

## 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25年 5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790643

研究課題名（和文）IgGの糖鎖異常に基づく炎症性腸疾患の基礎的病態解析から臨床への応用

研究課題名（英文）Pathophysiological analysis and clinical application of oligosaccharide alterations in inflammatory bowel disease

研究代表者

新崎 信一郎（SHINZAKI SHINICHIRO）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60546860

研究成果の概要（和文）：原因不明の難治性疾患である炎症性腸疾患のIgG糖鎖異常に着目し、糖鎖異常が腸管炎症に及ぼす影響や、糖鎖異常のIgGを産生するB細胞の腸炎への関与について基礎的検討を行うとともに、臨床応用を目指し、糖鎖異常と治療効果、疾患予後との関係を明らかにする研究を遂行した。

研究成果の概要（英文）：Focused on the increase in agalactosyl IgG in patients with inflammatory bowel disease (IBD), the pathophysiological roles of oligosaccharide alterations on immunoglobulin and immune cells were investigated using colitis model. For clinical application, the relationship between oligosaccharide alterations and patient characteristics in IBD patients were also clarified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：下部消化管学（小腸、大腸）

## 1. 研究開始当初の背景

原因不明の難治性疾患である**炎症性腸疾患のIgG糖鎖異常**に着目し、  
 ・糖鎖異常が腸管炎症に及ぼす影響や、  
**糖鎖異常のIgGを産生するB細胞の腸炎への関与**について基礎的検討を行う。  
 ・臨床応用を目指し、**糖鎖異常と治療効果、疾患予後との関係**を明らかにする。

## 2. 研究の目的

## ① 研究の学術的背景

炎症性腸疾患は大きくクローン病と潰瘍性大腸炎に大別される、腸管に慢性・再発性の炎症を引き起こす原因不明の難治性疾患である。本邦での患者数は年々増加し、人口の0.1%、すなわち約12万人が炎症性腸疾患患者として登録されている。若年・青年に好発し、働き盛り世代の生活の質（QOL）を奪うばかりでなく、長期入院や自宅療養を余儀なくされるケースも多いことから、**社会的損失の大きい疾患**であり、その病態を解

明することは急務な問題といえる。

糖鎖は蛋白質の翻訳後修飾をなす重要な生体分子のひとつであり、核酸、蛋白質に次ぐ第3の鎖であるとされる。炎症性腸疾患の原因の一つとして、免疫学的異常が推察されているが、近年の糖鎖解析技術の進歩により、自己免疫疾患や悪性腫瘍など、様々な疾患に糖鎖が関与することが明らかとなってきた。IgGを始めとした免疫グロブリンにも糖鎖が結合していることから、最近、申請者は、炎症性腸疾患患者の血清 IgG に着目して、その糖鎖構造を高速液体クロマトグラフィーで詳細に解析した。その結果、IgG 糖鎖の基部にフコースが結合したフコシル化糖鎖において、健常者に比してガラクトースが著明に減少すること、そしてこのガラクトース欠損 IgG が、炎症性腸疾患の有用な診断・予後予測マーカーとなりうることを見いだした(Am J Gastroenterol 2008;103(5):1173-81)。

#### <炎症性腸疾患と IgG 糖鎖異常>

炎症性腸疾患に対する免疫グロブリン大量療法の有効性が以前から報告されている (Am J Gastroenterol 1992;87:91-100) ことや、インフリキシマブといった IgG 型の各種抗体製剤がすでに臨床応用されていることから、IgG の免疫学的活性を制御することは非常に重要であると考えられる。近年、IgG に結合するシアル酸やフコースなどの糖鎖が、炎症に対して保護的に作用することが、動物モデルでの検討で報告されてきている (Science 2008;320:373-6, J Biol Chem 2003;278(5):3466-73)。しかし、ガラクトースに関しては、欠損により炎症を惹起させるという報告 (Pathol Int. 2001;51(12):909-15) がある一方、炎症には関与しないという報告もあり (Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:6123-7)、ガラクトース欠損 IgG の機能や制御については明らかではない。また、ガラクトース欠損 IgG の程度が、治療介入により変化するのかについても不明である。このため、本研究ではこれまでの研究成果を進展させ、IgG 糖鎖異常、特にガラクトース欠損が腸管炎症におよぼす影響を検討し、糖鎖による炎症性腸疾患の新しい病態解明を目指す。

#### <炎症性腸疾患と B 細胞>

IgG の産生源である B 細胞のうち、腸間膜リンパ節に存在する B 細胞が、マウス腸炎モデルに対して保護的な作用を持つと報告されている。その機序として、

制御性 T 細胞の活性化を介した機構が考えられている (Gastroenterology 2007;133:124-36)。しかし、糖鎖異常が B 細胞に及ぼす影響については殆ど検討されていない。近年、Epstein-Barr Virus を感染させて不死化させた B 細胞株を樹立する手法 (Science 1999;286(5438):300-3) で、臨床検体から得た B 細胞の詳細な機能解析が行われている。そこで、炎症性腸疾患の IgG で糖鎖異常が起こる原因として、B 細胞自体に糖鎖異常を引き起こす原因があるという仮説を立て、糖鎖異常の IgG を産生する B 細胞の腸炎への関与について明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 糖鎖異常マウスに対する腸管炎症の誘導

$\beta$ -1,4-ガラクトース転移酵素-I (B4GalT)は、IgG にガラクトースを結合させる唯一の糖転移酵素であり、IgG へのガラクトース結合は B4GalT 活性に依存している (Glycobiology 1998;8:1215-20)。申請者の予備検討では、B4GalT ヘテロマウスにおけるガラクトース欠損 IgG の程度が、ヒト炎症性腸疾患のそれと酷似している。このマウスに Dextran Sodium Sulfate (DSS) 等を用いて実験腸炎モデルを誘発し、B4GalT I 欠損による腸炎の程度を検討した。また、B4GalT 欠損マウスから採取した B 細胞や IgG を、腸炎を誘発した野生型マウスに移入し、腸炎改善効果について検討した。

#### (2) 炎症性腸疾患患者由来 B 細胞株の樹立と機能解析

患者および健常者から採取した末梢血 B 細胞を、Epstein-Barr Virus を感染させて B 細胞を不死化させ (Science 1999;286(5438):300-3)、IgG 産生性 B 細胞を選定しモノクローナル化して、B 細胞株を樹立した。

#### (3) IgG 糖鎖変化と炎症性腸疾患の治療効果および疾患予後

IgG 糖鎖変化が治療前後で変化する可能性を検討するために、炎症性腸疾患患者の寛解導入治療前後で経時的に血清を採取し、IgG 糖鎖構造の変化を治療効果別に比較検討した。治療プロトコルの確立している、インフリキシマブ療法を新規導入するクローン病患者を対象とした。糖鎖構造解析は高速液体クロマトグラフィーを用いて、ガラクトース欠損の程度を測定するとともに、レクチ

ンアレイ等を用いてガラクトース欠損 IgG を特異的に認識するレクチンを探索した。また、末梢血単核球から B 細胞を単離し、治療前後の IgG 糖鎖変化に関連する糖鎖関連分子の同定を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 糖鎖異常マウスに対する腸管炎症の誘導

ガラクトース欠損 IgG の程度が、ヒト炎症性腸疾患のそれと酷似している、 $\beta$ -1,4-ガラクトース転移酵素-I (B4GalT) 欠損マウスに実験腸炎を発症させると、野生型に比して腸炎の程度が軽減された。その腸炎軽減には、細胞表面の糖鎖構造が変化し、ポリラクトサミン鎖が増加することで、ガレクチン1を介した B 細胞とマクロファージの細胞間コミュニケーションが変化し、マクロファージの IL-10 産生を調節している機構が考えられた。この成果につき論文発表を行い (Gastroenterology. 2012 May;142(5):1172-82. 図 1)、国内学会・国際学会等で広く報告した。

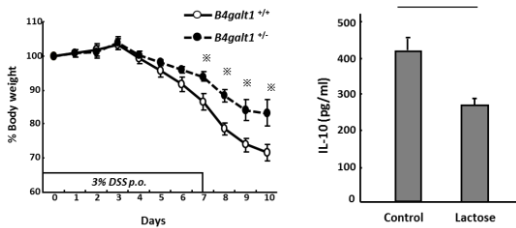


図 1 *B4galT1* ヘテロ欠損マウス(*B4galT1*<sup>+/-</sup>)における腸炎改善。左図。野生型に比べ *B4galT1*<sup>+/-</sup>マウスで DSS 誘発腸炎が軽度であった。右図。 *B4galT1*<sup>+/-</sup>マウス由来の B 細胞とマクロファージを共培養し、Lactose によってポリラクトサミン鎖結合を阻害するとマクロファージの IL-10 産生が抑制された。\*、# *P* < 0.05

##### (2) 炎症性腸疾患患者由来 B 細胞株の樹立と機能解析

患者および健常者から採取した末梢血 B 細胞を不活化させた細胞株を樹立し機能解析を行ったところ、糖鎖関連遺伝子のうち、B 細胞のガラクトシル化には B4GalT の他にも重要な酵素があることが明らかとなった。インフリキシマブを投与したクローン病患者において、投与前後でこの酵素が変動することから、糖転移酵素の変化が炎症の改善において重要な役割を果たしている可能性が考えられている。現在その機能をさらに詳細に解析し、論文報告に向け準備中である。

##### (3) IgG 糖鎖変化と炎症性腸疾患の治療効果および疾患予後

ガラクトース欠損 IgG を測定するためにこれまでは高速液体クロマトグラフィーを用いていたが、この手法は非常に煩雑でありコストもかかることから、より安価で簡便にガラクトース欠損 IgG の程度を測定する方法を開発した。ガラクトース欠損 IgG に特異的に結合するレクチンを、レクチンアレイを用いて網羅的に探索し、それらレクチンを用いて ELISA システム

(Agal-IgG と命名) を構築した。Agal-IgG は日本のみならず、米国の炎症性腸疾患患者においても高値を示した。また、インフリキシマブの投与前後で経時的に血清を採取し、Agal-IgG を治療効果別に比較検討したところ、Agal-IgG は治療効果を予測するバイオマーカーとなりうる事が明らかとなった。この成果につき論文発表を行い、(Inflamm Bowel Dis. 2013 Feb;19(2): 321-331. 図 2)。国内学会・国際学会等で広く報告した。

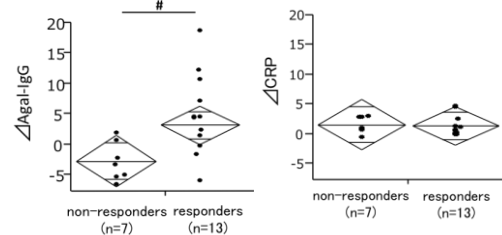


図 2 Agal-IgG とクローン病治療効果 インフリキシマブ投与 0 週と 6 週での Agal-IgG の差 ( $\Delta$ Agal-IgG) は、治療無効群より有効群で有意に高値を示した。一方 CRP の差 ( $\Delta$ CRP) は両群で変化を認めなかった。# *P* < 0.05

#### 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 14 件)

1. Shinzaki S. (18 人中 1 番目), Kuroki E., Iijima H., Takehara T., Miyoshi E., et al. Lectin-based immunoassay for aberrant IgG glycosylation as the biomarker for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2013 Feb;19(2): 321-331. 査読有
2. Serada S, Fujimoto M, Shinzaki S (13 人中 5 番目), Naka T, et al. Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.*

- 2012 Nov;18(11):2169-79. 査読有
3. Shinzaki S (16人中1番目), Iijima H, Fujii H, Takehara T, Miyoshi E, et al. Altered oligosaccharide structures reduce colitis induction in mice defective in  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase. *Gastroenterology*. 2012 May;142(5):1172-82. 査読有
  4. Iijima H, Shinzaki S, Tsujii M, Takehara T. The Importance of Vitamins D and K for the bone health and immune function in Inflammatory Bowel Disease. *Curr Opin Clin Nutr*. 2012 Nov;15(6):635-40. 査読有
  5. Kamada Y, Shinzaki S (12人中6番目), Takehara T, Miyoshi E, et al. N-Acetylglucosaminyltransferase V regulates TGF- $\beta$  response in hepatic stellate cells and the progression of steatohepatitis. *Glycobiology*. 2012 Jun;22(6):778-87. 査読有
  6. Inoue T, Iijima H, Shinzaki S (18人中4番目), Takehara T, et al. Deficiency of N-acetylgalactosamine in O-linked oligosaccharides of IgA is a novel biologic marker for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 18(9):1723-34. 査読有
  7. 飯島英樹, 新崎信一郎, 辻井正彦, 竹原徹郎. 最新の疾患バイオマーカー研究-より適切な診療を目指して- 疾患バイオマーカーの臨床研究 炎症性腸疾患 日本臨床 70巻5号 Page869-873(2012.05) 査読無
  8. 新崎信一郎, 中島佐知子, 飯島英樹. シグナル伝達を理解するために必要な知識 糖鎖修飾によるシグナル伝達制御 分子消化器病 9巻1号 Page63-67 (2012.03) 査読無
  9. Nakajima S, Iijima H, Shinzaki S (14人中4番目), Hayashi N, et al. Association of Vitamin K Deficiency with Bone Metabolism and Clinical Disease Activity in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrition*. 2011 Oct;27(10):1023-8. 査読有
  10. Nakajima S, Iijima H, Shinzaki S (16人中3番目), Hayashi N, et al. Functional analysis of agalactosyl IgG in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(4):927-36. 査読有
  11. Terabe F, Fujimoto M, Shinzaki S (15人中4番目), Naka T, et al. Comparative Analysis of the Effects of Anti-IL-6 Receptor mAb and Anti-TNF mAb Treatment on CD4+ T Cell Responses in Murine Colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(2):491-502 査読有
  12. 飯島英樹, 新崎信一郎, 辻井正彦, 竹原徹郎. IBDと炎症性サイトカイン(第4回) IL-12/IL-23 G.I.Research 19巻5号 Page501-506(2011.10) 査読無
  13. 新崎信一郎. GPのためのセミナー 先端医学トレンド 炎症性腸疾患のバイオマーカー クリニシアン 58巻8号 Page1001-1006(2011.08) 査読無
  14. 中島佐知子, 飯島英樹, 新崎信一郎, 辻井正彦ら. 炎症性腸疾患患者における Mannan Binding Lectinの分布とガラクトース欠損 IgGの役割. 潰瘍 38巻1号 Page58-63(2011.05) 査読無
- [学会発表] (計16件)
1. 新崎 信一郎ら. 消化器疾患における新規分子マーカー クロウン病バイオマーカーとしての「ガラクトース欠損 IgG」 Agal-IgG ELISA の開発と臨床応用に向けた検討 第99回日本消化器病学会総会 2013年3月21日 鹿児島
  2. 石井真悠子ら. N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) はマクロファージの機能不全を介して腸管炎症を増悪させる 第85回日本生化学会大会 2012年12月14日 福岡
  3. 藤井宏修ら. ポリラクトサミンを介した B細胞とマクロファージによる腸炎保護作用 第85回日本生化学会大会 2012年12月14日 福岡
  4. Shinzaki S., et al. Regulation of oligosaccharide-associated enzymes by TNF-alpha in B cells of Crohn's disease. アメリカ消化器病学会週間 2012. 2012年5月20日、アメリカ・サンディエゴ
  5. Shinzaki S., et al. Lectin-based immunoassay for aberrant IgG

glycosylation as the biomarker for Crohn's disease アメリカ消化器病学会週間 2012. 2012年5月20日、アメリカ・サンディエゴ

6. Ishii M., et al. Overexpression of N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) exacerbates murine colitis with dysfunction of macrophages アメリカ消化器病学会週間 2012. 2012年5月20日、アメリカ・サンディエゴ
7. 浅澤 瞳美ら. 双子研究から明らかになった IgG の糖鎖構造の遺伝性について 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会 2011年11月17日、岡山
8. 石井 真悠子ら. 腸管炎症における N-アセチルグルコサミン転移酵素 V(GnT-V)の役割 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会 2011年11月17日、岡山
9. 竜中 法佳ら. クロウン病患者 B 細胞における TNF- $\alpha$  を介したガラクトシル化の制御 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会 2011年11月17日、岡山
10. 藤井 宏修ら. ポリラクトサミンを介した B 細胞とマクロファージにおける腸炎保護作用 第 53 回日本消化器病学会大会 2011年10月20日 福岡
11. 井上 隆弘ら. IgA 糖鎖構造に基づく炎症性腸疾患の診断と予後予測 第 53 回日本消化器病学会大会 2011年10月20日 福岡
12. Shinzaki S, et al. Galectin-polylectosamine interaction between B cells and macrophages contributes to protect murine colitis defective in beta-1,4-galactosyltransferase I. アメリカ消化器病学会週間 2011 2011年5月7日 アメリカ・シカゴ
13. 井上 隆弘ら. 炎症性腸疾患における IgA O 結合型糖鎖異常の機序について 第 97 回日本消化器病学会総会 2011年5月13日 東京
14. 新崎 信一郎ら. インフリキシマブによる IgG 糖鎖や B 細胞に於ける糖鎖関連酵素の制御. 第 7 回日本消化管学会総会学術集会 2011年2月18日 京都
15. 新崎 信一郎ら. ガラクトース転移酵素

の欠損は、実験的腸炎を軽減させる 第 83 回日本生化学会 2010年12月7日 神戸

16. 新崎 信一郎ら. 糖鎖関連バイオマーカーを用いたクローン病に対するインフリキシマブ治療戦略. 第 52 回日本消化器病学会大会 2010年10月13日 横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/>

<http://sahswww.med.osaka-u.ac.jp/~tousa/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新崎 信一郎 (SHINZAKI SHINICHIRO)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：60546860