

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591213

研究課題名(和文)糖鎖異常IgA1免疫複合体および扁桃細胞のIgA腎症における病態解明

研究課題名(英文) Pathogenic role of galactose-deficient IgA1 contained immune complexes and tonsillar cells 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：IgA腎症の病態において重要な役割をもつ糖鎖異常IgA1や糖鎖異常IgA1特異的抗体の産生は、IL-6によって産生が亢進することが明らかとなった。扁桃・ステロイド治療過程においてもこれらの血中レベルが改善することから、糖鎖異常IgA1や糖鎖異常IgA1特異的抗体の少なくとも一部は扁桃由来である可能性が示された。toll-like receptor (TLR) 9を介した粘膜免疫異常、a proliferation-inducing ligand (APRIL)がその産生機序に関与していると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Galactose-deficient IgA1 (Gd-IgA1) and Gd-IgA1-specific autoantibodies have a crucial roles in the pathogenesis of IgA nephropathy (IgAN). Inflammatory cytokine, such as IL-6 and IL-4, could increase the production of Gd-IgA1 in IgA1-producing cell lines through complex changes of specific glycosyltransferases. Tonsillectomy plus corticosteroid therapy (TSP) is one of the effective therapies for IgAN. After TSP, serum levels of Gd-IgA1 and Gd-IgA1-specific autoantibodies significantly decreased. Thus, a part of Gd-IgA1 and Gd-IgA1-specific autoantibodies in circulation might be originated from palatine tonsil. Dysregulation of mucosal immunity may induce the overproduction of Gd-IgA1 and Gd-IgA1-specific autoantibodies via activation of TLR9 and APRIL.

研究分野：IgA腎症

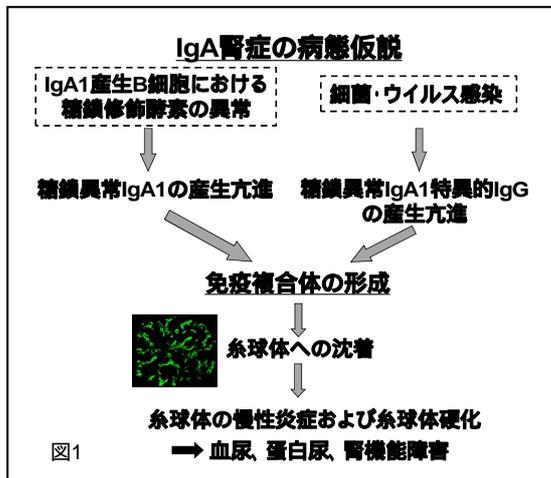
キーワード：IgA腎症 糖鎖 免疫複合体 粘膜免疫 扁桃

1. 研究開始当初の背景

■ IgA 分子の糖鎖構造異常

IgA 腎症は、IgA1 を含む免疫複合体の糸球体メサンギウム領域への沈着を特徴とする。これまでの研究により、IgA 腎症患者の血中には、IgA1 ヒンジ部の O-結合型糖鎖不全型 IgA1 が増加し、腎糸球体に沈着する IgA1 も糖鎖不全 IgA1 であることが明らかとなった (Hiki Y: *Kidney Int*, 2001, Alice AC: *Kidney Int*, 2001)。

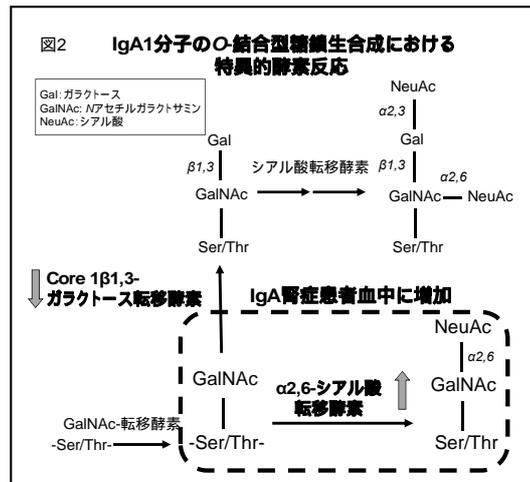
糖鎖異常 IgA1 が抗原として認識され、IgA や IgG と高分子の免疫複合体を形成することにより、肝臓でのクリアランスが遷延し、糸球体に沈着することが示唆されている (Tomana M: *J Clin Invest*, 1999, Mestecky J: *Kidney Blood Press Res*, 2008)。メサンギウム領域に沈着した高分子免疫複合体がメサンギウム細胞を活性化し、組織障害性のサイトカインを放出することで腎炎の発症・増悪に与与する可能性が示唆されている (Gomez-Guerrero C: *J Immunol*, 1994, Lai KN: *Nephrol Dial Transplant*, 2009)。



IgA1 産生 B 細胞株を用いた検証により、Gal を GalNAc に結合する $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素の活性の低下、および NeuAc を GalNAc に結合する $\alpha 2,6$ -シアル酸転移酵素の活性の亢進が、糖鎖異常 IgA1 の産生を促すことが明らかとなった (図 2) (Suzuki H: *J Clin Invest*, 2008)。この糖鎖修飾酵素の発現異常には、その一部は、IL-4 や IL-5 などの Th2 サイトカインによって規定されていることによって規定されている可能性がある。また、我々の予備実験により、 $\alpha 2,6$ -シアル酸転移酵素の活性を抑えることにより、Gal の GalNAc への糖鎖修飾を増加させることが期待できる。

我々は、IgA 腎症患者血清中に糖鎖異常 IgA1 を特異的に認識する IgG 抗体が増加していることを明らかにし、この糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG は、 V_H 遺伝子の可変領域 (complementarity determining region 3) (CDR3) のアミノ酸配列が変異 (A → S) していることを同定した (Suzuki H: *J Clin Invest*, 2009)。

さらに、血中糖鎖異常 IgA1、糖鎖異常 IgA1 特異的 IgA・IgG の測定系を確立し、これらバイオマーカーの logistic model 解析により、IgA 腎症を非侵襲的に診断する方法を確立することができ、有用性が期待される。



■ Toll like receptor 9 (TLR9) を介した粘膜免疫の異常

IgA 腎症では、上気道炎・扁桃炎などを契機に、血尿・蛋白尿が増悪することから、粘膜免疫応答の異常が本症の進展に関与していると考えられる。IgA 腎症モデルマウスでの解析で、感染に伴い脾臓での TLR9 および MyD88 の発現が亢進し、TLR9 のリガンドである CpG を鼻腔投与することで、血中 IgA-IgG 免疫複合体 (IC) の増加とともに腎症の増悪が認められた。さらに、ヒト IgA 腎症において、TLR9 遺伝子多型と腎症進展との有意な相関が示唆された (Suzuki H: *J Am Soc Nephrol*, 2008)。

IgA 腎症患者での扁桃摘出の有効性が指摘されているが、本治療の病態意義や適応基準については明らかではない。予後不良と予測される TLR9 の遺伝子多型をもつ患者で、扁桃摘出後の治療成績がよいことから、扁桃の病巣感染症の重要性が示唆される (Sato D: *Nephrol Dial Transplant*, 2011)。我々の基礎研究により、本治療が有効であった症例では、血中糖鎖異常 IgA1・糖鎖異常 IgA1 免疫複合体の低下が示されている。

IgA 腎症患者での扁桃摘出の有効性が指摘されているが、本治療の病態意義や適応基準については明らかではない。予後不良と予測される TLR9 の遺伝子多型をもつ患者で、扁桃摘出後の治療成績がよいことから、扁桃の病巣感染症の重要性が示唆される (Sato D: *Nephrol Dial Transplant*, 2011)。我々の基礎研究により、本治療が有効であった症例では、血中糖鎖異常 IgA1・糖鎖異常 IgA1 免疫複合体の低下が示されている。

2. 研究の目的

➤ 糖鎖異常 IgA1 および糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG 産生亢進のメカニズムの解明

IgA 腎症患者および健康人の末梢血より樹立

した IgA1-および IgG 細胞株を用いる。IgA1 産生細胞にて、CpG を用いた TLR9 の発現増強による、糖鎖修飾酵素の活性異常による糖鎖異常 IgA1 の産生亢進について検証する。IgG 産生細胞では、CpG 刺激によって V_H の CDR3 領域のアミノ酸配列変異が誘導されるか、また糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG の産生が亢進するかを解析する。さらに、この過程において BAFF や APRIL の産生亢進について解析する。

➤ 扁桃の基礎的病態解明および扁桃摘出術の適応基準の作成

摘出扁桃 B 細胞を用いて、A. TLR9 の発現量、B. 糖鎖異常 IgA1 の産生量とその糖鎖構造パターン、 β 1,3-ガラクトース転移酵素および α 2,6-シアル酸転移酵素活性、C. 糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG の産生量を解析する。扁桃摘出(扁桃摘)治療経過(扁桃摘前後、治療 1 年後、治療 2 年後)での扁桃摘治療が有効であった症例と有効でなかった症例で、上記 A-C について検証する。また、保存血清を用いて、扁桃摘治療経過(扁桃摘前後、治療 1 年後、治療 2 年後)での、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 IgA1-IgG IC)の推移を測定する。これらの解析により、扁桃摘治療の有効性を規定している因子を解明することができ、治療反応性の指標を明らかにし、かつ扁桃摘出術の適応基準を明確にする。

➤ 糖鎖異常 IgA1・糖鎖異常 IgA1 特異的抗体を標的とした新規治療法の開発

IgA1 特異的プロテアーゼでの IgA1 分子のヒンジ部位での切断、および siRNA を用いた α 2,6 シアル酸転移酵素の発現抑制による糖鎖異常 IgA1 の産生量の低下を動物モデルで検証する。さらに、上述した扁桃摘の治療適応を検証することに加え、糖鎖異常 IgA1 および糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG の産生系に対する siRNA や inhibitory CpG による TLR9 の抑制効果を動物モデルで検証する。

3. 研究の方法

➤ 糖鎖異常 IgA1 および糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG 産生亢進のメカニズムの解明

IgA 腎症患者と健常人の末梢血よりすでに樹立した IgA1-、IgG 産生細胞株および扁桃細胞 IgA1-IgG 産生細胞株を新たに樹立する(Suzuki H: *J Clin Invest*, 2008)。

I. IgA1 産生細胞にて、CpG を用いた TLR9 の発現増強や IL-6 などのサイトカインによる β 1,3-ガラクトース転移酵素および α 2,6-シアル酸転移酵素の発現を realTime PCR で解析する。また B 細胞よりゴルジ体を超遠心法にて分離し酵素活性を測定する。Gal 欠損型 IgA1 の産生亢進については、GalNAc 特異的な Helix aspersa agglutinin (HAA) レクチンにて測定する。

II. IgG 産生細胞にて、CpG や IL-6 などのサイトカインによって V_H の CDR3 領域のアミ

ノ酸配列変異変異(A S) (Suzuki H: *J Clin Invest*, 2009)が誘導されるか、その結果として糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG の産生が亢進するかを解析する。

➤ 扁桃の基礎的病態解明および扁桃摘の適応基準の作成

平成 24 ~ 25 年度内に当院にて IgA 腎症 (n=40) および疾患対照群(習慣性扁桃炎や睡眠時無呼吸症候群患者)(n=40) に対して扁桃摘出(扁桃摘)治療が行われた症例より扁桃細胞を分離する。また、同時に扁桃摘+ステロイドパルス(扁桃摘パルス)治療経過が追跡できた IgA 腎症患者(n=40)の血液・尿サンプル(扁桃摘前後、治療 1 年後、治療 2 年後)を凍結保存する

I. 摘出扁桃より B 細胞を FACS ソーティングにて分離培養する。まず B 細胞を用いて、A. TLR9 の発現量、B. 糖鎖異常 IgA1 の産生量とその糖鎖構造パターン、 β 1,3-ガラクトース転移酵素および α 2,6-シアル酸転移酵素の発現、C. 糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG の産生量、D. BAFF および APRIL の産生量を分析する。上記 A-D について、IgA 腎症と疾患対照群の扁桃由来 B 細胞で比較検証する。

II. 治療経過が追跡できた IgA 腎症患者の保存血清を用いて、すでに我々が測定系を確立したバイオマーカー(血中糖鎖異常 IgA1、糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG、IgA および IgA1-IgG IC)を測定する。同時に、臨床データ(血尿・蛋白尿・血清クレアチニン値)を分析する。

III. IgA 腎症患者における扁桃摘パルス治療前後の臨床経過で、扁桃摘パルス治療後に、尿中赤血球が 1~5/HPF 以下、および蛋白尿が陰性化した症例(a)、蛋白尿は陽性だが尿中赤血球が 1~5/HPF 以下の症例(b)、血尿は陽性だが蛋白尿が陰性化した症例(c)、および無効症例(d)に分類する。

➤ 糖鎖異常 IgA1・糖鎖異常 IgA1 特異的抗体を標的とした新規治療法の開発

糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG は、IgA1 ヒンジ部の GalNAc を認識することが明らかであり(Suzuki H: *J Clin Invest*, 2009)、IgA 腎症患者由来の IgA1 産生 B 細胞に siRNA を用いた α 2,6-シアル酸転移酵素の発現を抑制することで、 β 1,3-ガラクトース転移酵素活性が増加し、ヒンジ部のガラクトース化が亢進されるか否かを検証する。

さらに、糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG に対しては、上述した扁桃摘の治療適応を検証することに加え、siRNA や inhibitory CpG による TLR9 の発現抑制(Plitas G: *J Exp Med*, 2008)、また BAFF の中和抗体を用いることで糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG 産制低下の効果を検討する。

4. 研究成果

➤ 糖鎖異常 IgA1 および糖鎖異常 IgA1 特異

的 IgG 産生亢進のメカニズムの解明

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、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 産生細胞株を樹立した。まず IgA 産生細胞株に対し、各種サイトカインの刺激によって、IgA の産生および IgA1 の糖鎖構造・糖鎖修飾酵素の活性化を検証した。IL-6 や IL-4 により、ガラクトース欠損型、およびシアル酸過付加型の糖鎖異常 IgA1 の産生が亢進することが明らかとなり国際誌に発表した (*J Biol Chem.* 21: 5330-5339, 2014)。次に IgG 産生細胞株に対し、IL-6 の刺激によって免疫複合体形成を亢進させるような IgG の産生も亢進されることも示唆された。IgA 腎症では、扁桃炎などの上気道感染に伴い尿所見異常が増悪する。IgA 腎症の病態において、重要な役割をもつ糖鎖異常 IgA1 や糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG、糖鎖異常 IgA1 特異的 IgA の産生は、炎症性サイトカインによって、二次的に産生亢進がおこることが示された。

しかし、炎症もしくは感染によって、糖鎖異常 IgA1 や糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG、糖鎖異常 IgA1 特異的 IgA の産生がどのようなメカニズムで亢進するのかは明らかではない。今後の研究においては、TLR7 や TLR9 等の粘膜免疫応答の異常が BAFF や a proliferation-inducing ligand (APRIL) を介して異常な免疫グロブリンを産生するのか解析が必要である。

扁桃の基礎的病態解明および扁桃の適応基準の作成

本症における扁桃 B 細胞の役割を解明するため、2012 年から 2014 年までに当院にて扁桃およびステロイド/ピレス療が施行された IgA 腎症患者 36 名を対象とし、扁桃前・扁桃後・ステロイド/ピレス療経過中の血中のバイオマーカー(糖鎖異常 IgA1、糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG、および IgG-IgA 免疫複合体)を測定した。また、摘出された扁桃細胞を 48 時間培養し、培養上清中の糖鎖異常 IgA1 および糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG の産生量を測定した。尿所見異常の改善に伴い、血中糖鎖異常 IgA1・糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG・IgA1-IgG IC の有意な低下が認められ、扁桃/ピレス療の治療効果が高い患者群での扁桃細胞では、toll-like receptor (TLR) 9 の発現量が高く、糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG の産生量が有意に高値であった。以上より、IgA 腎症の病態において重要な役割を担う糖鎖異常 IgA1 や糖鎖異常 IgA1 特異的抗体の一部は、口蓋扁桃由来であることが明らかとなった。

さらに、扁桃 B 細胞における APRIL の発現が IgA 腎症患者で亢進していることも明らかとなり、APRIL の発現によって糖鎖異常 IgA1 および糖鎖異常 IgA1 特異的抗体の産生が亢進するものと考えられた。我々の基礎実験では APRIL の発現が強い扁桃細胞においては、糖鎖異常 IgA1 免疫複合体の産生が高いことが示された (ERA-EDTA 2015 にて発表)。しかし、IgA 腎症患者のな

かでも、扁桃細胞での糖鎖異常 IgA1 や糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG あるいは糖鎖異常 IgA1 特異的 IgA の産生量にばらつきが大きいこと、扁桃・ステロイド治療の治療効果にも差があるので、個々の症例において糖鎖異常 IgA1 や糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG、糖鎖異常 IgA1 特異的 IgA の産生部位を同定し、特異的治療標的分子を考えなければならない。

糖鎖異常 IgA1・糖鎖異常 IgA1 特異的抗体を標的とした新規治療法の開発

我々は、糖鎖異常 IgA1 と糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG を精製し、*in vitro* で免疫複合体を形成することを確認した。予備実験により、免疫複合体をヌードマウスに投与すると、糸球体に IgA の沈着を伴う糸球体腎炎を発症し、補体系を活性化させ、血尿・蛋白尿を呈することが明らかとなった。このことから、糖鎖異常 IgA1、もしくは、糖鎖異常 IgA1 特異的抗体のいずれかの産生を抑え、結果として免疫複合体形成を抑制することが、最も有効な治療法であると考えられる。

1. IgA プロテアーゼ

これまでの報告で IgA プロテアーゼを用いて免疫複合体の形成を軽減できたという研究がある。我々の予備実験では、*in vitro* では確かに IgA 分子の切断によって免疫複合体の形成を抑制できたが、有効な IgA プロテアーゼはバクテリアベースで作成され、*in vivo* では toxic に働き、有効な効果が得られないことがわかった。

11. TLR9 の抑制

糖鎖異常 IgA1 および糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG の産生系に対する TLR9 の関与が考えられる。まずは、マウスの脾細胞を用いて CpG の刺激による IgA の産生亢進を確認した。また、レクチンを用いた assay 系では糖鎖異常 IgA の増加を認め、IgA-IgG 免疫複合体の産生も亢進していた。次に、inhibitory CpG を IgA 腎症自然発症モデルマウスに投与し、血清および腎組織所見を解析した。血清 IgA、糖鎖異常 IgA および IgA-IgG 免疫複合体レベルが低下し、腎組織においては、糸球体の IgA、IgG 沈着の軽減および尿蛋白の改善がみられた (2015 年米国腎臓学会発表予定)。今後は、human の cell line を用いて同様の検証が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

1. Suzuki Y, Matsuzaki K, Suzuki H, et al. Serum levels of galactose-deficient immunoglobulin (Ig) A1 and related immune complex are associated with disease activity of IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol.* 18: 770-777, 2014.
2. Nakata J, Suzuki Y, Suzuki H, et al. Changes in Nephritogenic Serum Galactose-Deficient IgA1 in IgA

Nephropathy following Tonsillectomy and Steroid Therapy. *PLoS One* 21, e89707, 2014

3. Kiryluk K, Li Y, Scolari F, Suzuki H, Gharavi A et al. Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nat Genet* 46: 1187-96, 2014.
4. Yanagawa H, Suzuki H, et al. A panel of serum biomarkers differentiates IgA nephropathy from other renal diseases. *PLoS One* 23: e98081, 2014
5. Suzuki H, Novak J, et al. Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes. *J Biol Chem* 21: 5330-9, 2014

[学会発表](計9件)

1. Suzuki H, Suzuki Y, et al.: Tonsils of patients with IgA nephropathy contain cells producing aberrantly glycosylated IgA1 and anti-glycan antibodies : Implications for tonsillectomy. ISN World Congress of Nephrology, Hong Kong, 2013
2. Suzuki H, Yanagawa H, et al.: Pathogenic role of IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy. 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, USA, 2013
3. Suzuki H, Raska M, et al.: Cytokines Accentuate Synthesis of Galactose-deficient IgA1 in IgA Nephropathy by Dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II Enzymes. 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, USA, 2013
4. Suzuki H, Suzuki Y, et al.: Tonsillar Cells in Patients with IgA Nephropathy Produce Aberrantly Glycosylated IgA1 and Anti-glycan Antibodies. 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, USA, 2013
5. Suzuki H, et al.: The role of tonsillar cells in patients with IgA nephropathy. 14th Asian Pacific Congress of Nephrology, Tokyo, 2014

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 仁 (SUZUKI, Hitoshi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号 : 10468572

(2)研究協力者

鈴木 祐介 (SUZUKI, Yusuke)
順天堂大学・医学部・准教授
柳川 裕之 (YANAGAWA, Hiroyuki)

順天堂大学・医学部・大学院生
佐々木 洋平 (SASAKI Yohei)
順天堂大学・医学部・大学院生