し、様々な生理活性を持ち一般的にインスリン感受性の亢進や動脈硬化抑制といった機能が知られている。近年では多臓器での発現や局所での抗炎症作用なども報告されている。腎組織内では2型糖尿病の血管内皮細胞で発現低下することが報告されていますがメサンギウム細胞では知られていない。アディポネクチンは炎症制御に寄与していると考えられ、糖鎖不全 IgA との関係性は炎症進展機序の解明に寄与すると考えられた。

(2) 腎組織及び尿における糖鎖不全 IgA の証明について検討を行った。①腎組織における糖鎖不全 IgA を証明するため、ガラクトース不全を認識する HA レクチン染色を行い、本疾患においては IgA 沈着領域での HA レクチン染色を検出することが可能であった。(図 2)

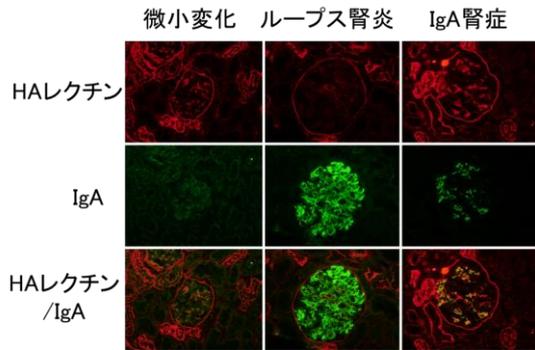


図 2 : 腎生検組織における HA レクチン染色と IgA 染色

②糖鎖不全 IgA の尿中バイオマーカーとしての有用性の検討のため、尿検体での HA レクチンとシアル酸検出する SNA レクチンによるレクチンアッセイ(図 3, 4)をおこない、組み合わせる方法を開発した。IgA 腎症は他疾患と比較し有意な糖鎖不全 IgA (HA/SNA 比) を認めた。(図 5)

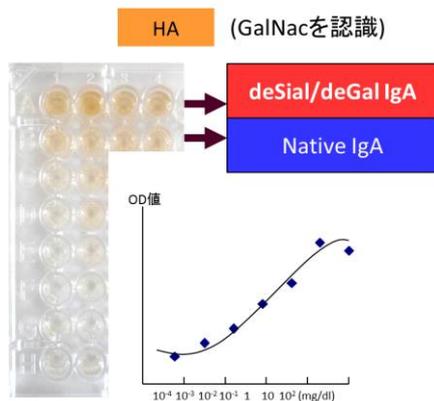


図 3:HA レクチンアッセイ



図 4 : SNA レクチンアッセイ

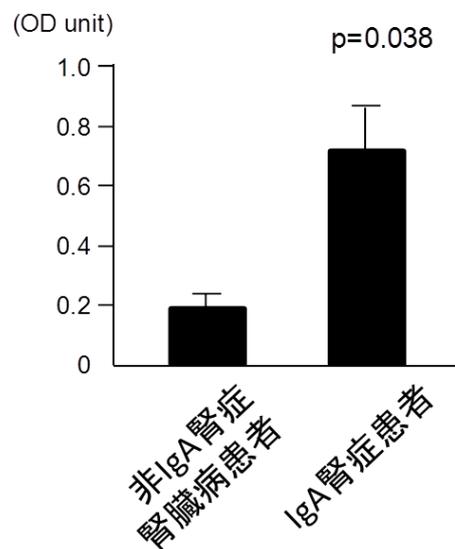


図 5:尿中 IgA の HA、SNA レクチンアッセイ比

腎生検時の確定診断や鑑別診断困難症例などへの応用や腎移植時の持ち込み腎炎または IgA 沈着症との鑑別への応用が、また尿中アッセイの開発は非侵襲的な診断やバイオマーカーとしての応用にも期待される。

これらの成果は PLoSOne 誌に報告を行った。

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1件)

(1) Tatsuyuki Inoue, Hitoshi Sugiyama, Masashi Kitagawa, Keiichi Takiue, Hiroshi Morinaga, Ayu Ogawa, Yoko Kikumoto, Shinji Kitamura, Yohei Maeshima, Hirofumi Makino. Suppression of adiponectin by aberrantly glycosylated IgA1 in glomerular mesangial cells in vitro and in vivo. PLoS ONE. 査読 (有) 7(3), 2013. e33965. 10.1371/journal.pone.0033965

〔学会発表〕(計2件)

(1) 井上達之、杉山 斉、北川正史、瀧上慶一、森永裕士、喜多村真治、前島洋平、槇野博史 腎生検組織における HA レクチン染色は IgA 腎症の新規診断法として有用である。日本腎臓学会学術総会、2011年6月15日、第54回パシフィコ横浜、横浜。

(2) Hitoshi Sugiyama, Tatsuyuki Inoue, Masashi Kitagawa, Keiichi Takiue, Hiroshi Morinaga, Yoko Kikumoto, Ayu Ogawa, Shinji Kitamura, Yohei Maeshima, Hirofumi Makino. Aberrantly glycosylated IgA1 diminishes adiponectin expression in glomerular mesangial cells in vitro and in vivo: A novel anti-inflammatory mechanism in IgA nephropathy. Kidney Week 2011, アメリカ腎臓学会. 2011年11月10日 Philadelphia, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 達之 (INOUE TATSUYUKI)  
京都大学・iPS細胞研究所・研究員  
研究者番号：60598564

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：