

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08691

研究課題名（和文）IgA腎症の糸球体沈着性糖鎖異常IgA1の同定と迅速診断法の臨床応用

研究課題名（英文）Identification of nephritogenic abnormally glycosylated IgA1 and its application to point of care testing

研究代表者

高橋 和男（Takahashi, Kazuo）

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：90631391

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：IgA腎症に特異的に増加する糸球体沈着性の糖鎖異常IgA1の同定とその検出によるPOCT（Point Of Care Testing）試薬の開発を試みた。高分解能質量分析計を用いて、日本人及び白人IgAN患者の血中IgA1ヒンジ部糖鎖の定量的プロファイリングを行い、IgAN特異的に増加する糖鎖構造の候補を同定した。その構造をもとにモノクローナル抗体を作成し、POCT試薬として応用する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人と白人のIgA腎症に共通のIgA1の糖鎖構造の特徴を同定した。新規診断薬の開発のみならず、糖鎖異常IgA1の産生機構の解明、さらには新規治療標的につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We aimed to develop a Point of Care Testing (POCT) by identifying detailed glycan structure of nephritogenic abnormally glycosylated IgA1 increasing specifically in IgA nephropathy (IgAN). We quantitatively profiled glycoforms of serum IgA1 derived from Japanese and Caucasian patients of IgAN and identified candidate glycoforms that are specifically increased in IgAN. We are currently generating monoclonal antibodies to specific glycoform to develop POCT.

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 質量分析 糖鎖医学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

IgAN 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。本症は腎炎が進行しない例から、急速に腎機能が悪化する病態まで幅が広く、非侵襲的診断マーカー並びに治療適応、疾患活動性を評価するマーカーの開発が求められる。

IgAN では、患者血中に糖鎖異常 IgA1 (Gd-IgA1; Gal-deficient-IgA1) が増加し、この Gd-IgA1 を中心とした免疫複合体が糸球体に沈着し腎炎を生じる。Gd-IgA1 を本症の非侵襲的バイオマーカーとして応用する試みがなされており、Gd-IgA1 を検出するモノクローナル抗体 (Gd-IgA1 mAb) として、我々の開発した 35A12 と協和発酵キリンが開発した KM55 がある。この Gd-IgA1 mAb により、IgAN 患者の糸球体 IgA 沈着部には Gd-IgA1 が疾患特異的に検出されることが報告され (Suzuki H et al. *Kidney Int.* 2018), 35A12 も同様の結果を確認した。すなわち、Gd-IgA1 の沈着は IgAN に特異的であり、糸球体沈着性 Gd-IgA1 (pathogenic IgA1) は本症発症に中心的な役割を果たすと考えられる。

Gd-IgA1 は IgAN の病因に関与しバイオマーカーとしても期待されるがその成因、沈着機序は明らかでない。その理由として、Gd-IgA1 は GalNAc 特異的レクチンである Helix Aspersa (HAA) や Gd-IgA1 mAb で検出される IgA1 の総称であり、糸球体沈着性 Gd-IgA1 の構造は不明であることが挙げられる。

既報の質量分析による糸球体沈着 IgA1 の解析では糖鎖数の減少の観察のみに留まっている。(Hiki Y. et al. *Kidney Int.* 2001), 近年の質量分析計及びプロテオミクス手法の進歩にて組織沈着タンパク質の翻訳後修飾解析が可能となり、研究代表者らが所属する藤田医科大学の高分解能質量分析計 (Orbitrap Fusion ETD) を駆使すれば、血清・沈着 IgA1 の詳細な糖鎖構造解析により真に病態に関連する pathogenic IgA1 の糖鎖構造の解明が期待できる。

2. 研究の目的

本研究は『Gd-IgA1 の役割の解明とバイオマーカー応用』を目的とし、糸球体沈着性 Gd-IgA1 の糖鎖構造の同定、前向きに採取した臨床検体を用いて Gd-IgA1 の臨床的意義の解明、新規 POCT 試薬の単独バイオマーカーへの応用、を試みた。

3. 研究の方法

研究項目 1: 糸球体沈着性 Gd-IgA1 の構造解析

IgAN 患者腎生検検体からレーザーマイクロダイセクション法 (LMD) にて糸球体を単離し IgA1 を精製後に高分解能質量分析計 (Orbitrap Fusion ETD) にて糖鎖付着部位を含めて構造決定する。

研究項目 2: Gd-IgA1 の臨床的意義の解明

白人及び日本人 IgAN の血清 IgA1 の糖鎖構造を高分解能質量分析計にて解析し、IgAN に特異的な糖鎖構造を同定する。臨床所見との関連を見ることでその意義を見出し、診断薬開発を目指す。

研究項目 3: 新規 POCT 試薬の開発と臨床評価

イムノクロマトグラフィ法を用いた POCT 試薬の開発を行う。

4 . 研究成果

血中 IgA1 ヒンジ部糖鎖の定量的プロファイリングと糖鎖修飾部位の定量的評価法を開発し論文報告した (Ohyama Y. et al. Sci Rep 10,671,2020)。この方法を用いて国際間共同研究を企画し、白人と日本人に共通する血清 IgA1 糖鎖構造を同定した。同定した糖鎖構造は腎機能と関連があることがわかった (iScience, under review)。この糖鎖構造の詳細な糖鎖付着部位を解析し、診断薬開発 A 社と POCT 試薬の開発を進めている。

当初予定した糸球体沈着 Gd-IgA1 の糖鎖構造の解析は、様々なプロトコルを検討したが、パラフィン切片から LMD で単離した糸球体から IgA1 の回収が困難であり、正確な糖鎖解析には未だ至っていない。凍結切片での条件検討を行っている。

本研究により、白人・日本人 IgAN に共通の糖鎖異常構造が明らかとなった。診断薬開発のみならず糖鎖異常の病態解明に大きな進歩をもたらし、本症の新規治療薬の開発につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohyama Yukako, Nakajima Kazuki, Renfrow Matthew B., Novak Jan, Takahashi Kazuo	4. 巻 17
2. 論文標題 Mass spectrometry for the identification and analysis of highly complex glycosylation of therapeutic or pathogenic proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Expert Review of Proteomics	6. 最初と最後の頁 275 ~ 296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14789450.2020.1769479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Stewart Tyler J, Takahashi Kazuo, Xu Nuo, Prakash Amol, Brown Rhubell, Raska Milan, Renfrow Matthew B, Novak Jan	4. 巻 -
2. 論文標題 Quantitative assessment of successive carbohydrate additions to the clustered O-glycosylation sites of IgA1 by glycosyltransferases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/glycob/cwaa111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ohyama Yukako, Yamaguchi Hisateru, Nakajima Kazuki, Mizuno Tomohiro, Fukamachi Yukihiro, Yokoi Yasuto, Tsuboi Naotake, Inaguma Daijo, Hasegawa Midori, Renfrow Matthew B., Novak Jan, Yuzawa Yukio, Takahashi Kazuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Analysis of O-glycoforms of the IgA1 hinge region by sequential deglycosylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-57510-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Stewart Tyler J, Takahashi Kazuo, Whitaker Robert H, Raska Milan, Placzek William J, Novak Jan, Renfrow Matthew B	4. 巻 29
2. 論文標題 IgA1 hinge-region clustered glycan fidelity is established early during semi-ordered glycosylation by GalNAc-T2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 543 ~ 556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/glycob/cwz007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Zachova Katerina, Jemelkova Jana, Kosztu Petr, Ohyama Yukako, Takahashi Kazuo, Zadrazil Josef, Orsag Jiri, Matousovic Karel, Galuszkova Dana, Petejova Nadezda, Mestecky Jiri, Raska Milan	4. 巻 33
2. 論文標題 Galactose-Deficient IgA1 B cells in the Circulation of IgA Nephropathy Patients Carry Preferentially Lambda Light Chains and Mucosal Homing Receptors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 908 ~ 917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2021081086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 大山友香子、山口央輝、Francesco P. Schena、坪井直毅、高橋和男
2. 発表標題 IgA1ヒンジ部O結合型糖鎖構造の人種間比較(日本人-ギリシャ人)
3. 学会等名 第44回 IgA腎症研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukako Ohyama, Samantha Chiurlia, Sharon N. Cox, Nikoletta Maria Kouri, Maria J Stangou, Hisateru Yamaguchi, Kazuki Nakajima, Daijo Inaguma, Midori Hasegawa, Yukio Yuzawa, Naotake Tsuboi, Aikaterini A. Papagianni, Francesco P. Schena, Kazuo Takahashi
2. 発表標題 Racial heterogeneity of IgA1 hinge region O glycoforms in patients with IgA nephropathy
3. 学会等名 ASN kidney week 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukako Ohyama, Hisateru Yamaguchi, Kazuki Nakajima, Daijo Inaguma, Midori Hasegawa, Naotake Tsuboi, Matthew B Renfrow, Jan Novak, Yukio Yuzawa, Kazuo Takahashi
2. 発表標題 Longitudinal changes of IgA1 O-glycoforms in IgA nephropathy
3. 学会等名 57th ERA-EDTA (国際学会)
4. 発表年 2020年

1 . 発表者名 Kazuo Takahashi
2 . 発表標題 Molecular Characterization of IgA1 in Patients with IgA Nephropathy
3 . 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Yukako Ohyama, Hisateru Yamaguchi, Kazuki Nakajima, Hiroki Hayashi, Shigehisa Koide, Daijo Inaguma, Midori Hasegawa, Matthew B. Renfrow, Jan Novak, Yoshiyuki Hiki, Naotake Tsuboi, Yukio Yuzawa, Kazuo Takahashi.
2 . 発表標題 Quantitative assessment of sites with galactose deficient O-glycans in the hinge region of IgA1.
3 . 学会等名 Kidney Week 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Nikoletta-Maria Kouri, Maria Stangou, Samantha Chiurlia, Sharon Natasha Cox, Yukako Ohyama, Kazuo Takahashi, Aikaterini Papagianni, Francesco Paolo Schena.
2 . 発表標題 Validation study of KM55 ELISA Kit in IgA Nephropathy IgAN patients for the detection of galactosedeficient IgA1 (Gd-IgA1) and corticosteroid therapy monitoring.
3 . 学会等名 Kidney Week 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Yukako Ohyama, Kazuo Takahashi, Hisateru Yamaguchi, Shoko Matsushita, Kazuki Nakajima, Naotake Tsuboi, Inaguma Daijo, Hasegawa Midori, Matthew B Renfrow, Jan Novak, Yoshiyuki Hiki, Yuzawa Yukio.
2 . 発表標題 Comparison of IgA1 hinge-region O-glycoforms between patients with IgA nephropathy and healthy subjects.
3 . 学会等名 ERA-EDTA 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 大山友香子, 高橋和男, 松下祥子, 山口央輝, 中嶋和紀, Matthew B. Renfrow, Jan Novak, 比企能之, 湯澤由紀夫
2. 発表標題 IgA1ヒンジ部O結合型糖鎖構造の患者健常者比較
3. 学会等名 第42回IgA症研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大山友香子, 高橋和男, 山口央輝, 松下祥子, 伊藤辰将, 中嶋和紀, 林宏樹, 小出滋久, 坪井直毅, 稲熊大城, 長谷川みどり, 湯澤由紀夫.
2. 発表標題 IgA1ヒンジ部O結合型糖鎖構造とGd-IgA値の患者健常者比較
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大山友香子, 高橋和男, 山口央輝, 松下祥子, 伊藤辰将, 中嶋和紀, 林宏樹, 小出滋久, 坪井直毅, 稲熊大城, 長谷川みどり, 湯澤由紀夫
2. 発表標題 質量分析法を用いたIgA結合タンパク質のIgA腎症治療前後比較
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大山友香子, 松下祥子, 山口央輝, 中嶋和紀, 坪井直毅, 高橋和男, 湯澤由紀夫
2. 発表標題 IgA腎症におけるPathogenic IgA1の構造同定の試み
3. 学会等名 第10回分子腎フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤辰将、辰川英樹、山口央輝、高橋和男、人見清隆、湯澤由紀夫
2. 発表標題 糸球体腎炎に関わるタンパク質架橋化酵素の機能解明に向けた基礎的研究
3. 学会等名 第62回腎臓学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

藤田医科大学医学部解剖学II https://www.fujita-hu.ac.jp/faculty/medicine/department/anatomyii.html https://fujitabms.wordpress.com/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	湯澤 由紀夫 (Yuzawa Yukio) (00191479)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究分担者	坪井 直毅 (Tsuboi Naotake) (50566958)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------