

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 3 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年～2011

課題番号：22790802

研究課題名（和文）IgA 腎症における免疫複合体形成機序の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Analysis of mechanisms for formation of pathogenic immune complexes and establishment of novel therapeutic approach in IgA nephropathy

研究代表者

鈴木 仁 (Suzuki Hitoshi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10468572

研究成果の概要（和文）：TLR9 の発現増強や、サイトカインの刺激により、糖鎖構造・糖鎖修飾酵素の活性化が誘導され、糖鎖異常 IgA1 や糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG の産生が亢進することが示され、扁桃を主とした異常な粘膜免疫応答により、IgA 腎症の病態において重要な免疫複合体が形成されることが示された。血中バイオマーカー（糖鎖異常 IgA1、糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG、および IgG-IgA 免疫複合体）を測定することで、扁桃摘出術の適応と治療効果判定に応用できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：IgA nephropathy (IgAN), the most common glomerulonephritis, is characterized by mesangial IgA1-containing immunodeposits. Aberrant IgA1 and anti-glycan IgG are produced by activation of TLR9 and several cytokines. Serum levels of aberrant IgA1, anti-glycan IgG, and IgG-IgA immune complexes may be useful biomarkers for judgment of indication of tonsillectomy and efficacy of therapy.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：腎臓病学

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・糖鎖異常 IgA1・免疫複合体

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は、糸球体メサンギウム領域への IgA1 を含む免疫複合体の沈着を特徴とし、多くの症例で IgG の沈着を伴う。これまでの研究により、IgA 腎症患者の血清中には IgA1 のヒンジ部位に糖鎖異常をともなった IgA1 が増加しており (Mestecky J et al. *Contrib Nephrol*, 1993)、糸球体に沈着する IgA1 も糖鎖構造異常をもつことが示唆された (Hiki Y et al. *Kidney Int*, 2001)。また、患者血清中には、IgA1-IgG 免疫複合体 (IgA1-IgG

IC) が増加しており、この IgA1-IgG IC が腎糸球体のメサンギウム細胞を活性化させ炎症を惹起すると考えられる (Gomez-Guerrero C et al, *J Immunol*, 1994)。糖鎖異常 IgA1 が抗原として認識され、IgG と免疫複合体を形成すること (Tomana M et al. *J Clin Invest*, 1999) が明らかとなった。しかしながら、糖鎖異常 IgA1 や糖鎖異常 IgA1 特異的抗体の産生機序は明らかではなく、IgA 腎症の診断は侵襲的な腎生検に委ねるしか方法はなく、特異的治療法も存在しない。

2. 研究の目的

IgA 腎症患者の末梢血および摘出扁桃より、IgA1-および IgG 産生細胞株を樹立する。本症の病態において重要なバイオマーカーである糖鎖異常 IgA1・糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG の産生亢進メカニズムを解明するために、CpG を用いた TLR9 の発現増強や IL-6 などのサイトカインでの刺激による IgA1 の糖鎖構造・糖鎖修飾酵素の活性化や IgG 産生細胞株での糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG の産生が亢進するかを検証する。本症における扁桃 B 細胞の役割を解明するため、扁桃摘後の血中バイオマーカーの推移と治療反応性との関連を解析するとともに、扁桃摘出 B 細胞を用いて、扁桃摘治療の有効性を規定している因子を解明する。さらに、腎炎惹起性の免疫複合体形成を抑制するために、糖鎖異常 IgA1 と糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG を標的とした治療を開発するための基礎研究を計画した。

3. 研究の方法

IgA1 および IgG 産生細胞のクローニング：

IgA 腎症患者の末梢血および摘出扁桃より B 細胞を分離し、EB ウイルスで不死化させ、IgA1 および IgG 産生細胞株を樹立する。精製された糖鎖異常 IgA1 を抗原として特異的に認識する IgG 産生細胞を分離培養する。CpG や各サイトカインを用いて、糖鎖修飾や抗原認識に対するエピトープの変化を検証する。

IgA 腎症患者の診断および疾患活動性評価におけるバイオマーカー測定系の確立：

順天堂大学順天堂医院で収集された、IgA 腎症と組織診断のついた患者、IgA 腎症以外の腎炎の組織診断がついた患者、および、尿所見異常がない健康人の血清を使用する。バイオマーカーとして、血中の IgA 値、および糖鎖異常 IgA1 値、血中糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG 値、血中 IgA1-IgG 免疫複合体を測定する。

次に、IgA 腎症に対して扁桃摘出・ステロイド治療を行い、治療経過がフォローできた患者の経時的な血液サンプル（治療前、扁桃摘出後、ステロイド治療直後、治療終了1年後、治療終了3年後）を用いて、上述のバイオマーカーの経過を解析する。治療経過中の血清クレアチニン、蛋白尿、血尿などをもとにした治療反応性と測定された各種バイオマーカーの推移を統計学的に解析し、扁桃摘出術の適応基準を考察する。

4. 研究成果

IgA腎症の病態における糖鎖異常IgA1産生と免疫複合体形成機序を解明するために、今年度では、まずIgA腎症患者の末梢血および摘出された扁桃よりB細胞を抽出し、EBウイルスで不死化し、IgA1-およびIgG産生細胞株を樹立することに成功した (n=5ずつ)。引き続き

、CpGを用いたTLR9の発現増強やIL-6などのサイトカインでの刺激によるIgA1の糖鎖構造・糖鎖修飾酵素の活性化やIgG産生細胞株での糖鎖異常IgA1特異的IgGの産生が亢進するかを検証しているところである。

本症の診断および活動性を評価する非侵襲的な方法を生み出すために、血中糖鎖異常IgA1・糖鎖異常IgA1特異的IgG抗体価およびIgA抗体価、IgG-IgA免疫複合体、および尿中糖鎖異常IgA1などのバイオマーカーの測定系を樹立した。これらを用いて、IgA腎症患者、IgA腎症以外の腎症患者、健康人の血清および尿サンプルを収集し、上述したバイオマーカーを測定している。IgA腎症は、多因子疾患であり、その成因と病態が複雑であるがために、ひとつのバイオマーカーよりも複数のバイオマーカーを組み合わせることで、診断・疾患活動性の評価に有用であることが基礎データとして示された。

本症における扁桃B細胞の役割を解明するため、扁桃摘後の血中バイオマーカーの推移と治療反応性との関連を解析した。IgA腎症に対して扁桃摘出(扁桃摘)治療を行い、治療経過をフォローできた患者(15症例)の血液サンプル(扁桃摘前後、治療1年後)を用いて、バイオマーカー(血中糖鎖異常IgA1、糖鎖異常IgA1特異的IgGおよびIgA1-IgG免疫複合体)を測定し、扁桃摘が有効であった症例では、各バイオマーカーが優位に低下しており、扁桃B細胞がIgA腎症の病態に深く関与していることが示された。来年度は、さらに長期的な経過を解析する予定である。

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17件)

- ① 鈴木 仁、富野康日己：IgA分子の糖鎖異常と発症・進展における役割。腎と透析，72巻，2012 in press，査読無
- ② Suzuki H，Kiryluk K，Novak J，Moldoveanu Z，Herr AB，Renfrow MB，Wyatt RJ，Scolari F，Mestecky J，Gharavi AG，Julian BA：The pathophysiology of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 22：1795-1803，2011，査読有
- ③ Novak J，Moldoveanu Z，Julian BA，Raska M，Wyatt RJ，Suzuki Y，Tomino Y，Gharavi AG，Mestecky J，Suzuki H：Aberrant glycosylation of IgA1 and anti-glycan antibodies in IgA nephropathy：role of mucosal immune system. *Adv Otorhinolaryngol* 72：60-3，2011，査読無
- ④ Reevaluation of the mucosa-bone marrow axis in IgA nephropathy with animal models：Suzuki Y，Suzuki H，

- Sato D, Kajiyama T, Okazaki K, Hashimoto A, Kihara M, Yamaji K, Satake K, Nakata J, Aizawa M, Novak J, Tomino Y. *Adv Otorhinolaryngol* 72: 64-7, 2011 査読有
- ⑤ Novak J, Kafkova LR, Suzuki H, Tomana M, Matousovic K, Brown R, Stacy Hall, Sanders JT, Eison TM, Moldoveanu Z, Novak L, Novak Z, Mayne R, Julian BA, Mestecky J, Wyatt RJ: IgA1 immune complexes from pediatric patients with IgA nephropathy activate cultured human mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant*, 26: 3451-3457, 2011, 査読有
- ⑥ Camilla R, Suzuki H, Daprà V, Loiacono E, Peruzzi L, Amore A, Ghiggeri GM, Mazzucco G, Scolari F, Gharavi AG, Appel GB, Troyanov S, Novak J, Julian BA, Coppo R. Oxidative stress and galactose-deficient IgA1 as markers of progression in IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 6: 1903-11, 2011, 査読有
- ⑦ Suzuki Y, Suzuki H, Nakata J, Sato D, Kajiyama T, Watanabe T, Tomino Y: Pathological role of tonsillar B cells in IgA nephropathy. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011, 査読有
- ⑧ Kajiyama T, Suzuki Y, Kihara M, Suzuki H, Horikoshi S, Tomino Y: Different pathological roles of Toll-like receptor 9 on mucosal B cells and dendritic cells in murine IgA nephropathy. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011, 査読有
- ⑨ Kiryluk K, Moldoveanu Z, Sanders JT, Eison TM, Suzuki H, Julian BA, Novak J, Gharavi AG, Wyatt RJ: Aberrant Glycosylation of IgA1 is Inherited in Pediatric IgA Nephropathy and Henoch-Schönlein Purpura Nephritis. *Kidney Int* 80: 79-87, 2011, 査読有
- ⑩ 鈴木 仁、富野康日己: 糖鎖異常 IgA1. IgA 腎症診療マニュアル, P11-17, 2011, 査読無
- ⑪ 鈴木 仁、富野康日己: IgA 腎症の成因. Annual Review 腎臓. P21-29, 2011, 査読無
- ⑫ 鈴木 仁: IgA 腎症の発症、扁桃病巣感染、粘膜免疫. IgA 腎症診療ガイド Q&A 進行性腎障害診療指針シリーズ, P34-35, 2011, 査読無
- ⑬ Lindfors K, Suzuki H, Novak J, Collin P, Saavalainen P, Koskinen L, Maki M, Kaukinen K: Galactosylation of serum IgA1 O-glycan in celiac disease. *J Clin Immunol* 31: 74-79, 2010, 査読有
- ⑭ Takahashi K, Wall SB, Suzuki H, Smith AD, Hall S, Paulsen K, Kilian M, Mobley JA, Julian BA, Mestecky J, Novak J, Renfrow MB: Clustered O-glycans of IgA1: Defining macro- and micro-heterogeneity by use of electron capture/transfer dissociation. *Mol Cell Proteomics* 9: 2545-2557, 2010, 査読有
- ⑮ Gomes MM, Suzuki H, Brooks MT, Tomana M, Moldoveanu Z, Mestecky J, Julian BA, Novak J, Herr AB: Recognition of Galactose-Deficient O-Glycans in the Hinge Region of IgA1 by N-Acetylgalactosamine-Specific Snail Lectins: A Comparative Binding Study. *Biochemistry* 13: 5671-5682, 2010, 査読有
- ⑯ 鈴木 仁: IgA腎症における糖鎖異常 IgA1 と免疫複合体の病的意義. 医学のあゆみ, 232 巻, 1107-1112, 2010, 査読無
- ⑰ 鈴木 仁: IgA腎症における糖鎖異常. 臨床内科, 106 巻, 98-101, 2010, 査読無
- [学会発表] (計 10 件)
- ① Olson SW, Suzuki H, et al: Evaluation of Serial Serum Levels of IgA-IgG Immune Complexes Prior To Diagnosis of IgA Nephropathy. The ASN (American Society of Nephrology) 44th Annual Meeting. Philadelphia, USA, 2011 年 11 月
- ② Raska M, Yamada K, Horynova M, Takahashi K, Suzuki H, et al: Role of N-acetylgalactosaminyl Transferases in the Synthesis of Aberrant IgA1 O-glycans in IgA Nephropathy. The ASN (American Society of Nephrology) 44th Annual Meeting. Philadelphia, USA, 2011 年 11 月
- ③ Suzuki Y, Matsuzaki K, Suzuki H, et al: Novel noninvasive biomarkers for disease activity of IgA nephropathy. The ASN (American Society of Nephrology) 44th Annual Meeting. Philadelphia, USA, 2011 年 11 月
- ④ Yamada K, Raska M, Moldoveanu Z, Suzuki H, et al: Effect of gp130 Cytokines on IgA1-producing Cells from Patients with IgA Nephropathy. The ASN (American Society of

- Nephrology) 44th Annual Meeting. Philadelphia, USA, 2011年11月
- ⑤ Takahashi K, Suzuki H, et al: Characterization of Galactose-deficient IgA1 Secreted by IgA1-producing Cell Lines: Implication for Pathogenesis of IgA Nephropathy. The ASN (American Society of Nephrology) 44th Annual Meeting. Philadelphia, USA, 2011年11月
 - ⑥ Yanagawa H, Suzuki H, et al: Novel diagnostic approach for IgA nephropathy. The ASN (American Society of Nephrology) 44th Annual Meeting. Philadelphia, USA, 2011年11月
 - ⑦ Novak J, Suzuki H, et al: Glycosylation pathways of *O*-glycans in the hinge region of monomeric and polymeric circulatory IgA1. 15th International Congress of Mucosal Immunology, Paris, France, 2011年6月
 - ⑧ Novak J, Suzuki H, et al: Pathways of aberrant *O*-glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy. Annual meeting of European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association, Prague, Czech Republic, 2011年6月
 - ⑨ 松崎慶一、鈴木祐介、鈴木 仁、ほか: IgA腎症患者のTLR9 遺伝子の一塩基多型と重症度の検討. 日本腎臓学会, 横浜, 2011年5月
 - ⑩ 鈴木 仁: The role of tonsillar B cells in the pathogenesis of IgA nephropathy. 国際扁桃粘膜免疫学会, 旭川, 2010年7月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 仁 (SUZUKI HITOSHI)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号: 10468572