

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19590931

研究課題名 (和文) IgA 腎症における糖鎖不全 IgA1 産生に対する黄色ブドウ球菌膜蛋白抗原の関与

研究課題名 (英文) The association between production of under-O-glycosylated IgA1 in the patient with IgA nephropathy and the staphylococcal cell membrane antigen

研究代表者

清水 芳男 (SHIMIZU YOSHIO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50359577

研究成果の概要 (和文)：

- ① メチシリン抵抗性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 感染後腎炎の原因候補抗原の組換え蛋白を作製し、培養メサンギウム細胞と反応させたところ、メサンギウムの増殖に関し、正・負の両者のシグナルを Toll-like レセプターを介して伝達することを見出した。
- ② Fc α / μ レセプター (Fc α / μ R) は、IgA・IgM に対する高親和性 Fc レセプターである。Fc α / μ R トランスフェクタントにより、患者血清中の多量体 IgA を捕捉し、ヒンジ部 O-結合型糖鎖を標識レクチンで染色し、フローサイトメトリーにて解析する系を開発した。

研究成果の概要 (英文)：

- ① Staphylococcal cell membrane antigen, a possible antigen in post-MRSA infection glomerulonephritis and IgA nephropathy, interacts directly with mesangial cells

Background: The staphylococcal cell membrane antigen (GenBank accession number: BAB41819.1) is a possible antigen involved in post-MRSA infection GN and IgA nephropathy². Since Toll-like receptors (TLRs) activate the host innate immune response to recognize components common to a range of bacteria, the clinical findings suggest that the staphylococcal cell membrane antigen interacts directly with intrinsic cells of the kidney via TLRs.

Methods: Mouse mesangial cells (ATCC: CRL-1927) were mixed with purified FLAG-tagged staphylococcal cell membrane antigen under various conditions and stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-FLAG antibody. Cellular attachment of the FLAG-tagged antigen was analyzed by flow cytometry. The cells were also cultured with or without anti-mouse TLR2 or TLR4 IgG antibody, and the growth stimulation effect of the antigen on these cells was determined using ELISA based on bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation. Genomic DNA obtained from mesangial cells after incubation with or without staphylococcal cell membrane antigen was analyzed by electrophoresis.

Results: Attachment of staphylococcal cell membrane antigen to cultured mesangial cells occurred in the exponential growth phase, whereas supraconfluent cells did not interact with the antigen. Incubation of the mesangial cells with the antigen at 37°C for 15 minutes resulted in higher fluorescence intensity in flow cytometry, when compared with incubation at 4°C. Treatment with a low dose of recombinant staphylococcal cell membrane antigen in the absence of anti-TLR antibodies did not accelerate incorporation of BrdU by the mesangial cells, whereas treatment with anti-TLR antibodies attenuated BrdU incorporation. A moderate to high dose of antigen without anti-TLR antibodies also attenuated BrdU incorporation in a dose-dependent manner. Genomic DNA from mesangial cells incubated with the antigen showed fragmentation.

Conclusion: These results suggest that staphylococcal cell membrane antigen interacts with mesangial cells directly and transmits weak growth acceleration signals via TLRs and inhibitory signals via an apoptotic pathway.

② A novel analysis of under-O-glycosylated IgA1 in IgA nephropathy

Aberrant glycosylation of IgA1 plays an essential role in the pathogenesis of IgA nephropathy(IgA-N). This abnormality is manifested by a deficiency of galactose in the hinge-region O-linked glycans of IgA1. When compared with the healthy control patients, a decrease in beta1,3-galactosyltransferase activity and an increase in N-acetylgalactosamine-specific alpha2,6-sialyltransferase activity were observed in IgA nephropathy patients. This abnormally O-glycosylated IgA1 is likely to be involved in the pathogenesis of IgA nephropathy. However, correlation between the clinical parameters, (proteinuria, hematuria, pathological findings and so on), clinical therapeutic efficacy (steroid therapy, tonsillectomy etc.) and this aberrant glycosylated IgA1 are still unclear.

The purpose of this study is to determine how this aberrant glycosylation is effected by the treatment of IgA nephropathy.

Fc α/μ receptor(Fc α/μ R) is constitutively expressed on the majority of B lymphocytes and macrophages and its human homolog, which bind both IgA and IgM with high affinity. We established a method to capture serum IgA from whole serum by mouse Fc α/μ R transfected cells. The immunoglobulin domain of Fc α/μ R which can fix IgA and IgM has marked homology for the domain of polymeric immunoglobulin receptor (poly-IgR). We also hypothesized that this system can evaluate the underglycosylation of serum polymeric IgA mainly observed in the patients' glomeruli.

BW5147 (parent) or moFc α/μ R•BW5147 transfectant was treated with normal serum. Captured IgA was detected by FITC conjugated anti-human IgA in flow cytometry. We also measured lectin binding (Helix aspersa-phycoerythrin; HA-PE) by this flow cytometry analysis. The transfectant did not bind to the monomeric IgA but bound to polymeric IgA. Observation by a confocal laser microscope revealed IgA binding of Fc α/μ R grouped on the cell surface. In the HAA-PE binding assay between patients with IgA nephropathy (n=33) and healthy controls (n=22), the patients showed significantly higher HAA-binding, indicating underglycosylation of IgA, when compared with controls.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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：IgA腎症、IgAヒンジ部O-結合型糖鎖不全、フローサイトメトリー

1. 研究開始当初の背景

IgA腎症は、本邦で最も患者数の多い慢性

糸球体腎炎であるが、原因は明らかになっておらず、根本的な治療法も確立されていない。

近年、IgA 腎症患者血清中の IgA に O-結合型糖鎖不全が存在することが明らかになった。また、我々のグループは、IgA 腎症と腎病理所見が類似する MRSA 感染後腎炎の原因抗原が黄色ブドウ球菌の膜蛋白であることを見出し、この分子を同定した。さらに、この黄色ブドウ球菌由来の膜蛋白抗原が、MRSA 腎炎のみならず、IgA 腎症患者の腎糸球体に高率な頻度で沈着していることを明らかにした。

2. 研究の目的

我々が同定した黄色ブドウ球菌膜蛋白抗原と IgA 腎症患者における糖鎖不全 IgA の生成の関係を明らかにする。

3. 研究の方法

①黄色ブドウ球菌膜蛋白抗原と培養メサンギウム細胞の反応性の検討

黄色ブドウ球菌膜蛋白抗原の組換え蛋白を作製し、培養メサンギウム細胞と反応させた。培養・反応条件の組み合わせごとに、黄色ブドウ球菌膜蛋白抗原との接着性の検討を行った。

次いで、黄色ブドウ球菌膜蛋白抗原との共培養におけるメサンギウム細胞増殖を定量するため、bromodeoxyuridine (BrdU) の細胞内取り込みを ELISA 法で検討した。さらに Toll-like receptor (TLR) 2 および 4 の関与を検討するため、上記と同様の共培養下で抗 TLR2、TLR4 抗体によるブロッキングを行い、細胞増殖に与える影響をみた。

②ヒト血清 IgA のヒンジ部 O-結合型糖鎖を解析する簡便なアッセイ系の開発と、IgA 腎症患者血清 IgA の解析

マウス T 細胞白血病株 BW5147 にレトロウイルスベクター pMX-neo によりマウス Fc α / μ レセプター (mFc α / μ R) cDNA を導入し、恒久的に mFc α / μ R を細胞表面に発現するトランスフェクタントを使用した。

このトランスフェクタントを、ヒト血清由来の単量体 IgA および初乳由来の多量体 IgA と反応させ、蛍光標識した抗ヒト IgA 抗体で染色し、フローサイトメトリーにて解析を行った。

同様に、IgA 腎症患者および健常対照者の血清と同トランスフェクタントを反応させ、蛍光標識した抗ヒト IgA 抗体ないし、不全型糖鎖に結合性の高い Helix aspersa レクチンで染色し、フローサイトメトリーによる解析を行った。

4. 研究成果

①黄色ブドウ球菌膜蛋白抗原と培養メサンギウム細胞の反応性の検討

黄色ブドウ球菌膜蛋白抗原は、培養メサンギウム細胞に対し、37°C で 30 分間反応させ

た時が最も良好でかつ濃度依存性な接着性を示した。4°C での反応では、接着が認められなかった。37°C で一時間以上の反応を行うと、細胞はアポトーシスとなった。

同様の状況下で BrdU の取り込みを計測すると、黄色ブドウ球菌膜蛋白抗原の濃度依存性に BrdU の取り込みは減弱した。さらに、抗 TLR2 および 4 抗体で TLR をブロッキングすると、BrdU の取り込みはさらに低下した。

結論：黄色ブドウ球菌膜蛋白抗原は、メサンギウム細胞と直接的に反応することが可能であり、TLR を介した弱い細胞増殖シグナルと増殖を低下させ、細胞死を誘導するシグナルの両者が細胞内に入力されることが示唆された。

②ヒト血清 IgA のヒンジ部 O-結合型糖鎖を解析する簡便なアッセイ系の開発と、IgA 腎症患者血清 IgA の解析

mFc α / μ R のトランスフェクタントは、ヒト血清由来の単量体 IgA とは結合せず、ヒト初乳由来の多量体 IgA には強力に結合した。血清と直接反応させると、血清中の多量体 IgA を選択的に捕捉することが可能であった。共焦点レーザー顕微鏡による観察では、トランスフェクタント膜表面に島状に mFc α / μ R が集束した状態で IgA と結合していた。

HAA レクチンにより、捕捉した多量体 IgA のヒンジ部 O-結合型糖鎖を解析すると、IgA 腎症患者血清中の多量体 IgA は健常者に比べて有意に HAA レクチンの結合性が高く、O-結合型糖鎖不全が存在することが明らかになった。

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 11 件)

①Tobino K, Shimizu Y, Miura S, Sugawara K, Takeda K, Tomino Y, MD

Severe erosive lesions in the digestive tract of patients with Henoch-Schönlein Purpura (HSP) and its impact on prognosis: Presentation of 2 cases and statistical review of adult-onset Japanese HSP. Clin Nephrol 2010, in press.

②Shimizu Y, Kamoda T, Nagata M, Yoh K, Hashimoto Y, Matsui A, Yoshikawa H, Yamagata K, Koyama A. Successful pregnancy in a female patient with congenital chloride diarrhea (CLD) and renal impairment. J Nephrol, 2009; 22: 809-13.

③Kurita N, Honda S, Usui K, Shimizu Y, Miyamoto A, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K,

Shibuya A. Identification of the Fc α /microR isoform specifically expressed in the kidney tubules. *Mol Immunol*. 2009 Feb;46(4):749-53.

④ Shimizu Y, Kaneko S, Watanabe F, Hagiwara M, Yoh K, Yamagata K, Koyama A. Difficulties in the determination of target dry weight in hemodialysis during the third trimester of pregnancy. *Dialysis & Transplantation* 2008; 37(3): 100-104.

⑤ Hagiwara M, Yamagata K, Matsunaga T, Arakawa Y, Usui J, Shimizu Y, Alita K, Nagata M, Koyama A, Zhang B, Matsunaga A, Saku K, Saito T. A novel apolipoprotein E mutation, ApoE Tsukuba (Arg 114 Cys), in lipoprotein glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 381-384

⑥ Ishigaki N, Yamamoto T, Shimizu Y, Kobayashi K, Yatoh S, Sone H, Takahashi A, Suzuki H, Yamagata K, Yamada, Shimano H. Involvement of glomerular SREBP-1c in diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364: 502-508.

⑦ Shimizu Y, Seki M, Kaneko S, Hagiwara M, Yoh K, Yamagata K, Koyama A.

Patients with IgA nephropathy respond strongly through production of IgA with low avidity against *Staphylococcus aureus*. *Contrib Nephrol*. 2007; 157: 139-43.

⑧ 清水 芳男, 富野 康日己. 抗糸球体基底膜抗体型腎炎: 治療法とアウトカムの検討. *Nephrology Frontier* 8 (2): 75-83, 2009

⑨ 清水 芳男, 富野 康日己. 抗糸球体基底膜抗体型腎炎と RPGN. *日腎会誌* 51 (2): 94-97, 2009

⑩ 合田 朋仁, 岡 寛, 後藤 博道, 佐藤 倫子, 谷本 光生, 井尾 浩章, 清水 芳男, 濱田 千江子, 堀越 哲, 富野 康日己. 血液透析患者における PanVision PS-2100 を用いた電流知覚閾値 (CPT) の検討. *透析会誌* 42 (1): 77-83, 2009

⑪ 清水 芳男, 富野 康日己

CKD の治療概要

治療 90 巻 4 号 慢性腎臓病 (CKD) 診療—透析への移行・心血管系イベント予防のために— pp1439-1444

[学会発表] (計 8 件)

① Shimizu Y, Mugitani N, Satake K, Kanamaru Y, Suzuki Y, Horikoshi S, Tomino Y. Plasmodium berghei (Pb)-Fam2 protein homolog cloned from tubule-interstitial fraction of mouse crescentic glomerulonephritis model. *American*

Society of Nephrology Renal week 2009. San Diego convention center, USA, Nov 4-9, 2009

② Satake K, Shimizu Y, Mugitani N, Suzuki Y, Horikoshi S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A, Tomino Y. a-Trap- A novel assay of under-O-glycosylated IgA1 in IgA nephropathy. *International IgA nephropathy Network* 2009, WCN 2009 Satellite Symposium. Stresa, Italy, May 26-28, 2009

③ Shimizu Y, Seki M,

Staphylococcal cell membrane antigen interacts directly with mesangial cells by transmitting growth signals through Toll-like receptors and inhibitory signals through an unknown pathway. Free communication at the XLIV ERA-EDTA Congress. Barcelona, Spain, June 21-24, 2007

④ 清水 芳男, 麦谷 望, 佐竹 健至, 鈴木 祐介, 堀越 哲, 富野 康日己
腎尿細管・間質障害関連遺伝子 Pb-Fam2 ホモログの同定と基礎的な解析
平成 21 年度老人疾患病態・治療研究センター研究発表会. 順天堂大学. 2010 年 3 月 10 日

⑤ 佐竹 健至, 清水 芳男, 麦谷 望, 鈴木 仁, 鈴木 祐介, 堀越 哲, 富野 康日己
IgA 腎症患者における多量体血清 IgA 解析系の開発. IgA 腎症研究会 2010 年 1 月 30 日.
於 東京ステーションカンファレンス

⑥ 佐竹 健至, 清水 芳男, 麦谷 望, 鈴木 祐介, 堀越 哲, 富野 康日己. IgA 腎症患者における新規解析系による IgA ヒンジ部糖鎖の研究 - 糖鎖と臨床病型の多様性と経時的変化. *日本腎臓学会総会* 東京, 2009 年 6 月 4 日

⑦ 宮沢 高幸, 室市 秀久, 竹山 玲功, 高野 香織, 清水 芳男, 小林 則善, 松岡 直樹, 富野 康日己. 回路内生理食塩水を廃棄せず血液透析を開始する妥当性の検討. 第 54 回日本透析医学会学術集会. 2009 年 6 月 5 日

⑧ 清水 芳男, 関 正則, 荒川 洋, 海老原 至, 金子 修三, 渡邊 文代, 萩原 正大, 楊 景堯, 小山 哲夫, 山縣 邦弘. 黄色ブドウ球菌膜蛋白の培養メサンギウム細胞に対する直接的影響. *日本腎臓学会総会* 浜松, 2007 年 5 月 25 日

[図書] (計 13 件)

1. Tomino Y, Shimizu Y. Antigen-Dependent mechanism of IgA nephropathy. *Recent*

advances IgA nephropathy. Lai K Eds. World scientific. 2009, p225-236.

2. 清水 芳男. 腎性貧血

今日の治療指針 51 私はこう診療している。
山口 徹、北原 光夫、福井 次矢編，
pp462-464, 2009年1月1日発行，医学書院

3. 清水 芳男 Bartter 症候群. エキスパートのための腎臓内科学 (初版)

富野 康日己編. P340-345. 2009年12月15日発行 中外医学社

4. 清水 芳男 Liddle 症候群. エキスパートのための腎臓内科学 (初版)

富野 康日己編. P346-349. 2009年12月15日発行 中外医学社

5. 清水 芳男 腎性低尿酸血症. エキスパートのための腎臓内科学 (初版)

富野 康日己編. P350-353. 2009年12月15日発行 中外医学社

6. 清水 芳男 MRSA 関連腎炎. 専門医のための腎臓病学 (第2版)

下条文武監修、内山聖・富野康日己・今井雄一編. Pp291-295. 2009年12月15日発行. 医学書院. 東京.

7. 清水 芳男

低ナトリウム (Na) 血症

チャート内科診断学, 富野 康日己編, pp259 - 262, 2009/07/10 発行, 中外医学社

8. 清水 芳男

尿色調・泡

チャート内科診断学, 富野 康日己編, pp241 - 244, 2009/07/10 発行, 中外医学社

9. 清水 芳男

低カリウム (K) 血症

チャート内科診断学, 富野 康日己編, pp265-268, 2009/07/10 発行, 中外医学社

10. 清水 芳男

かかりつけ医での診療と腎臓専門医への紹介の要点・9「どんなときに画像診断 (エコー) を行うのですか？」 かかりつけ医と腎臓専門医のための CKD 診療ガイド I 総論: p50-52. 2009/06/05 発行, 中外医学社

11. 清水 芳男

難治性ネフローゼ症候群・6. 慢性腎臓病 (CKD) の病態生理と治療方針 CKD 進展予防ハンドブック 富野康日己編 pp142-143, フジメディカル出版 (大阪) 2009年7月10日発行

12. 清水 芳男

急速進行性糸球体腎炎 (RPGN)・6. 慢性腎臓病 (CKD) の病態生理と治療方針 CKD 進展予防ハンドブック 富野康日己編 pp144-145, フジメディカル出版 (大阪) 2009年7月10日発行

13. 清水 芳男、山縣 邦弘

抗血小板薬について. 専門医のための薬物療法 Q&A. 富野 康日己・柏原 直樹編 pp45-47, 中外医学社 2007年12月10日発行

[その他]

ホームページ等

順天堂大学医学部腎臓内科ホームページ

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/zinzo_naika/k4.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 芳男 (SHIMIZU YOSHIO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 50359577

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし