

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：33916

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22915

研究課題名(和文) プロテオゲノミクスを用いた口蓋扁桃における糖鎖異常IgA1形成機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of abnormally glycosylated IgA production in the palatine tonsil

研究代表者

大山 友香子 (Ohyama, Yukako)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：70879717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、IgA腎症患者の特徴として、O結合型糖鎖数の減少したIgA1(O-glycan decreased-IgA1)の血中増加を見出した。本研究では、異常糖鎖構造をもつIgA1の産生母地としての口蓋扁桃の役割を明らかにすることを目指した。本研究から、腎症未発症の慢性扁桃炎患者血中にもIgA腎症患者と同様の異常糖鎖IgAの割合が増えているが、IgA腎症患者ではさらにIgA値の血中増加が認められることが明らかとなった。口蓋扁桃ではIgA産生形質細胞の割合が慢性扁桃炎患者に比して増加していることが明らかになった。口蓋扁桃で産生された形質細胞の血中へのミスホーミングが病態に関わる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年IgA腎症の治療薬としてLong lived plasma cellをターゲットにした抗CD38モノクローナル抗体の臨床治験が開始されている。本研究によって得られた、IgA腎症患者口蓋扁桃中IgA産生形質細胞増加は、扁桃摘出術だけでなくこうした治療薬の有用性を裏付ける可能性がある。我々は、最終年度に、フローサイトメトリーを用いて、IgA形質細胞中Long lived plasma cell(LLPC)サブセットを解析する手法を確立した。IgA産生Long lived plasma cellについては生理的・病態的意義について未解明な点が多いため、さらに詳細な検証が期待される。

研究成果の概要(英文)：From previous studies, we have found that patients with IgA nephropathy (IgAN) are characterized by increased blood levels of IgA1 with a reduced number of O-glycans (O-glycan decreased-IgA1). In this study, we aimed to clarify the role of the palatine tonsil as the production source of mother of production of IgA1 with abnormal glycan structures. The study revealed that patients with chronic tonsillitis without nephropathy have an increased percentage of O-glycan decreased IgA1 in their serum, similar to patients with IgAN, but that IgA levels are further increased in patients with IgAN. In the palatine tonsils, the percentage of IgA-producing plasma cells was found to be increased compared to patients with chronic tonsillitis. It is predicted that migration of IgA-producing plasma cells from the palatine tonsils into the bloodstream is involved in the pathogenesis of the disease.

研究分野：IgA腎症

キーワード：IgA腎症 O結合型糖鎖 口蓋扁桃 形質細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒンジ部に糖鎖異常をもつ IgA1 は、IgA 腎症患者の血中で増加することから、病因への関与が示唆されている。IgA1 はヒンジ部に N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、ガラクトース (Gal)、シアル酸 (NeuAc) から形成される O 結合型糖鎖を 3-6 本有している。研究代表者は、高分解能質量分析計を用いて IgA 腎症特異的糖鎖構造の同定を試みる中、日本人 IgA 腎症患者の特徴として、ヒンジ部 O 結合型糖鎖数の減少した IgA1 (O-glycan decreased-IgA1) の割合が血中で増加していることを見出した。その中でも 3GalNAc3Gal をヒンジ部に有する IgA1 の割合が日本人 IgA 腎症患者で健常者に比して増加していた¹。

IgA 腎症は、しばしば上気道感染や胃腸炎を契機に急性増悪するため、粘膜関連リンパ組織との関連が注目されている。アジアでは、口腔粘膜関連リンパ組織をターゲットにした口蓋扁桃摘出術が古くから行われており、近年、背景をマッチさせた日本の多施設後向きコホート試験で口蓋扁桃摘出術の腎保護効果が明らかとなった²。一方、欧米では、IgA 腎症患者血中には腸管由来 IgA 産生 B 細胞が増えていることや³、腸管粘膜関連リンパ組織をターゲットにした腸管選択的ステロイド薬の蛋白尿減少効果が報告されている⁴。以上の背景から、IgA 腎症発症に関わる IgA は粘膜関連リンパ組織から血中にミスホーミングした IgA 産生細胞から産生されると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、日本人 IgA 腎症に特異的な血中 IgA1 ヒンジ部 O 型糖鎖構造を有する IgA1 の産生母地としての口蓋扁桃の役割を明らかにするために、健常人、慢性扁桃炎患者、IgA 腎症患者の血清及び摘出口蓋扁桃組織を用いて、プロテオミクス/ゲノミクスの手法を駆使して明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

(1) 血清 IgA 値の比較

IgA 腎症と診断された患者 (IgAN) 68 名、口蓋扁桃摘出術を行った腎炎非発症慢性扁桃炎患者 (CT) 10 名、健常人 (HC) 20 名の血清を用いて、ELISA 法にて血清 IgA 値を測定した。

(2) 血清 IgA の O 結合型糖鎖構造解析

上記患者健常者の血清から IgA を精製し、ノイラミニダーゼにてシアル酸切除後、還元トリプシン処理し、液体クロマトグラフィー-高分解能質量分析計 (LC-HRMS) にて測定した。得られたスペクトラムは、Xcalibur にて解析し、Glycan Analyzer (MK1, Tokyo, Japan) を用いて O 結合型糖鎖構造解析を行った。

(3) 口蓋扁桃単核球サブセット解析

2021 年 4 月以降に口蓋扁桃摘出術を行った慢性扁桃炎患者 (CT) 10 例と IgA 腎症患者 (IgAN) 13 例の口蓋扁桃を細切し、コラゲナーゼ処理した後、密度勾配遠心法を用いて、単核球層を分離した。FcR ブロック後、抗 IgM 抗体、抗 IgA 抗体、抗 CD19 抗体で染色し、7-amino-actinomycinD (7-AAD) で死細胞除去したのち、セルソーター (Beckman Coulter MoFlo Astrios) で各分画細胞を回収した。

(4) 糖転移酵素発現比較

IgA1 ヒンジ部 O 結合型糖鎖形成に関わる糖転移酵素 (GALNT2, polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2; C1GalT1, core 1 1,3-galactosyltransferase; Cosmc, C1GalT1-specific molecular chaperone) の発現量をリアルタイム PCR-SYBR Green 法で確認した。

4. 研究成果

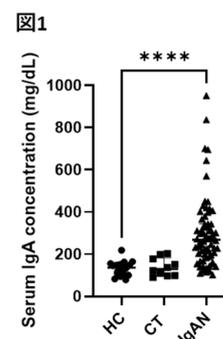
(1) 血清 IgA 値

血清 IgA 値は健常人にして IgA 腎症患者で有意に高かった。慢性扁桃炎患者と健常人の間に有意差は認められなかった (図 1)。

(2) 血清 IgA の O 結合型糖鎖構造解析

慢性扁桃炎患者は IgA 腎症患者と同様に、O-glycan decreased-IgA1 (ヒンジ部に 3 個 GalNAc を有する IgA1: IgA1 with 3 GalNAc residues) の割合が健常者に比して高いことが明らかとなった (図 2a)。その中でも IgA1 ヒンジ部に 3GalNAc3Gal を有する IgA1 の割合が、健常者に比して慢性扁桃炎患者や IgA 腎症患者で増加していた (図 2b)。

(3) 口蓋扁桃単核球サブセット解析



口蓋扁桃単核球の代表的なゲーティング戦略を図3 a-bに示す。死細胞除去後、CD19陽性もしくは陰性分画にゲーティングし、CD19陽性IgA陽性IgM陰性分画(IgA secreting B cell)、CD19陽性IgA陰性IgM陽性分画(Naive B cell)、CD19陰性IgA陽性IgM陰性分画(IgA plasma cell)の割合を算出した。CD19陰性細胞、CD19陽性細胞分画の割合は慢性扁桃炎/IgA腎症患者間で差がなく、IgA secreting B cell、Naive B cellの割合も慢性扁桃炎/IgA腎症患者間で差を認めなかった。一方で、IgA plasma cellの割合がIgA腎症患者で慢性扁桃炎患者に比して有意に増加していた(図3c)。

(4) 糖転移酵素発現比較

セルソーターを用いてNaive B cell、IgA secreting B cell、IgA plasma cell各分画細胞の各糖転移酵素(GALNT2、COSMC、C1GalT1)の発現量比較を試みた。IgA plasma cellの比較は細胞数が少なく解析が未完了である。慢性扁桃炎患者、IgA腎症患者ともに、GALNT2、C1GalT1はNaive B cellからIgA secreting B cellに分化するにしたがって発現量が顕著に低下することが明らかとなった。IgA secreting B cellのGALNT2の発現は慢性扁桃炎患者/IgA腎症患者間で差異は認めなかった(図4a)。COSMC、C1GalT1の発現量はIgA腎症患者で発現亢進していた(図4b-c)。

慢性扁桃炎患者とIgA腎症患者のIgA secreting B cellにおいて、O-glycan decreased-IgA1産生に寄与するGALNT2発現量は両者同等であった。しかしながら、IgA腎症患者ではIgA産生形質細胞が増加しており、この血中へのミスホーミングが血中IgA値増加およびO-glycan decreased-IgA1の割合および絶対量増加につながる可能性がある。

引用文献

- 1 Ohyama, Y. *et al.* Racial heterogeneity of IgA1 hinge-region O-glycoforms in patients with IgA nephropathy. *iScience* **25**, 105223, (2022).
- 2 Hirano, K. *et al.* Association Between Tonsillectomy and Outcomes in Patients With Immunoglobulin A Nephropathy. *JAMA Netw Open* **2**, e194772, (2019).
- 3 Sallustio, F. *et al.* High levels of gut-homing immunoglobulin A+ B lymphocytes support the pathogenic role of intestinal mucosal hyperresponsiveness in immunoglobulin A nephropathy patients. *Nephrol Dial Transplant* **36**, 452-464, (2021).
- 4 Fellstrom, B. C. *et al.* Targeted-release budesonide versus placebo in patients with IgA nephropathy (NEFIGAN): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet* **389**, 2117-2127, (2017).

図2

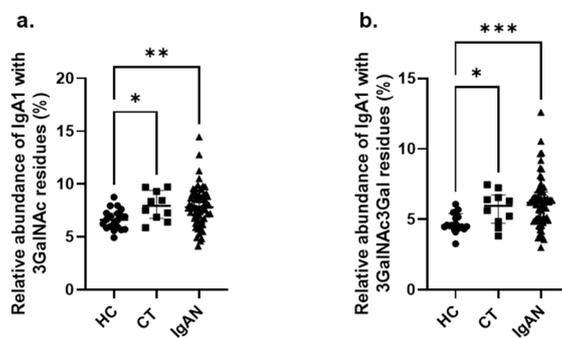
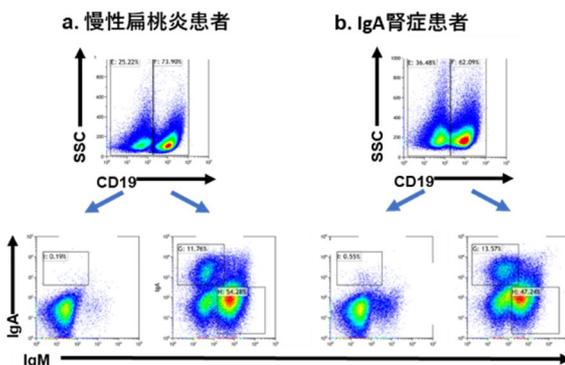


図3



c. CD19陰性IgA陽性細胞

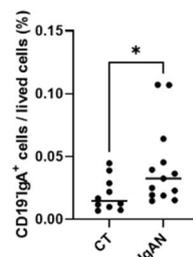
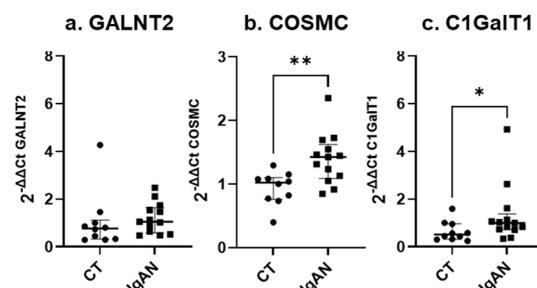


図4



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ohyama Y, Renfrow MB, Novak J, Takahashi K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Aberrantly Glycosylated IgA1 in IgA Nephropathy: What We Know and What We Don't Know.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 3467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm10163467	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 Ohyama Y., Yamaguchi H., Ogata S., Chiurlia S., Cox S. N., Kouri N. M., Stangou M. J., Nakajima K., Hayashi H., Inaguma D., Hasegawa M., Yuzawa Y., Tsuboi N., Renfrow M. B., Novak J., Papagianni A. A., Schena F. P., Takahashi K.	4. 巻 25
2. 論文標題 Aberrantly Glycosylated IgA1 in IgA Nephropathy: What We Know and What We Don't Know	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.105223	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yukako Ohyama, Hisateru Yamaguchi, Kazuki Nakajima, Hiroki Hayashi, Shigehisa Koide, Midori Hasegawa, Daijo Inaguma, Matthew B Renfrow, Jan Novak, Yukio Yuzawa, Naotake Tsuboi, Kazuo Takahashi
2. 発表標題 Longitudinal changes of IgA1 O-glycoforms in IgA nephropathy
3. 学会等名 16th International Symposium of IgA Nephropathy（国際学会）
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 アメリカ腎臓学会（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 ヨーロッパ腎臓学会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大山友香子、辻雄大、手塚裕之、稲熊大城、長谷川みどり、楯谷一郎、坪井直毅、高橋和男
2. 発表標題 IgA腎症における血中O結合型糖鎖異常IgA1増加と口蓋扁桃の関連
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yukako Ohyama, Tetsuro Enomoto, Yudai Tsuji, Hisateru Yamaguchi, Tomohiro Mizuno, Naotake Tsuboi, Kazuo Takahashi
2. 発表標題 The amount of complement factor H-related protein-1 in serum IgA immune complexes as a novel biomarker for IgA nephropathy
3. 学会等名 17 th International Symposium of IgA Nephropathy（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaya Hirayama, Yukako Ohyama, Tetsuro Enomoto, Yudai Tsuji, Naotake Tsuboi, Kazuo Takahashi
2. 発表標題 Longitudinal changes in IgA1 O- and N-glycoforms in IgA nephropathy
3. 学会等名 17 th International Symposium of IgA Nephropathy（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平山将也、大山友香子、辻雄大、坪井直毅、高橋和男
2. 発表標題 IgA腎症扁摘パルス治療群のO結合型糖鎖とN結合型糖鎖構造の治療前後変化
3. 学会等名 第46回IgA腎症研究会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大山友香子、高橋和男	4. 発行年 2022年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 6
3. 書名 腎と透析 92巻6号 IgA腎症－最新の知見	

〔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
---------	---------