

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月16日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790800

研究課題名（和文）IgA腎症におけるメサンギウム細胞へのIgA沈着メカニズムの解明と治療への応用

研究課題名（英文）Mechanism of IgA deposition in mesangial cells in IgA nephropathy and application for therapy

研究代表者

金子 佳賢 (KANEKO YOSHIKATSU)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：80444157

研究成果の概要（和文）：IgA腎症は原発性糸球体腎炎のなかでは最も多くみられる病型であり、腎糸球体構成細胞であるメサンギウム細胞への免疫グロブリン A1(IgA1)の沈着を特徴とする。しかし IgA1 がどのような機序によりメサンギウム細胞に沈着するかは不明な点もあった。そこで IgA1 をプローブとしてメサンギウム細胞上の受容体の同定を試みたところ、インテグリン $\alpha1/\beta1$ ならびに $\alpha2/\beta1$ ヘテロダイマーがIgA1との結合に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Immunoglobulin A nephropathy (IgAN) is the most common form of primary glomerulonephritis and is characterized by glomerular mesangial IgA1 deposition, however, precise mechanism of IgA1 deposition are still unclear. The aim of the present study is to identify the receptor for IgA1 in mesangial cells using IgA1 probe, and integrin $\alpha1/\beta1$ and $\alpha2/\beta1$ heterodimer was identified as the receptors for IgA1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：腎臓学

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は最も多くみられる病型であり、末期腎不全に至る主要な原疾患の一つである。本症は腎糸球体構成細胞であるメサンギウム細胞への免疫グロブリン A1(IgA1)の沈着とメサンギウム細胞の増殖およびメサンギウム基質の増加を特徴とし、ヒンジ領域の糖鎖にガラクトースを欠損した糖鎖不全 IgA 1 が関与すると考えられているが、IgA1 がどのような機序によりメサンギウム細胞に沈着するかは必ずし

も明らかにされておらず、そのため根本的な治療法がまだ開発されていない状況である。これまでメサンギウム細胞上の受容体として候補にあがった分子としては Fc α 受容体、多価免疫グロブリン受容体、アジアロ糖蛋白受容体があるが、これら分子はメサンギウム細胞での発現は確定していない。トランスフェリン受容体もこれまで IgA の受容体として候補にあがっており、IgA との結合は抗トランスフェリン受容体抗体や可溶性トランスフェリン受容体によりブロックされるもの

の、その阻害効果は完全なものではなく、他に受容体が存在する可能性も示唆される。よって、メサンギウム細胞上の IgA1 受容体を同定することにより、IgA 腎症の発症、進展機序の解明につながるだけではなく、その結合を阻害することによって IgA 腎症に特異的、根本的な治療法の開発が期待される。

2. 研究の目的

どのような条件下で IgA1 のメサンギウム細胞への結合が促進するかを、各種サイトカインや増殖因子を用いてスクリーニングを行い、これらの条件間における発現遺伝子の解析を行うことによって、ヒトメサンギウム細胞上の IgA1 受容体の同定を行い、さらに実臨床で IgA 腎症患者から得られた腎生検組織を用いてその受容体の発現を検証するとともに、IgA1 と受容体の結合を防ぐことによって IgA 腎症の根本的治療法の開発へと発展させる可能性を呈することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 通常の糖鎖を持つ IgA1 の他、糖分解酵素を用いてヒンジ領域糖鎖最外端のシアル酸ならびにシアル酸とガラクトースの両者を欠損した糖鎖不全 IgA1 を作成し、これらを用いて FITC を標識した IgA1 をプローブとして作成し、培養ヒトメサンギウム細胞と FITC 標識 IgA1 との結合を、各種サイトカインや増殖因子存在下の培養条件にてスクリーニングし、IgA1 受容体が発現増強する条件を検討した。

(2) IgA1 受容体が発現増強する培養条件および、通常状態で培養したヒトメサンギウム細胞を対象とし、DNA アレイを用いた網羅的発現遺伝子解析を行って受容体候補遺伝子を同定した。

(3) 上記で同定した受容体の分布を、受容体に特異的な抗体を用いることでヒト IgA 腎症患者の腎生検から得られた凍結切片の組織上で確認し、さらに沈着している IgA1 の分布との整合性を、蛍光顕微鏡を用いて比較検討した。

(4) 培養メサンギウム細胞を界面活性剤によって溶解させ、細胞成分と biotin 標識 IgA1 を反応させた後に、上記で同定した受容体に対する特異抗体を用いて免疫沈降し、IgA1 と複合体を形成して共沈するか否かを、免疫沈降物に対する Western blot 法にて比較検討した。

(5) 培養メサンギウム細胞に、上記で同定した受容体に対する特異的な siRNA をリポフ

ェクション法にて導入し、FITC 標識 IgA1 との結合の変化をフローサイトメトリー法にて定量し、比較検討した。

4. 研究成果

(1) 通常の糖鎖を持つ IgA1 と比較して、シアル酸欠損 IgA1 およびシアル酸・ガラクトース欠損 IgA1 はより多く培養ヒトメサンギウム細胞に結合することがわかったが、シアル酸欠損 IgA1 とシアル酸・ガラクトース欠損 IgA1 の間に違いはなかった。また、TNF- α および TGF- β 1 の存在下で培養することにより、ヒトメサンギウム細胞に IgA1 の受容体が誘導され、さらにデキサメタゾンの添加により、この IgA1 受容体の誘導作用が打ち消されることが明らかとなった。この作用は単クローン性 IgA1、多クローン性 IgA1 に共通してみられ、また通常の糖鎖を持つ IgA1、シアル酸欠損 IgA1 およびシアル酸・ガラクトース欠損 IgA1 のすべてのタイプの IgA1 で共通してみられた。

(2) TNF- α もしくは TGF- β 1 添加、およびこれらにさらにデキサメタゾンを添加した条件と対照の 5 種類の培養条件にてヒトメサンギウム細胞を培養し、抽出した RNA を用いた網羅的発現遺伝子解析の結果から、インテグリン β 1 遺伝子が TNF- α および TGF- β 1 刺激で発現増強し、デキサメタゾンの添加によりこの発現増強が打ち消されることが明らかとなった。

(3) インテグリン β 1 鎖は数種類の α 鎖とヘテロダイマーを形成するが、ヒト IgA 腎症患者の腎生検組織上の分布を沈着 IgA1 の分布と比較した結果から、インテグリン α 1/ β 1 ならびに α 2/ β 1 ヘテロダイマーが IgA1 との結合に関与していると考えられた。

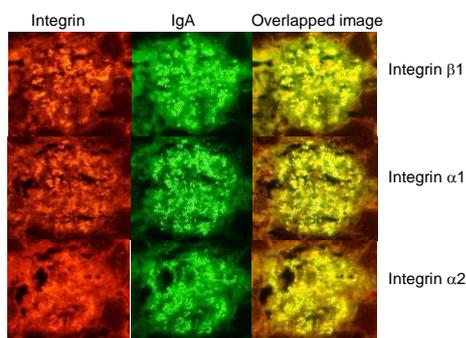
インテグリンヘテロダイマーはマンガンイオンの存在下で立体構造を変化させ、リガンドとの親和性を増強させる性質を持つ。培養ヒトメサンギウム細胞も事前にマンガンイオンと反応させることにより、標識 IgA1 との結合がマンガンイオン濃度依存的に促進されることが明らかとなり、IgA1 の結合にインテグリンヘテロダイマーが関与している可能性が示唆された。

また、インテグリン α 1/ β 1 ならびに α 2/ β 1 ヘテロダイマーは細胞外基質であるコラーゲンと結合能を有するが、標識 IgA1 を事前にコラーゲンと反応させることにより、培養ヒトメサンギウム細胞との結合が、コラーゲン濃度依存的に促進されることが明らかとなった。フィブロネクチンやラミニンなどの細胞外基質ではこの作用はみられなかった。

コラーゲンにはいくつかのサブタイプが存在するが、ヒト IgA 腎症の腎生検組織を用い

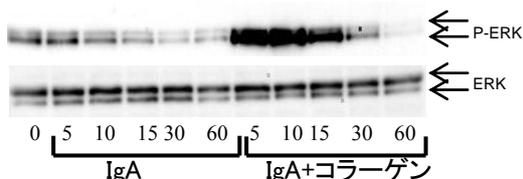
た検討では、腎系球体に IgA とともに分布するコラーゲンは type IV であり、IgA1 が type IV コラーゲンと複合体を形成してメサンギウム細胞に沈着する可能性も示唆された。さらに、インテグリン $\alpha1/\beta1$ ならびに $\alpha2/\beta1$ ヘテロダイマーは基質との結合により細胞内情報伝達を行い、細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) をリン酸化する作用がある。IgA1 との反応だけでは培養ヒトメサンギウム細胞内の ERK のリン酸化は変化を生じないが、IgA1 とコラーゲンとを反応させた後で培養ヒトメサンギウム細胞に添加した場合には、細胞内の ERK のリン酸化が増強されることが示され、IgA1 とコラーゲンとの共同作用により腎系球体内でメサンギウム細胞の増殖が促進されている可能性が示唆された。

図：IgA 腎症患者腎生検組織におけるインテグリン $\alpha1$, $\alpha2$, $\beta1$ と IgA1 との分布の一致



インテグリン $\alpha1$, $\alpha2$, $\beta1$ と IgA1 との分布はほぼ一致している。

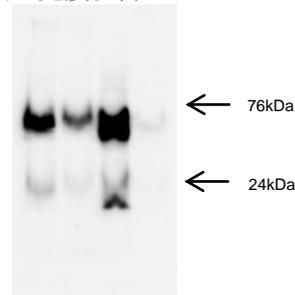
図：IgA+コラーゲンによる ERK のリン酸化



IgA+コラーゲンとの共培養により、培養ヒトメサンギウム細胞内の ERK がリン酸化される(P-ERK)。

(4) 培養ヒトメサンギウム細胞を溶解させ、細胞成分を biotin 標識 IgA1 とともに反応させた後に、インテグリン $\alpha1$, $\alpha2$, および $\beta1$ に対する特異抗体を用いて免疫沈降させ、沈降物を用いて Western blot にて biotin 標識 IgA1 の検出を試みた結果、いずれの抗体を用いた際にも biotin 標識 IgA1 が検出され、インテグリン $\alpha1/\beta1$ ならびに $\alpha2/\beta1$ ヘテロダイマーが IgA1 と複合体を形成する可能性が示された。

図：免疫沈降



① ② ③ ④
 レーン①: 抗インテグリン $\alpha1$ 抗体、レーン②: 抗インテグリン $\alpha2$ 抗体、レーン③: 抗インテグリン $\beta1$ 抗体、レーン④: アイソタイプ IgG にて免疫沈降を行い、抗 biotin 抗体を用いて共沈した biotin 標識 IgA1 を検出した。

(5) 培養ヒトメサンギウム細胞にインテグリン $\alpha1$, $\alpha2$, および $\beta1$ に特異的な siRNA を導入し、フローサイトメトリー法にて FITC 標識 IgA1 との結合を確認したところ、これらインテグリンをノックダウンした細胞では IgA1 の結合が有意に低下した。なお、トランスフェリン受容体特異的 siRNA を導入した時にはトランスフェリン受容体の発現量は低下するにも関わらず、IgA1 の結合には変化がみられなかった。また、インテグリン $\alpha1$, $\alpha2$, および $\beta1$ 特異的 siRNA による IgA1 結合能低下は、siRNA を導入した培養ヒトメサンギウム細胞をマンガンイオンで処理した場合にも同様に認められた。これらの結果から、培養ヒトメサンギウム細胞と IgA1 の結合はインテグリン $\alpha1/\beta1$ ならびに $\alpha2/\beta1$ ヘテロダイマー依存的であると考えられた。

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 1 件)

- ① Yoshikatsu Kaneko, Tadashi Otsuka, Yohei Tsuchida, Fumitake Gejyo, Ichiei Narita: Integrin $\alpha1/\beta1$ and $\alpha2/\beta1$ as a receptor for IgA1 in human glomerular mesangial cells in IgA nephropathy. *Int Immunol* 24, 219-232, 2012 (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① 金子佳賢, 土田陽平, 下条文武, 成田一衛: メサンギウム細胞上の糖鎖不全 IgA1 受容体候補としての integrin $\alpha2/\beta1$. 第 54 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2011 年 6 月 (査読有)
- ② Yoshikatsu Kaneko, Takeshi Takeda, Yohei Tsuchida, Ichiei Narita: Integrin $\alpha2/\beta1$ as a novel galactose-deficient IgA1 receptor on human mesangial cells. 2011 World

Congress of Nephrology, Vancouver,
Canada, April 2011 (査読有)

- ③ 金子佳賢, 土田陽平, 成田一衛: 糖鎖不全 IgA に対するメサンギウム細胞上受容体の探索. 第 53 回日本腎臓学会学術総会, 神戸, 2010 年 6 月 (査読有)
- ④ Yoshikatsu Kaneko, Yohei Tsuchida, Ichiei Narita: Receptor for IgA1 with galactose-deficient O-linked glycans on human mesangium cells. ISN Nexus Simposia, Kyoto, Japan, April 2010 (査読有)
- ⑤ 金子佳賢, 成田一衛, 下条文武: 糖鎖不全 IgA に対するメサンギウム細胞上受容体の同定. 第 52 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2009 年 6 月 (査読有)

[図書] (計 0 件)
該当事項なし

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称: 該当事項なし
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: 該当事項なし
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
該当事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 佳賢 (KANEKO YOSHIKATSU)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号: 80444157

(2) 研究分担者

該当事項なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者
該当事項なし ()

研究者番号: