

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05292

研究課題名(和文) IgA腎症の新規診断法確立に関する国際間研究

研究課題名(英文) Development of biomarker for IgAN: Development of biomarker for IgAN: An international collaboration study

研究代表者

湯澤 由紀夫 (Yuzawa, Yukio)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：00191479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：IgA腎症では血液中に糖鎖異常IgA1が増加するが、糖鎖の正確な構造は明らかでない。また、人種により発症頻度に差を認めるが、人種間の糖鎖構造の差異は不明である。本研究では、多人種間の正常及びIgA腎症患者のIgA1糖鎖構造を解析し、患者で増加する異常糖鎖構造の同定を試みた。日本人を含む5人種健康者50名と日本人IgA腎症患者20名の血清からそれぞれIgAを分離し、高分解能質量分析計でO結合型糖鎖付着部位を含めて定量的に同定した。本研究により正常糖鎖構造が明らかとなり、糖鎖異常IgA1値と相関する糖鎖構造が明らかとなった。異常糖鎖構造の同定は簡便かつ正確な糖鎖異常IgA1検出法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：IgA1 with galactose (Gal)-deficient hinge-region (HR) O-glycans (Gd-IgA1) plays a key role in the pathogenesis of IgA nephropathy (IgAN). To identify potentially disease-specific IgA1 HR O-glycoforms, we profiled serum IgA1 HR glycopeptides using specimens from Japanese IgAN patients and healthy controls (HC) of different races. IgA1 from sera of 20 Japanese IgAN patients and 50 HC, recruited from Caucasian, Black, Hispanic, Asian, and Japanese populations, was purified by affinity chromatography. IgA1 HR glycosylation heterogeneity including glycan attachment sites were analyzed by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. We successfully characterized HR O-glycan profile in normal subjects and identified the O-glycoforms correlating with serum level of Gd-IgA1. Identification of specific HR O-glycoforms increasing in IgAN patients will lead to the development of robust biomarker in IgAN.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：IgA腎症 糖鎖異常IgA バイオマーカー開発 国際間共同研究 糖鎖医学 人種差 翻訳後修飾解析

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症 (IgAN; IgA nephropathy) は、わが国の腎生検で診断される疾患の約 1/3 を占める高頻度な腎炎で、20年の経過で約 40% が末期腎不全に陥る。IgAN は既存マーカーでは診断できず腎生検でのみ確定診断される。本症は腎炎がほとんど進行しないものから、急速に腎機能が悪化する病態まで幅が広い。そのため非侵襲的診断マーカー並びに治療適応や疾患活動性を評価するマーカーの開発が求められる。我々は米国 (Novak, アラバマ大学) との共同研究において、高分解能質量分析計を用い日米 IgAN の血清 IgA1 ヒンジ部糖鎖解析を行ったところ、人種間で糖鎖構造に差異を認めた。日米 IgAN 患者共に HAA-ELISA 値は上昇を認めること、一部の糖鎖構造は日米 IgAN 患者で共通して健常者に比し増加することから、本症血清には特定の糖鎖異常を持つ IgA1 の増加が疑われた。その糖鎖構造を同定しモノクローナル抗体を作成し、簡便で精度の高い検出法を創出することで、国際間で広く使用される新規診断法を確立できると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、多人種間で正常及び IgA 腎症患者の IgA1 糖鎖構造を明らか (正常と異常の同定) とする、患者に増加する異常糖鎖構造の簡便な検出システムを構築する、検出システムの有用性を国際間で検証し、臨床・病理像との関連を明らかとし、従来の方法を超越する非侵襲的新規診断法として確立することを目的とした。

3. 研究の方法

日本人を含む 5 人種 (白人, 黒人, ヒスパニック, アジア人, 日本人) 健常者 50 名と日本人 IgA 腎症患者 20 名の血清より, IgA 抗体カラムにて IgA を精製し, 高分解能質量分析計 (LC-Q-Orbitrap-qIT MS) にて測定し, 三井情報と共同開発した GlycanAnalyzer にて糖鎖同定と半定量化を行った。糖鎖付着部位の同定は, 段階的酵素処理による脱グリコシル化を施したのちに Electron Transfer Dissociation (ETD) にて糖鎖付着部位を同定した (糖鎖解析プロトコル法について論文作成中)。概要を Fig.1. に示す。血清糖鎖異常 IgA 値 (Gd-IgA1) は, 糖鎖異常 IgA1 モノクローナル抗体である 35A12 を用いた ELISA 法にて測定した。

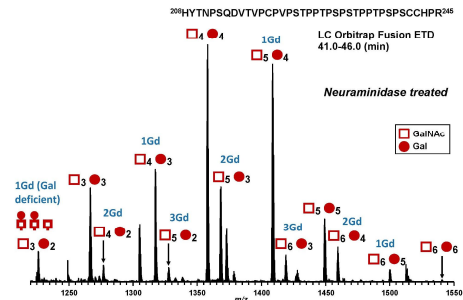
Fig. 1.



4. 研究成果

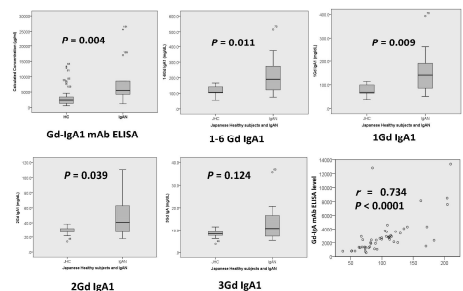
血清 Gd-IgA1 値は IgA 腎症患者で健常人に比し有意に上昇したが (P= 0.004) 健常人ではアジア人でその他人種に比しやや低い値を取ったものの有意差を認めなかった (P= 0.06)。高分解能質量分析計を用いた詳細な構造解析の一例を Fig. 2. に示す。0 結合型糖鎖は主に 3-6 個ヒンジ部に結合しており、Gal 欠損 (Gd) 糖鎖は主にその 1-3 個に認められた。

Fig. 2.



健常人でも血清 IgA1 の約 60% は Gal 欠損糖鎖を一つ以上持つことが明らかとなり、日本人, アジア人で Gal 欠損糖鎖の割合が増加した。人種間で有意に増減する糖鎖構造は認めなかった。IgAN 患者では健常者に比し有意に血清中に Gd を持つ IgA1 が増加していた。さらに血清 Gd-IgA1 値と有意に相関する糖鎖構造を同定した (Fig. 3.)

Fig. 3.



異常糖鎖付着部位は段階的酵素処理による脱グリコシル化後に ETD MS/MS にて同定し、異常糖鎖はランダムではなくある特定部位に付着することを明らかとした。この異常糖鎖部位を効率よく迅速に検出するシステムの開発を進めている。

本研究は初めて人種間の糖鎖構造の差異を検討し、IgAN で特徴的に増加する糖鎖構造を同定した。この糖鎖構造を検出することで IgAN の非侵襲的な診断法につながると考えられる。

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 6 件)

- 1) Novak J, Rizk D, Takahashi K, Zhang X, Bian Q, Ueda H, Ueda Y, Reilly C, Lai LY, Hao C, Novak L, Huang ZQ, Renfrow MB, Suzuki H, Julian BA. New Insights into the Pathogenesis of IgA Nephropathy. *Kidney Dis (Basel)*. 2015;1:8-18.
- 2) Serino G, Pesce F, Sallustio F, De Palma G, Cox SN, Curci C, Zaza G, Lai KN, Leung JC, Tang SC, Papagianni A, Stangou M, Goumenos D, Gerolymos M, Takahashi K, Yuzawa Y, Maruyama S, Imai E, Schena FP. In a retrospective international study, circulating miR-148b and let-7b were found to be serum markers for detecting primary IgA nephropathy. *Kidney Int*. 2016;89:683-92.
- 3) Yuzawa Y, Yamamoto R, Takahashi K, Katafuchi R, Tomita M, Fujigaki Y, Kitamura H, Goto M, Yasuda T, Sato M, Urushihara M, Kondo S, Kagami S, Yasuda Y, Komatsu H, Takahara M, Harabuchi Y, Kimura K, Matsuo S. Evidence-based clinical practice guidelines for IgA nephropathy 2014. *Clin Exp Nephrol*. 2016;20:511-35
- 4) Haas M, Verhave JC, Liu ZH, Alpers CE, Barratt J, Becker JU, Cattran D, Cook HT, Coppo R, Feehally J, Pani A, Perkowska-Ptasinska A, Roberts IS, Soares MF, Trimarchi H, Wang S, Yuzawa Y, Zhang H, Troyanov S, Katafuchi R. A Multicenter Study of the Predictive Value of Crescents in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28:691-701.
- 5) Kondo A, Takahashi K, Mizuno T, Kato A, Hirano D, Yamamoto N, Hayashi H, Koide S, Takahashi H, Hasegawa M, Hiki Y, Yoshida S, Miura K, Yuzawa Y. The Level of IgA Antibodies to Endothelial Cells Correlates with Histological Evidence of Disease Activity in Patients with Lupus Nephritis. *PLoS One*. 2016;11:e0163085
- 6) Kondo A, Takahashi K, Yamaguchi H, Yoshida Y, Mizuno T, Nakajima K, Hayashi H, Koide S, Inaguma D, Hasegawa M, Hiki Y, Yuzawa Y. Mass spectrometry-based approach for development of biomarkers in IgA nephropathy: a pilot trial. *Fujita Medical Journal*. 2018;4:36-41.

[学会発表](計 18 件)

国内学会

- 1) 湯澤由紀夫. 総会長主導企画 1: IgA 腎症

の診断と治療の UP TO DATE 2. Oxford 分類改訂の方向性とポイント. 第 58 回日本腎臓学会学術大会 (招待講演)

- 2) 高橋 和男, 水野 智博, 尾之内 高慶, 秋山 真一, 林 宏樹, 小出 滋久, 佐藤 和一, 長谷川 みどり, 日下 守, 永松 正, 堤 寛, 丸山 彰一, 比企 能之, 北村博司, 人見 清隆, 湯澤 由紀夫. IgA 腎症のメサングウム組織トランスグルタミナーゼ活性は糖鎖異常 IgA1 と独立して疾患活動性と関連する. 第 58 回日本腎臓学会学術大会
- 3) 高橋 和男, 近藤 亜矢子, 水野 智博, 秋山 真一, 林 宏樹, 小出 滋久, 佐藤 和一, 長谷川 みどり, 比企 能之, 湯澤 由紀夫. 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 回日本腎臓学会学術大会
- 4) 高橋 和男, 水野 智博, 尾之内 高慶, 秋山 真一, 日下 守, 永松 正, 堤 寛, 丸山 彰一, 比企 能之, 北村 博司, 人見 清隆, 湯澤 由紀夫. 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. 第 52 回日本臨床分子医学会学術集会
- 5) 高橋和男, 加藤彰浩, 比企能之, 吉田祐理, 水野智博, 山口央輝, 林宏樹, 小出 滋久, 長谷川みどり, Renfrow Matthew B., Novak Jan, 湯澤由紀夫. 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. 第 59 回日本腎臓学会学術総会
- 6) 大山友香子, 高橋和男, 山口央輝, 加藤 彰浩, 松下祥子, 吉田祐理, 水野智博, 深町幸宏, 横井靖人, 中嶋和紀, 比企能之, 湯澤由紀夫. 段階的脱グリコシル化法を用いた正常人 IgA1 O 結合型糖鎖構造の人種間比較. 日本プロテオーム学会 2017.
- 7) 大山友香子, 高橋和男, 山口央輝, 加藤 彰浩, 松下祥子, 吉田祐理, 水野智博, 深町幸宏, 横井靖人, 中嶋和紀, 比企能之, 湯澤由紀夫. 段階的脱グリコシル化法を用いた正常人 IgA1 O 結合型糖鎖構造の人種間比較. 第 42 回日本医用マススペクトル学会年会
- 8) 高橋和男, 湯澤由紀夫. 腎疾患におけるプロテオーム解析を用いたバイオマーカー開発とその展望. 第 61 回日本腎臓学会学術総会 (シンポジウム)
- 9) 大山友香子, 高橋和男, 山口央輝, 松下 祥子, 中嶋和紀, 林宏樹, 小出滋久, 稲熊大城, 長谷川みどり, 比企能之, 湯澤 由紀夫. 健常人 IgA1 糖鎖構造人種間比較. 第 61 回日本腎臓学会学術総会

国際学会

- 1) Kazuo Takahashi, Tomohiro Mizuno, Takanori Onouchi, Shin'ichi Akiyama, Hideki Tatsukawa, Mamoru Kusaka, Tadashi Nagamatsu, Yutaka Tsutsumi,

- Shoichi Maruyama, Hiroshi Kitamura, Jan Novak, Kiyotaka Hitomi, Yukio Yuzawa. Detection of Mesangial Tissue Transglutaminase Activity in Human Kidney Biopsy Specimens. Kidney Week 2015 (ASN)
- 2) Akihiro Kato, Kazuo Takahashi, Tomohiro Mizuno, Stacy D. Hall, Yoshiyuki Hiki, Kiyotaka Hitomi, Jan Novak, Yukio Yuzawa. Expression of Mesangial Tissue Transglutaminase Is Independent of Aberrantly Glycosylated IgA in Patients with IgA Nephropathy. Kidney Week 2015 (ASN)
 - 3) Kato A, Mizuno T, Takahashi K, Yoshida Y, Tatsukawa H, Mizuno M, Hitomi K, Yuzawa Y. Elucidation of the Roles of Tissue Transglutaminase in Mesangial Proliferative Glomerulonephritis. Kidney Week 2016
 - 4) Kazuo Takahashi, Hisateru Yamaguchi, Yukako Ohyama, Akihiro Kato, Tomohiro Mizuno, Yoshiyuki Hiki, Matthew B. Renfrow, Jan Novak, Yukio Yuzawa. Comprehensive Analysis of IgA1 Hinge-Region O-Glycoforms in Patients with IgA Nephropathy. Kidney Week 2016
 - 5) Takahashi K, Mizuno T, Onouchi T, Yoshida Y, Ohyama Y, Akiyama S, Tatsukawa H, Hiki Y, Kusaka M, Nagamatsu T, Tsutsumi Y, Maruyama S, Kitamura H, Novak J, Hitomi K, Yuzawa Y. Mesangial Tissue Transglutaminase Activity in Patients with IgA Nephropathy: Implications for the Pathogenesis. International IgA Nephropathy Symposium 2016
 - 6) Takahashi K, Yamaguchi H, Ohyama Y, Kato A, Yoshida Y, Mizuno T, Hiki Y, Renfrow MB, Novak J, Yuzawa Y. Comprehensive analysis of IgA1 hinge-region O-glycoforms by a sequential deglycosylation protocol. International IgA Nephropathy Symposium 2016
 - 7) Yukako Ohyama, Kazuo Takahashi, Shoko Matsushita, Hisateru Yamaguchi, Kazuki Nakajima, Tomohiro Mizuno, Hiroki Hayashi, Shigehisa Koide, Daijo Inaguma, Midori Hasegawa, Jan Novak, Yoshiyuki Hiki, Yukio Yuzawa. Racial Comparison of IgA1 Hinge-Region O-Glycoforms by High-Resolution Mass Spectrometry. Kidney Week 2017
 - 8) Kazuo Takahashi, Hisateru Yamaguchi, Yukako Ohyama, Akihiro Kato, Shoko Matsushita, Yuri Yoshida, Tomohiro Mizuno, Yukihiko Fukamachi, Yasuto Yokoi, Yoshiyuki Hiki, Matthew B. Renfrow, Jan Novak, Yukio Yuzawa.

Comprehensive high-throughput analysis of IgA1 O-glycoforms by a sequential deglycosylation protocol. 16th Human Proteome Organisation World Congress.

- 9) Yukako Ohyama, Kazuo Takahashi, Shoko Matsushita, Hisateru Yamaguchi, Kazuki Nakajima, Tomohiro Mizuno, Hiroki Hayashi, Shigehisa Koide, Daijo Inaguma, Midori Hasegawa, Matthew B. Renfrow, Jan Novak, Yoshiyuki Hiki, Yukio Yuzawa. Analysis of IgA1 hinge-region O-glycoforms of multiracial healthy subjects by mass spectrometry. ISN Frontiers Meeting 2018

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Kazuo Takahashi, Ryohei Yamamoto, Yukio Yuzawa. Pathogenesis and Treatment in IgA Nephropathy. Springer. 2016

〔その他〕

藤田保健衛生大学医学部腎内科学 IgA 腎症研究グループ

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

6. 研究組織

- (1)研究代表者
湯澤 由紀夫 Yukio Yuzawa
(藤田保健衛生大学医学部・腎内科学・教授)
研究者番号：00191479
- (2)研究分担者
高橋和男 Kazuo Takahashi
(藤田保健衛生大学・医学部・講師)
研究者番号：90631391
比企 能之 Yoshiyuki Hiki
(藤田保健衛生大学医学部・腎内科学・客員教授)
研究者番号：20156566
秋山 真一 Shin'ichi Akiyama
(名古屋大学大学院医学系研究科・腎臓内科学・特任講師)
研究者番号：20500010
長谷川みどり Midori Hasegawa
(藤田保健衛生大学医学部・腎内科学・教授)
研究者番号：40298518

(3)研究協力者

米国：

Jan Novak 教授 (University of Alabama at Birmingham)

Matthew B. Renfrow 准教授 (University of Alabama at Birmingham)

伊国：

Francesco Paolo Schena 教授 (University of Bari)