

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08526

研究課題名(和文)呼吸器疾患におけるIgAの病原性作用の解明と予防法の開発

研究課題名(英文)Identification of pathogenic effects of IgA in respiratory diseases

研究代表者

鈴川 真穂 (Suzukawa, Maho)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：20453699

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)：本研究はIgAの呼吸器疾患に対する病原性作用を明らかにすることを目的とした。喘息、IPFモデルマウスにおいて気管支肺胞洗浄液中IgAは上昇した。また、外因性IgAにより、総細胞数およびサイトカインが上昇した。IgAは気道平滑筋細胞および血管内皮細胞からのサイトカイン産生を増強することを見出し、英文学術誌へ公表した。また、気道上皮細胞株と免疫沈降を用いた研究から、新規のIgAレセプターANXA2を同定し、ANXA2がIgAによる気道上皮細胞からのサイトカイン産生増強作用に一部寄与していることを見出し、英文学術誌へ公表した。本研究からIgAが呼吸器疾患に対して病原性作用を示す可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を含め、当研究室ではこれまでにIgAが呼吸器構成細胞を活性化することを系統的に明らかにしてきた。これまでIgAの生体保護的な役割には注目されてきたが、病原性役割について明らかにした本研究データの蓄積は世界的にも見当たらず、独自のものである。さらに今回IgAに対する気道上皮細胞上の新たなレセプターを同定し得た。本研究結果から、IgAおよびANXA2が呼吸器疾患の新規治療標的となる可能性が想起され、意義深い研究になったと考えている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to determine the pathogenic effects of IgA on respiratory diseases.

IgA in bronchoalveolar lavage fluid was elevated in mouse models of asthma and IPF. We found that IgA enhanced cytokine production from airway smooth muscle cells and vascular endothelial cells, and published our findings in an English journal. Using airway epithelial cell lines and immunoprecipitation, we identified a novel IgA receptor, ANXA2, and found that ANXA2 contributed in part to the enhanced cytokine production from airway epithelial cells by IgA, which was published in an English journal. This study suggests that IgA may exert pathogenic effects on respiratory diseases.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：IgA レセプター ANXA2 サイトカイン 気管支平滑筋細胞 血管内皮細胞 気道上皮細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

IgA は生体内において 1 日当たり最も大量に産生される免疫グロブリンであり、粘膜で重要な生体防御機構を形成していると考えられている。一方、近年 IgA の病原性作用にも注目が集まっている。申請者は、これまで IgA の主に呼吸器構成細胞に対する病原性作用を報告してきたが、*in vivo* の作用は未だに明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究は IgA の呼吸器疾患に対する病原性作用とその機序を明らかにし、IgA をターゲットとした治療介入の可能性を探求することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞および実験動物

ヒト気管支上皮細胞株 BEAS-2B、腺癌由来ヒト肺胞底層上皮細胞株 A549、ヒト気道平滑筋細胞 BSMCs、肺微小血管内皮細胞 HMVEC-L およびヒト単球系細胞株 U937 を用いた。

マウスは C57BL/6 (6-12 週齢) を使用した。

#### (2) 培養上清中サイトカイン濃度の測定

購入したヒト血清 IgA (Abcam) またはヒト分泌型 IgA (secretory IgA; sIgA, MP Biomedicals) で細胞を刺激し、得られた培養上清を MAGPIX System (Luminex) で測定した。

#### (3) 呼吸器疾患モデルマウスの作製と気管支肺胞洗浄 (BAL)

PBS と 1.25mg/ml のアルテルナリア抽出液 (Alt) は、40 $\mu$ l を 2 回点鼻した翌日に気管支肺胞洗浄 (BAL) を行った。

外因性 IgA の呼吸器疾患への影響を確認するために、OVA 感作・チャレンジと共に 100 $\mu$ g human IgA を投与し、BAL を行った。

#### (4) フローサイトメトリーによる解析

細胞表面タンパクの発現は、各種特異抗体で標識後、FACSVerse (BD Biosciences) で測定した。

#### (5) HMVEC-L に対する白血球接着能の定量

HMVEC-L に対する白血球接着能の定量には、Cytoselect Leukocyte-Endothelium Adhesion Kit (Cell Biolabs) を用いた。HMVEC-L に接着した U937 細胞は蛍光顕微鏡 (KEYENCE) および蛍光プレートリーダー (PerkinElmer) を用いて解析した。

#### (6) 免疫沈降

ビオチン化した BEAS-2B 細胞を溶解し、ライセートを sIgA またはヒト IgG を架橋したセファロースビーズとインキュベートした。sIgA または IgG に結合したタンパク質を分離し電気泳動し、sIgA 特異的バンドを検出した。SDS ゲルにおける同一バンドを銀染色で検出して、切り出し、MALDI-TOF MASS による PMF 分析を行った。

#### (7) sIgA と ANXA2 の ELISA

96 ウェルプレートに Annexin A2 または sIgA をコートし、各濃度の sIgA または ANXA2 を反応させた後、TMB で発色させた。

#### (8) siRNA を用いたノックダウン

4D-Nucleofector (Lonza) を用いて、ANXA2 siRNA または control RNA (SIGMA) を遺伝子導入した。

#### (9) Real-time PCR

Thermo Fisher Scientific 社作成の primer および Taqman probe を用いて、レファレンス遺伝子を  $\beta$ -actin として  $\Delta\Delta$ Ct 法で相対定量した。

#### (10) Western blot analysis

細胞を lysis buffer (RIPA buffer) で溶解し、SDS 化、還元熱処理し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った抗体で標識後化学発光し、Amersham Imager 600 で撮影した。

#### (11) 統計

統計解析は、2 群間比較には paired two-tailed *t* test、複数群間比較には Tukey's test を用いた一元配置分散分析で実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 呼吸器疾患モデルマウスにおける IgA 量の変化

Alt および OVA 感作・チャレンジによる喘息モデルマウス、シリカ点鼻投与による IPF モデルマウスにおいて、BALF 中の IgA 量を ELISA 法で測定した。いずれの呼吸器疾患モデルマウスにおいても気管支肺胞洗浄液中の IgA 量が上昇した (Fig.1)。

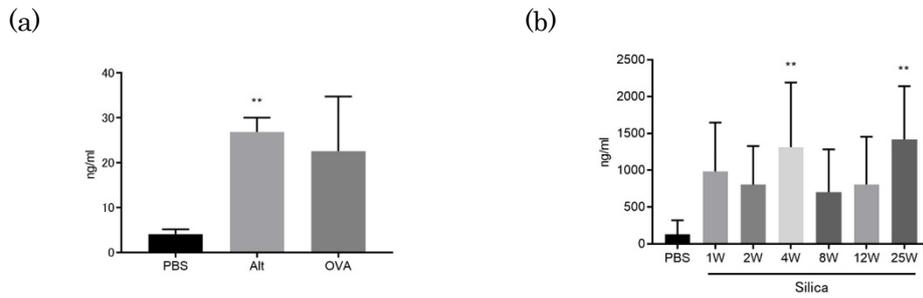


Fig.1 呼吸器疾患モデルマウスの気管支肺胞洗浄液中 IgA 量 (a)Alt または OVA による喘息モデルマウス(n=3)、(b)シリカ投与による IPF モデルマウス (n=7~8)の BALF 中 IgA 値を示す。\*\*p < 0.01 versus PBS。

(2) 呼吸器疾患モデルマウスにおける IgA の役割の解析  
 OVA 感作・チャレンジによる喘息モデルマウスに単量体 IgA を投与することで、BALF 中の総細胞数に変化は見られなかったが、human sIgA を投与することにより、BALF 中総細胞数が有意に増加した(Fig.2)。また、mouse IgA により BALF 中 Eotaxin が上昇し、sIgA により BALF 中 MMP8 が上昇した。

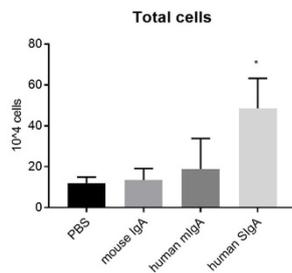
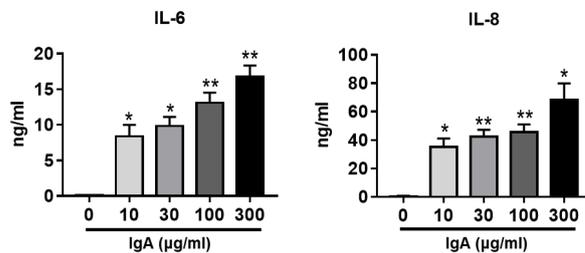


Fig.2 OVA 感作・チャレンジによる喘息モデルマウスにおける外因性 IgA の作用  
 OVA による喘息モデルマウスに、図中の IgA を点鼻投与し、BALF 中の細胞数を測定した(n=3~9)。\*p < 0.05 versus PBS。

(3) 培養細胞を用いた血清 IgA 機能の解明  
 これまでに A549 細胞およびヒト肺線維芽細胞である NHLF において、sIgA によるサイトカイン産生が誘導されることを報告してきた<sup>1,2</sup>。  
 そこで、血清中 IgA について、呼吸器構成細胞の機能に対する影響を明らかにするため、BSMCs および HMVEC-L を血清 IgA で刺激し、培養上清のサイトカインとケモカインを MAGPIX System で測定した。Fig. 3 に示す通り、BSMCs、HMVEC-L のいずれも血清 IgA 10 μg/ml から培養上清中の IL-6、IL-8 値が有意に上昇した。HMVEC-L においては、接着分子である ICAM1 および VCAM1 も有意に上昇した。

(a) BSMCs



(b) HMVEC-L

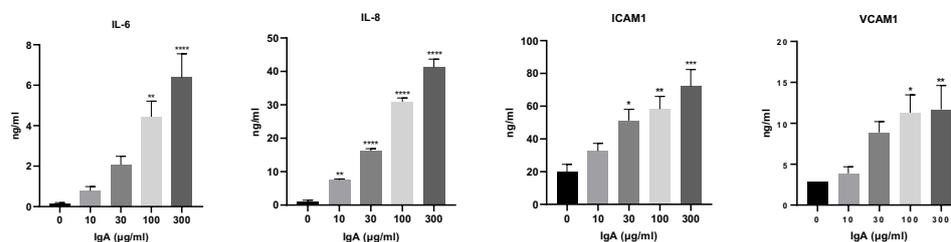


Fig.3 血清 IgA による BSMC および HMVEC-L のサイトカイン・ケモカイン産生  
 (a) BSMC、(b) HMVEC-L を図中に記載した濃度の血清 IgA で刺激し、培養上清中の液性因子を測定した。\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  versus cells without stimulus.

(4) 血清 IgA による HMVEC-L の細胞接着能の解析

HMVEC-L の細胞表面の接着分子の発現レベルをフローサイトメトリーにより測定した。血清 IgA 100  $\mu\text{g/ml}$  の刺激によって、無刺激よりも ICAM1 および VCAM1 の発現が増強した。また、血清 IgA 100  $\mu\text{g/ml}$  で刺激した HMVEC-L と U937 細胞を共培養したところ、U937 細胞の HMVEC-L に対する接着が増強した(Fig. 4)。

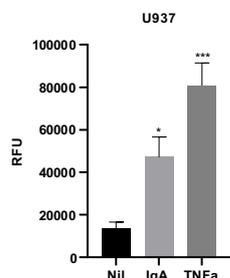


Fig.4 血清 IgA による HMVEC の接着能

培養した HMVEC-L 上に標識した U937 を培養し、接着した細胞を蛍光プレートリーダーで検出した値を示す。\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  versus cells without stimulus.

(5) 新規 IgA レセプターの同定

気道上皮細胞における sIgA の新規受容体を検出することを目的とし、免疫沈降と質量分析を行った。BEAS-2B 細胞の細胞表面タンパク質をビオチン化した後に溶解し、sIgA 架橋セファローズビーズを用いて細胞溶解液を免疫沈降した (Fig. 5a)。IgG を negative control としてストレプトアビジン-ALP で発光したところ、sIgA に特異的なバンドが約 35 kDa に明瞭に検出された。このバンドを単離し、MS 分析と PMF 分析を行った結果、ANXA2 が sIgA の新規受容体の候補であることが判明した。

ANXA2 と sIgA との結合を調べるために、ELISA を行った (Fig. 5b)。sIgA (Fig. 5b i) と ANXA2 (Fig. 5b ii) の両方を複数の濃度に希釈したものをそれぞれ ANXA2、sIgA と結合させ標識、発光させたところ、濃度依存的に光学濃度 (OD) が有意に上昇し、ANXA2 が sIgA に結合することが示唆された。

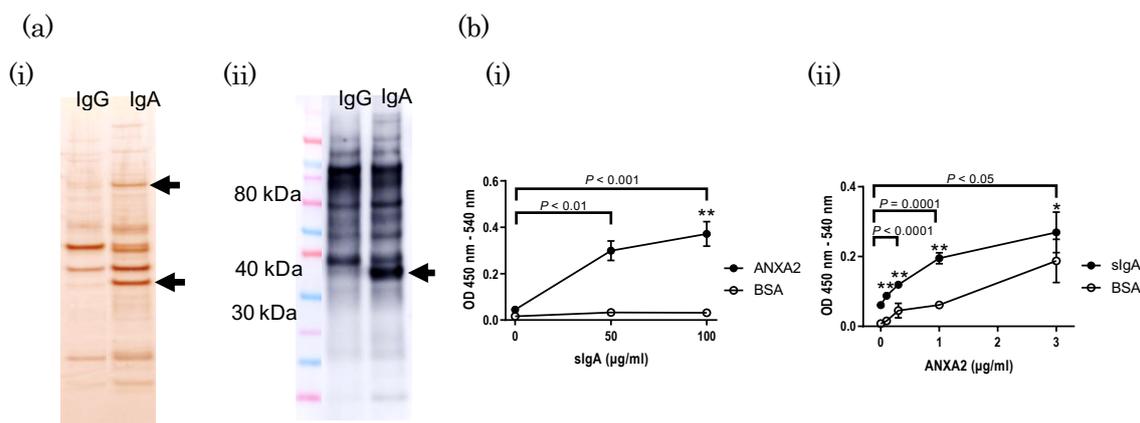


Fig.5 sIgA の免疫沈降 (a)と、sIgA と ANXA2 の ELISA (b)

(a) 免疫沈降後の渡銀染色 (i)、ストレプトアビジン-ALP による染色 (ii)を示す。

(b) sIgA をコーティングした ELISA (i)、ANXA2 をコーティングした ELISA の結果を示す。  
 \*\*  $p < 0.01$  versus 0.

(6) 気道上皮細胞に発現する IgA 受容体

気道上皮細胞における ANXA2 の発現量を明らかにするために、BEAS-2B 細胞と A549 細胞の両方を用いて FACS 解析を行ったところ、細胞表面に低レベルの ANXA2 が発現していた。

(7) sIgA 刺激によるサイトカイン産生における ANXA2 の役割

最後に、ANXA2 を標的とする siRNA を導入した A549 細胞において、ANXA2 mRNA およびタンパクの発現が低下していることを確認し、これらの細胞を sIgA で刺激し、培養上清中の IL-

8/CXCL8、IL-6、CCL2/MCP-1 を測定した結果、これら 3 つのサイトカインの産生が ANXA2 siRNA を導入した細胞において有意に低下していたことから、ANXA2 が sIgA によるサイトカイン産生誘導に関与していることが示唆された(Fig. 7)。

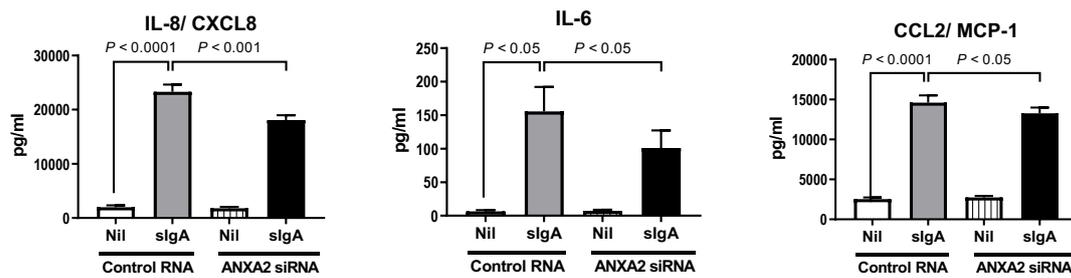


Fig. 7 ANXA2 のノックダウンによる sIgA 刺激に対するサイトカイン産生の変化  
ANXA2 に対する siRNA を導入し、72 時間後に 300 $\mu$ g/ml sIgA で刺激し、培養上清中のサイトカインを測定した。

#### (8)まとめ

本研究により、喘息、IPF モデルマウスの気道 IgA が増加すること、外因性 IgA により気道炎症が増悪する可能性が示唆された。また、*in vitro* の研究から、血清 IgA は肺線維芽細胞および肺微小血管内皮細胞からのサイトカイン産生を増強し、肺微小血管内皮細胞に対する炎症細胞の接着能を増強することが明らかにされた<sup>3</sup>。最後に、気道上皮細胞における新規 sIgA レセプターとして ANXA2 を同定し、sIgA は ANXA2 を介して気道上皮細胞からのサイトカイン産生を誘導することを明らかにした<sup>4</sup>。本研究成果から、IgA の作用による呼吸器疾患の新規病態が明らかにされた。

#### 【参考文献】

1. Kobayashi K, Suzukawa M, Watanabe K, Arakawa S, Igarashi S, Asari I, et al. Secretory IgA accumulated in the airspaces of idiopathic pulmonary fibrosis and promoted VEGF, TGF- $\beta$  and IL-8 production by A549 cells. *Clin Exp Immunol.* 2020;199(3):326-36.
2. Arakawa S, Suzukawa M, Watanabe K, Kobayashi K, Matsui H, Nagai H, et al. Secretory immunoglobulin A induces human lung fibroblasts to produce inflammatory cytokines and undergo activation. *Clin Exp Immunol.* 2019;195(3):287-301.
3. Takada K, Suzukawa M, Igarashi S, Uehara Y, Watanabe S, Imoto S, Ishii M, Morio Y, Matsui H, Akishita M, Ohta K. Serum IgA augments adhesiveness of cultured lung microvascular endothelial cells and suppresses angiogenesis. *Cell Immunol.* 2023;393-394:104769.
4. Watanabe S, Kobayashi K, Suzukawa M, Igarashi S, Takada K, Imoto S, Kitani M, Fukami T, Nagase T, Ohta K. Identification of ANXA2 on epithelial cells as a new receptor for secretory IgA using immunoprecipitation and mass spectrometry. *Clin Exp Immunol.* 2022 Jun 23;208(3):351-360.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe Shizuka, Kobayashi Koichi, Suzukawa Maho, Igarashi Sayaka, Takada Kazufumi, Imoto Sahoko, Kitani Masashi, Fukami Takeshi, Nagase Takahide, Ohta Ken	4. 巻 208
2. 論文標題 Identification of ANXA2 on epithelial cells as a new receptor for secretory IgA using immunoprecipitation and mass spectrometry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 351 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cei/uxac043	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 -

1. 著者名 Suzukawa Maho, Ohta Ken, Fukutomi Yuma, et al.	4. 巻 72
2. 論文標題 Classifications of moderate to severe asthma phenotypes in Japan and analysis of serum biomarkers: A Nationwide Cohort Study in Japan (NHOM Asthma Study)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 63 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2022.06.002	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 -

1. 著者名 Imoto Sahoko, Suzukawa Maho, Takada Kazufumi, Watanabe Shizuka, Igarashi Sayaka, Kitani Masashi, Nagase Takahide, Ohta Ken	4. 巻 381
2. 論文標題 Immunoglobulin A promotes IL-6 and IL-8 production, proliferation, and migration by the human bronchial smooth muscle cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular Immunology	6. 最初と最後の頁 104612 ~ 104612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellimm.2022.104612	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 -

1. 著者名 Kobayashi K., Suzukawa M., Watanabe K., Arakawa S., Igarashi S., Asari I., Hebisawa A., Matsui H., Nagai H., Nagase T., Ohta K.	4. 巻 199
2. 論文標題 Secretory IgA accumulated in the airspaces of idiopathic pulmonary fibrosis and promoted VEGF, TGF and IL 8 production by A549 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 326 ~ 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cei.13390	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴川 真穂、橋本 大哉、小山田 吉孝、三木 真理、小河原 光正、井上 義一、齋藤 明子、大田 健、NHOM-Asthma Study Group
2. 発表標題 本邦における高齢者喘息フェノタイプ の研究：JFGE-Asthma研究
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴川 真穂、大田 健、福富 友馬、橋本 大哉、小林 信之、谷口 正実、NHOM-Asthma Study Group
2. 発表標題 本邦における重症喘息フェノタイプとバイオマーカーの研究：NHOM-Asthma研究
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴川真穂
2. 発表標題 Interim report of a multicenter prospective cohort study of patients with asthma (TNHAzma) in Japan
3. 学会等名 APSR 2021Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴川真穂
2. 発表標題 TNH-Azma多施設共同喘息コホート研究における登録症例の中間報告
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴川真穂
2. 発表標題 アレルギー疾患における好塩基球の作用と好塩基球活性化試験の進歩
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴川 真穂, 武田 啓太, 赤司 俊介, 川島 正裕, 大島 信治, 井上 恵理, 佐藤 亮太, 島田 昌裕, 鈴木 純子, 山根 章, 田村 厚久, 大田 健, 照屋 勝治, 永井 英明
2. 発表標題 活動性結核患者におけるQFT Gold in Tube(QFT-3G)およびQFT Gold Plus(QFT-Plus)中サイトカイン値の解析
3. 学会等名 第60回 日本呼吸器学会 学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------