

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860652

研究課題名(和文) IgA腎症の発症・進展における組織トランスグルタミナーゼの役割の解明

研究課題名(英文) Role of Mesangial Tissue Transglutaminase in the Pathogenesis of IgA Nephropathy

研究代表者

高橋 和男 (TAKAHASHI, Kazuo)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：90631391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：組織型トランスグルタミナーゼ(TG2)は、線維化や炎症の惹起に関与する。TG2特異的高反応性基質ペプチドを用いた腎生検組織上のTG2活性の検出法を確立し、ヒト腎生検組織(n=241)を検討した。IgA腎症(IgAN)の54%(n=65)、ループス腎炎(LN)の58%(n=40)、IgA血管炎を含む二次性IgANの64%(n=11)にメサンギウム領域のTG2活性を検出した。IgANにおいてメサンギウム領域のTG2活性は、蛋白尿及びOxford分類のメサンギウム細胞増多(M)に関連し、LNでは血尿と組織学的活動性に関連した。TG2活性の検出は、新規病理診断法として有用な可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Tissue transglutaminase (TG2) plays an important role in tubulointerstitial fibrosis. However, its pathological significance in glomerular diseases remains unclear. A total of 241 renal biopsy specimens were assessed for TG2 activity by immunofluorescence microscopy with highly reactive TG2 substrate peptides. Thirty-five of 65 (56%) patients with IgA nephropathy (IgAN), 23 of 40 (58%) patients with lupus nephritis (LN), and 7 of 11 (64%) patients with secondary IgAN, including 8 IgA vasculitis patients, exhibited mesangial TG2 activity. IgAN patients with mesangial TG2 activity had higher levels of proteinuria and a higher mesangial score defined by the Oxford classification than those without mesangial TG2 activity. LN patients with mesangial TG2 activity showed higher presence of hematuria and had histological evidence of active lesions more frequently than patients without mesangial TG2 activity. This assay for mesangial TG2 activity may represent a useful new diagnostic test.

研究分野：腎臓病学

キーワード：IgA腎症 ループス腎炎 組織トランスグルタミナーゼ 病理診断 免疫複合体 IgA 補体

1. 研究開始当初の背景

タンパク質架橋化酵素であるトランスグルタミナーゼ (TG) はカルシウムイオン依存性に、特定のタンパク質間における共有結合レベルでの架橋化反応を触媒する。この反応はタンパク質のグルタミン残基とリジン残基との間にイソペプチド結合を形成させる。TG は 8 つのアイソザイムが存在しそれぞれが独自の組織分布と基質を有して多彩な生命現象に関与する。このうち組織トランスグルタミナーゼ (TG2) は他の TG と異なり、その分布が内皮細胞、線維芽細胞等生体内に広く存在している。TG2 は主に細胞内に存在し、通常では酵素活性を持たないが、TG2 は細胞外に分布すると酵素活性を持つ。TG2 は慢性腎臓病や糖尿病動物モデルでの間質線維化に関与すると近年報告されたが (J Am Soc Nephrol 2007, Kidney Int 2009, J Am Soc Nephrol 2014), ヒト腎臓における病的意義は未だ明らかではない。TG2 は活性型で生理作用を持つため活性型 TG2 の検出が必要である。TG の反応は各アイソザイムでグルタミン残基への選択性があり、架橋する基質タンパク質を決定している。Hitomi らはランダムペプチドライブラリーを用い TG 高反応性基質配列を同定し、FITC ラベル TG2 特異的高反応性基質ペプチドで、組織上の TG2 活性の可視化に成功した (J Biol Chem 2006, J Histochem Cytochem 2011)。

2. 研究の目的

IgA 腎症 (IgAN) の発症機序は明らかでないが、マウスモデルにおいて組織トランスグルタミナーゼ (TG2) がメサンギウム細胞上の IgA1 受容体であるトランスフェリン受容体 (CD71) の発現亢進、メサンギウム領域への IgA 沈着、その後の腎炎惹起に必須であると報告された (J Exp Med 2012)。そこで、Hitomi らの方法を用いて、少数の IgAN 患者腎生検組織を用いて検討したところ、一部の IgAN 患者のメサンギウム領域に TG2 活性を検出した。一方、他の一次性系球体疾患では系球体血管極、小血管内皮に弱い TG2 活性を認めたと、メサンギウム領域には活性を認めなかった。本研究は、腎組織の TG2 活性を検出し臨床・病理所見と比較することで、IgAN におけるメサンギウム領域の TG2 活性の意義を検討した。さらにメサンギウム細胞における TG2 発現、活性化機序の解明を試みた。

3. 研究の方法

FITC ラベル TG2 特異的高反応性基質ペプチドを用い、藤田保健衛生大学病院にて 2010 年から 2013 年に行われた腎生検組織 (n=241) の TG2 の活性を、蛍光顕微鏡にて検出した。メサンギウム領域の TG2 活性は Image J を用いて定量化した。IgAN の腎組織は腎病理医により独立して Oxford 分類を用い評価を行った。

培養ヒトメサンギウム細胞 (Human Glomerular Mesangial Cells: HGMC) に対して、

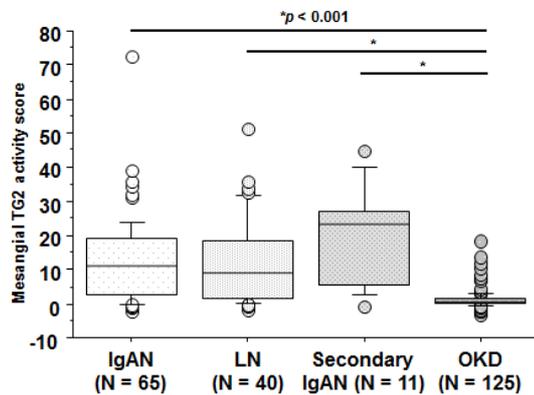
正常ヒト血清を 37 °C で 60 分間、CO₂ インキュベーター内で反応させた。反応後、細胞表面に存在する C3b および TG2 について免疫組織学的手法を用いて解析を行った。反応後の培養上清についても ELISA 法を用いて、反応前後の TG2 の濃度を測定した。

細胞外へ流出した TG2 が細胞機能に与える影響を明らかにするため、スクラッチアッセイを用い、ヒトリコピナント TG2 (100, 200nM) が細胞遊走能に与える影響を検討した。

4. 研究成果

IgA 腎症 (IgAN) の 54% (n=65), ループス腎炎 (LN) の 58% (n=40), IgA 血管炎を含む二次性 IgAN の 64% (n=11) にメサンギウム領域の TG2 活性を検出した。一方、その他の系球体疾患 (n=125) は 6% にわずかな TG2 活性を認めるのみであった (図 1)。

図 1. 腎生検体におけるメサンギウム領域の TG2 活性

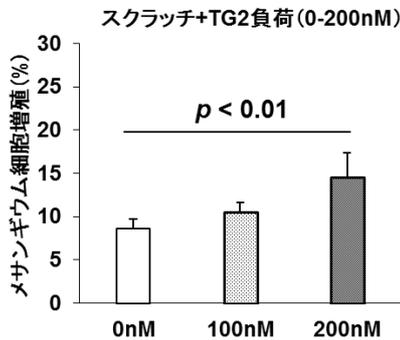


さらにメサンギウム TG2 活性陽性の IgAN 患者は、陰性の患者に比し有意に蛋白尿が多かった (1.2 vs. 0.5 g/day, $P < 0.01$)。腎病理医による Oxford 分類との比較では、TG2 活性と管内細胞増多 (E), 系球体硬化 (S), 尿管萎縮/間質線維化 (T), 半月体 (Ex) スコアに関連はなかったが、TG2 活性陽性患者では有意にメサンギウム細胞増多 (M) スコアが高値であった (0.53 vs. 0.38, $P = 0.03$)。

また、メサンギウム TG2 活性陽性の LN 患者は、陰性の患者に比し、20/hpf 以上の血尿を高率に有し (39% vs. 0%, $P < 0.001$)、ISN/RPS 分類で定義される活動性病変を有意に認めた (83% vs. 35%, $P < 0.001$)。以上より、メサンギウム領域の TG2 は、メサンギウム領域に免疫複合体の沈着を認める腎炎において、疾患活動性に関与することが示唆された。

ヒト培養メサンギウム細胞は、細胞質内に豊富に TG2 を持つが通常活性化していない。細胞外では Ca²⁺ 濃度依存下に TG2 は活性化する。ヒト培養メサンギウム細胞に TG2 を添加すると、細胞増殖を認める (図 2) ことから、TG2 はメサンギウム細胞において、タンパク質間にイソペプチド結合を形成し、細胞増殖刺激を起こす可能性が考えられた。

図 2 . TG2 によるメサンギウム細胞増殖



そこで、メサンギウム細胞における TG2 活性化機序として、免疫複合体沈着に続く補体活性化が細胞障害を引き起こし、TG2 の細胞外シフトを惹起すると仮説し、培養メサンギウム細胞 (Human Glomerular Mesangial Cells; HGMC) を用いた検討を次に行った。

HGMC に対して、正常ヒト血清を 37 で 60 分間暴露させたところ、細胞表面の C3b 沈着は血清濃度依存的に増加した (図 3)。一方、HGMC の TG2 発現は減少した (図 4)。血清刺激後、培養上清中の TG2 濃度を測定したところ、刺激前後にて有意に増加していた (図 5)。上記反応は、非動化済みの血清では認められなかった。

図 3 . 正常ヒト血清による細胞表面 C3b 沈着

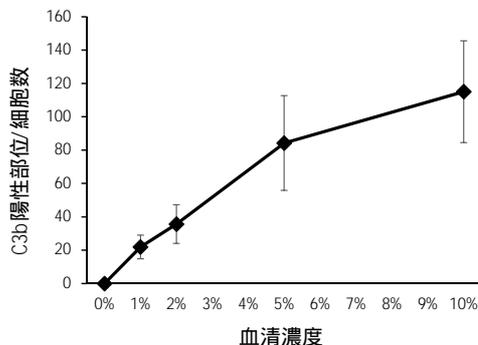


図 4 . 正常血清刺激後の細胞の TG2 発現

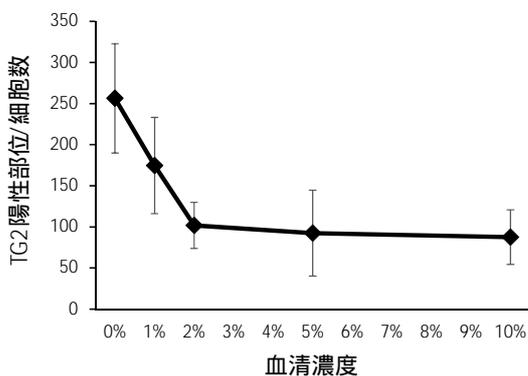
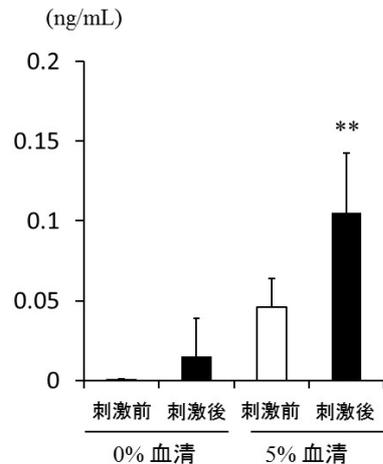


図 5 . 各濃度下における血清刺激後の TG2 濃度 (細胞上清) student-t test (vs 刺激前, **p < 0.01)



以上より、正常血清による補体刺激によりメサンギウム細胞内の TG2 は細胞外にシフトすることが確認された。

メサンギウム領域への免疫複合体沈着を認める腎炎では、メサンギウム細胞から補体刺激により細胞外 TG2 のシフトが生じ、TG2 の活性化が腎炎の活動性に関与する可能性が示唆された。メサンギウム細胞における TG2 基質の同定が、腎炎発症機序の解明に繋がる可能性がある。メサンギウム領域の TG2 活性の検出は、腎炎の活動性を反映する新たな組織診断法として有用な可能性がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

Takahashi K, et al. Detection of Mesangial Tissue Transglutaminase Activity in Human Kidney Biopsy Specimens. J Am Soc Nephrol 26: 723A; 2015

Takahashi K, et al. Expression of Mesangial Tissue Transglutaminase Is Independent of Aberrantly Glycosylated IgA in Patients with IgA Nephropathy. J Am Soc Nephrol 26: 591A; 2015

高橋和男 他. IgA 腎症のメサンギウム組織トランスグルタミナーゼ活性は糖鎖異常 IgA1 とは独立して疾患活動性と関連する. 第 58 回日本腎臓学会総会. 2015. 名古屋

高橋和男 他. IgA 腎症の血清 IgA1 ヒンジ部 O 結合型糖鎖の詳細な解析. 第 58 回日本腎臓学会総会. 2015. 名古屋

高橋和男 他. メサンギウム増殖性腎炎の病因解明に向けた補体活性化とトランスグルタミナーゼ 2 の関連について. 第 58 回日本腎臓学会総会. 2015. 名古屋

高橋和男 他. 質量分析による IgA1 ヒンジ部糖鎖異常部位の定量及び同定法の作成. IgA 腎症研究会. 2015. 東京

高橋和男 他. IgA 腎症における組織トランスグルタミナーゼ活性の検出. IgA 腎症研究会. 2014. 東京

〔図書〕(計 1 件)

Takahashi K, Yamamoto R, Yuzawa Y. Japanese Clinical Practice Guidelines for IgA Nephropathy: Difference from KDIGO Guidelines. Pathogenesis and Treatment in IgA Nephropathy. Springer. pp 251-262, 2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://fujita-jin.blogat.jp/blog/2013/02/iga-f52d.html>

6 . 研究組織

研究代表者 高橋和男 (TAKAHASHI Kazuo)

藤田保健衛生大学医学部腎内科学 講師

研究者番号：9 0 6 3 1 3 9 1