

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461232

研究課題名(和文) IgA腎症の発症と進展におけるIgA糖鎖不全と責任B細胞の解明

研究課題名(英文) The Analysis of aberrant glycosylation of IgA and B cells secreting those IgAs in IgA Nephropathy

研究代表者

木原 正夫 (KIHARA, Masao)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50512604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：IgA腎症患者ではO型糖鎖修飾の異常があることが報告されている。今回IgA腎症モデルマウスであるddYマウスを用いて、IgA産生ハイブリドームを作成し、正常マウスに移植すると、ヒトIgA腎症に極めて類似した糸球体病変を呈することが確認された。ヒトB細胞が発現する6種類のGalNAc転移酵素のうち、GalNAc-T2がヒトIgA1のヒンジ部において最も高い転移活性をもつことが報告されているが、このハイブリドームでもGalNAc-T2 mRNAの発現が比較的高いことが判明した。現在GalNAc-T2の発現を増加させることで、O型糖鎖の多いddY由来IgAを産生するハイブリドームを確立中である。

研究成果の概要(英文)：O-linked glycans of IgA1 from IgAN patients revealed an aberrant glycosylation status characterized by diminished galactosylation. Implantation of transfectoma cells secreting an IgA derived from ddY mice (ddY-IgAN hybridoma) induced glomerular lesion resembling human IgAN in BALB/c mice. Among the six GalNAc-Ts expressed in human B cells, GalNAc-T2 exhibited the highest catalytic activity in transferring GalNAc to a synthetic peptide from the hinge region of human IgA1. We observed that GalNAc-T2 mRNA expression was higher in ddY-IgA N hybridoma than ddY-deriver hybridoma not inducing IgAN. Thus, more O-glycosylated ddY-IgAN hybridoma will be generated by either enhancing the expression of GalNAc-T2 through transfection with plasmids encoding GalNAc-T2 cDNA. The extent of O-glycosylation from the hinge region of secreted IgAs will be verified by MALDI-TOF MS, and cells secreting ddY-IgAN hybridoma variants will be implanted into BALB/c mice to test their nephritogenicity.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：IgA腎症 糖鎖不全

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は原発性糸球体腎炎のなかで最も頻度の高く、その約 40%が末期腎不全に至る予後不良の疾患であるが、その病因はいまだ解明されていない。IgA 腎症は IgA の糸球体メサンギウム領域への沈着と、通常補体 C3 の沈着を伴う。IgA は IgA1 と IgA2 の 2 つのサブクラスがあるが、沈着する IgA は IgA1 サブクラスであることが分かっている。2 つのサブクラスの違いとして IgA1 はヒンジ部に O 型糖鎖を保有しているが、IgA 腎症患者ではガラクトース減少を伴う O 型糖鎖修飾の異常が認められる (*J Clin Invest*, 1999; 104:73-81)。

我々はこれまでに IgA 腎症自然発症モデルである ddY マウスを用いて検討を重ね、ヒト IgA 腎症の病因解析に適したモデルであることを証明した (*J Am Soc Nephrol*, 2005; 16:1289-1299)。また早期に腎炎を発症するグループ間で交配し、2 系統の近交系を確立した (*J Am Soc Nephrol*, 2012; 8:1364-1374)。このマウスで確認された IgA 腎症の疾患感受性遺伝子の一部がヒト IgA 腎症の責任遺伝子に相同する遺伝子座に規定されていたことが明らかにされた。我々のグループでは ddY マウスを用いて、主に TLR9 が関与する自然免疫と扁桃を中心とする粘膜免疫の異常 (*Contrib Nephrol*, 2007; 157:197-217)、またそこで産生されると考えられる腎炎惹起性 IgA について報告をしてきた。そのなかで Th2 サイトカインである IL-4 が Core1 (1,3galactosyl transferase) とその分子シャペロン Cosmc の活性を低下させることにより、B 細胞からの糖鎖不全 IgA1 の産生を増加させることを報告している (*Nephrol Dial Transplant*, 2010; 12:3890-3897)。さらに扁桃摘出ステロイドパルス療法の治療により血清における腎炎惹起性ガラクトース欠損 IgA1 (Gd-IgA1) が低下していることが分かっている (*J Clin Invest*, 2008; 118:629-639)。

2009; 119:1668-1677)。これらは Gd-IgA1、Gd-IgA1-IgG 免疫複合体が IgA の生体指標として今後利用できると考えられる。

IgA 腎症において IgA1 の糖鎖不全が生じるメカニズムについては、いまだ明らかにされていない。その理由の 1 つとしては、それを検証する適切なモデルマウスが存在しなかったことがあげられる。実際これまでは、マウス IgA のヒンジ部 O 型糖鎖は存在しないとされてきたが、免疫グロブリン重鎖アロタイプ 2a (Igh-2a) と 2c (Igh-2c) を持つ

IgA には O 型糖鎖をもちうる構造であることは指摘されていた (*Immunogenetics*, 2002; 53:1033-1038)。ループモデルマウスから得られたリウマチ活性をもつ IgA 産生ハイブリドーマ (6-19 IgA) で検討したところ、ヒンジ部に O 型糖鎖が確認され、in vivo での検討により腎糸球体に IgA の沈着を誘導することができた。これは同じ Igh-2a をもつが O 型糖鎖をもたない IgA を産生するハイブリドーマ (46-42 IgA) では IgA の沈着を認めなかったことより、O 型糖鎖が IgA 腎症の病因に重要な役割を担っている可能性がマウスでも示された (*J Am Soc Nephrol*, 2012; 23:438-446)。

我々が確立した 2 系統の ddY マウスはそれぞれ Igh-2a と Igh-2c をもつことが分かっている。このことから、IgA 腎症における発症進展機序における Gd-IgA とそれを産生する B 細胞の検討を ddY マウスで行い、それをヒト IgA 腎症の病因解明につなげることができると考え研究を計画した。

2. 研究の目的

IgA 腎症の発症に関与していると考えられる糖鎖不全 IgA とその責任 B 細胞の病的役割の解明を目的とする。

IgA 腎症では糸球体に沈着する IgA ヒンジ部の O 型糖鎖修飾異常があることが指摘されているが、それを解析するための適切な動物モデルがこれまでは存在しなかったため、IgA 分子の糖鎖異常の病源的役割が不明なままであった。

我々が確立した IgA 腎症自然発症モデルマウス (*J Am Soc Nephrol*, 2005; 16:1289-1299, 2012; 8:1364-1374) を用いてハイブリドーマを作製し、糖鎖不全 IgA、またそれを産生する異常 B 細胞について、in vitro・in vivo で明らかにする。また、ヒト IgA 腎症へのフィードバックを図る。

3. 研究の方法

IgA 産生ハイブリドーマの作製

我々が確立したアロタイプ Igh-2a と Igh-2c を持つ 2 系統の ddY マウス (*J Am Soc Nephrol*, 2012; 8:1364-1374) の脾臓細胞を用い、ポリエチレングリコール (PEG) 法により bcl2 を高発現させた NSO ミエローマ細胞と融合させる。融合したハイブリドーマから IgA を産生量の多いクローンを ELISA により選別する。ELISA に用いるプレートリーダーは、当学部共同研究室に設置されているものを使用する。

RT-PCR/cDNA シークエンス

で得られたいくつかのクローンからトリゾールを用いて RNA を抽出し、cDNA 合成を行う。IgA の定常領域と可変領域のシークエンスを、適したプライマーを設定して行う。またアミノ酸シークエンスにより、ヒンジ部においてセリン、スレオニンの有無を確認する。それにより O 型糖鎖が存在しうるかを予測する (Immunogenetics,2002;53:1033-1038)。

正常マウスへの腹腔内投与

(in vivo での検討)

2 系統の Grouped ddY マウスから得られたハイブリドーマを BALB/c マウス、B6 マウスに腹腔内投与する。使用するマウスは、本学実験動物施設内 (specific pathogen free : SPF)にて飼育する。採取した腎臓は、一部ホルマリン固定しパラフィン切片を作製、残りを液体窒素で迅速凍結し、クリオスタット(-25)厚さ 3 μ m に薄切し凍結切片として用いる。H&E・PAS 染色および抗 IgA・抗 IgG・抗 C3 抗体などを用いて免疫染色し病理組織学的に評価を行う。血液、尿を採取しセパラピッドチューブにて血清を分離、尿はエッペンドルフチューブに入れ、測定まで-80 で保存する。血清 IgA・IgG、尿中アルブミンを ELISA 法にて測定する。

Real-time PCR

で得られた cDNA を用いて、IgA 腎症に関わると予測される標的分子について Real-time PCR でその遺伝子発現量を確認する。UDP-N-acetyl- D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (pp-GalNAc-Ts)、core 1 galactosyltransferase (C1Gal-T1) 等 (Nephrology,2007;12:275-284)。その他適宜検討に値する分子を追加して検討する。

IgA 精製

で得られた IgA 産生ハイブリドーマから IgA を精製 (外部委託による)

・ゲル濾過クロマトグラフィーによる単量体 IgA、多量体 IgA 分子の分離：ゲルフィルトレーションカラムを用いて分離する。得られた IgA 濃度は、ELISA にて測定する。

・MALDI-TOF-MS による O 型糖鎖構造の分析 (外部委託による)

IgA mutant の作製

特に で得られた結果から、その標的分子にターゲットをあて、cDNA を遺伝子導入したプラスミドをトランスフェクション法により、その遺伝子をより高度に発現、もしくはその発現を減少させたハイブリドーマを作製する。さらに in vivo で IgA 腎症様の病態が認められるかを検証することにより、その標的分子が IgA 腎症に深くかかわっていることの証明になると考えられる。

ヒト IgA 腎症での検証と応用

a. ヒト扁桃での解析

b. ヒト SNP への応用

基礎的実験で得られたデータをもとに、ヒト扁桃細胞での検証と IgA 腎症に関わる責任遺伝子の同定をすすめる。解析は当学部共同利用研究室に設置されている ABI Prism 7500 Sequence Detection system を使用する。

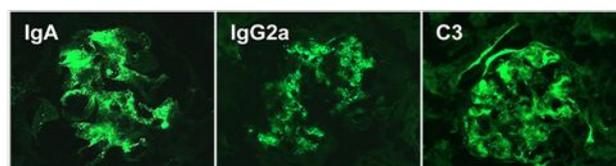
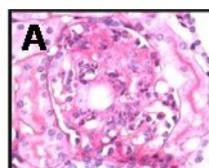
4 . 研究成果

(1) IgA 産生ハイブリドーマの確立

Igh-2a と Igh-2c を持つ 2 系統の ddY マウスを用いて、ハイブリドーマを確立した。その中で IgA 産生量の多いクローンを選別し、保存した。

(2) 上記クローンから cDNA を抽出して、アミノ酸シークエンスを行ったが、現段階ではヒンジ部においてセリン、スレオニンは確認されていない。考察中。

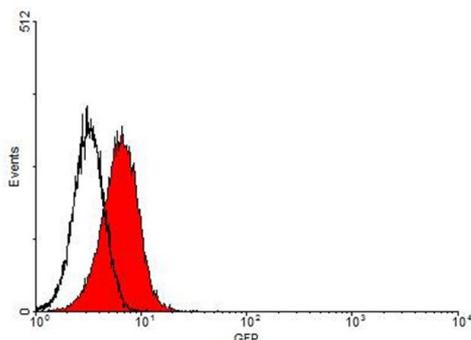
(3) IgA 産生量の多いハイブリドーマを BALB/c マウスに腹腔内投与し、腎炎が惹起されるか確認したが、一部のマウスでメサンギウム増殖性腎炎 (メサンギウム基質増加、メサンギウム細胞増多) の所見と、蛍光抗体法で IgA、IgG2a、C3 の沈着が確認された。



(4) 標的分子の確認

ddY マウス由来の IgA 産生ハイブリドーマの BALB/c マウスへの移入実験により IgA 腎症様の所見を呈したハイブリドーマと腎炎を惹起が明らかでなかったハイブリドーマの相違を標的分子の観点から real Time PCR を用い

て検索した。その結果、GalNAc-T2の発現がIgA腎症様の病変を呈したハイブリドーマで高くなる傾向にあった。



また病因に関与すると思われる標的分子について、さらなる検索をreal Time PCRで継続中。

(5) 標的分子の遺伝子

現在、GalNAc-T2 cDNAを導入したプラスミドを腎炎惹起しなかったハイブリドーマへ移入してGalNAc-T2の発現を増加させることを試みている。

ハイブリドーマの作成と、現在進行中の遺伝子導入プラスミドの作成に時間を要したため、3年間での当初の計画に遅延を生じたが、今後も継続して、計画を遂行していく予定である。

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23件)

Lai KN, Tang SC, Tomino Y et al. IgA nephropathy. Nat Rev Dis Primers. 2016 査読無

Suzuki Y, Suzuki H, Tomino Y. Release from Th1-type immune tolerance in spleen and enhanced production of IL-5 in Peyer's patch by cholera toxin B induce the glomerular deposition of IgA. Immunobiology. 221(4):577-85,2016 査読有

Diciolla M, Suzuki H, Tomino Y, et al. Patient classification and outcome prediction in IgA nephropathy. Comput Biol Med. 66:278-86, 2015 査読有

Kim YG, Suzuki H, Tomino Y, Suzuki Y, et al. Pathogenic Role of a Proliferation-Inducing Ligand (APRIL) in Murine **IgA** Nephropathy. PLoS One. 10(9), 2015 査読有

Yasutake J, Suzuki Y, Suzuki H,

Tomino Y, et al. Novel lectin-independent approach to detect galactose-deficient IgA1 in IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 30(8):1315-21,2015 査読有

Suzuki H, Tomino Y, Schena FP, et al. Clinical decision support system for end-stage kidney disease risk estimation in IgA nephropathy patients. Nephrol Dial Transplant. 31(1):80-6,2016 査読有

Liu C, Kanamaru Y, Suzuki Y, Tomino Y, et al. Targeted IgA Fc receptor I (FcαRI) therapy in the early intervention and treatment of pristane-induced lupus nephritis in mice. Clin Exp Immunol. 181(3):407-16,2015 査読有

Sasaki Y, Suzuki Y, Tomino Y, et al. TWEAK/Fn14 system and crescent formation in IgA nephropathy. BMC Nephrol. 16:27,2015 査読有

Sonoda Y, Suzuki Y, Tomino Y. Circulating TNF receptors 1 and 2 are associated with the severity of renal interstitial fibrosis in IgA nephropathy. PLoS One. 10(4),2015 査読有

Suzuki H, Suzuki Y, Novak J, Tomino Y. Development of Animal Models of Human IgA Nephropathy. Drug Discov Today Dis Models. 11:5-11,2014 査読無

Fukuda H, Asanuma K, Tomino Y. Podocin is translocated to cytoplasm in puromycin aminonucleoside nephrosis rats and in poor-prognosis patients with IgA nephropathy. Cell Tissue Res. 360(2):391-400,2015 査読有

Asanuma K, Tomino Y, Saito A, et al. Significance of urinary full-length megalin in patients with IgA nephropathy. PLoS One. 9(12),2014 査読有

Yamaji K, Suzuki Y, Suzuki H, Tomino Y. The kinetics of glomerular deposition of nephritogenic IgA. PLoS One. 9(11),2014 査読有

Suzuki Y, Suzuki H, Tomino Y. Diagnosis and activity assessment of immunoglobulin A nephropathy: current perspectives on noninvasive testing with aberrantly glycosylated immunoglobulin A-related biomarkers. Int J Nephrol Renovasc Dis. 7:409-14,2014 査読有

Shimamoto M, Suzuki H, Tomino Y. Impact of Body Mass Index on Progression of IgA Nephropathy Among Japanese Patients. J Clin Lab Anal. 29(5):353-60,2015 査読有

Satake K, Suzuki H, Suzuki Y, Tomino

Y. Serum under-O-glycosylated IgA1 level is not correlated with glomerular IgA deposition based upon heterogeneity in the composition of immune complexes in IgA nephropathy. BMC Nephrol. 15:89.2014 査読有

Tomino Y. Fluctuation of serum C3 levels reflects disease activity and metabolic background in patients with IgA nephropathy: response to comment. J Nephrol. 27(4):463.2014 査読無

Yanagawa H, Suzuki H, Suzuki Y, Tomino Y. A panel of serum biomarkers differentiates IgA nephropathy from other renal diseases. PLoS One. 9(5),2014 査読有

Aizawa M, Suzuki Y, Suzuki H, Kihara M, Nakata J, Tomino Y. Uncoupling of glomerular IgA deposition and disease progression in alymphoplasia mice with IgA nephropathy. PLoS One. 9(4),2014 査読有

Nakata J, Suzuki Y, Suzuki H, Tomino Y. Changes in nephritogenic serum galactose-deficient IgA1 in IgA nephropathy following tonsillectomy and steroid therapy. PLoS One. 9(2),2014 査読有

Suzuki Y, Suzuki H, Tomino Y. Serum levels of galactose-deficient immunoglobulin (Ig) A1 and related immune complex are associated with disease activity of IgA nephropathy. Clin Exp Nephrol. 18(5):770-7,2014 査読有

⑳ Suzuki H, Tomino Y, Novak J. Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes. J Biol Chem. 289(8):5330-9.2014 査読有

㉑ Masao Kihara, Junichiro Nakata, Shozo Izui, et al. O-Linked Glycosylation Determines the Nephritogenic Potential of IgA Rheumatoid Factor. J am Soc Nephrol 25:1282-1290, 2014 査読有

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木原 正夫 (KIHARA, Masao)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：50512604

(2) 研究分担者

富野 康日己 (TOMINO, Yasuhiko)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：60130077

鈴木 仁 (SUZUKI, Hitoshi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：10468572

鈴木 祐介 (SUZUKI, Yusuke)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：70372935

中田 純一郎 (NAKATA, Junichiro)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：20365638