

機関番号：33916

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890268

研究課題名(和文) IgA腎症病因解明に向けた免疫グロブリン糖鎖の詳細な解析と新規マーカー開発

研究課題名(英文) Molecular Characterization of Glycosylation on Immunoglobulins: Implication for Pathogenesis of IgA Nephropathy

研究代表者

高橋 和男 (Takahashi, Kazuo)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：90631391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、慢性糸球体腎炎で最多の疾患であるIgA腎症(IgAN)に認められる糖鎖異常IgA1の糖鎖構造を、高分解能質量分析計にて詳細に解析し、本症特異的な糖鎖構造の同定を試みた。ガラクトース(Gal)欠損を伴う糖鎖構造は健康者血清IgA1にも認められたが、IgAN血清IgA1により多く認められた。糖鎖付着部位の解析により、Gal欠損糖鎖付着部はランダムでなく、主に3ヶ所に限定することが明らかとなったが、健康者でも同部位に認められた。IgAN患者血清糖鎖異常IgA1の構造が糖鎖付着部位を含めて明らかとなった。詳細な異常糖鎖構造の同定はバイオマーカー開発や特異的な治療の開発へ大きな貢献となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：IgA1 with galactose (Gal)-deficient hinge-region O-glycans plays a key role in IgA nephropathy (IgAN). To characterize IgA1 involved with IgAN, O-glycan microheterogeneity and attachment sites should be analyzed. In this study, serum IgA1 from IgAN patients and healthy controls (HCs) was individually analyzed to define the glycosylation patterns and glycosylation sites using high-resolution mass spectrometry (MS). Although IgA1 from HCs contain some Gal-deficient O-glycans, the amount of Gal-deficient O-glycans in IgA1 from IgAN patients was greater than that in IgA1 O-glycans from HCs. Tandem MS revealed that the sites with Gal-deficient O-glycans included mainly three sites in IgA1 from IgAN patients as well as IgA1 from HCs. This study shows first definitive identification of O-glycosylation including sites at attachment on IgA1 from IgAN patients. Our protocol provides useful information relevant to pathogenesis of IgAN through the identification of distinct O-glycosylation patterns.

研究分野：医歯薬学

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 質量分析 バイオマーカー探索 免疫グロブリン

1. 研究開始当初の背景

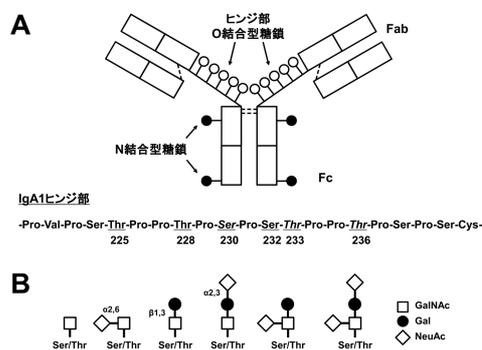
IgA 腎症 (IgAN) は本邦において CGN の約 40% を占める高頻度な腎炎で、20 年の経過で約 40% が末期腎不全に陥る。IgAN は既存のマーカーでは診断できず腎生検でのみで確定診断されるが、腎生検は侵襲的で入院を要する。本症は早期の介入で予後改善が見込まれ、非侵襲的な早期診断法が求められている。さらに、治療適応や疾患活動性を評価する特異マーカーは現在ない。

2. 研究の目的

IgAN では、血中及び沈着 IgA1 のヒンジ部でガラクトース (Gal) の欠損した O 型糖鎖を高頻度に認める (Hiki Y. et al, *Kidney Int.* 59:1077-85, 2001)。図 1 に IgA1 ヒンジ部糖鎖構造を示す。研究代表者らは IgA1 ヒンジ部 O 型糖鎖の解析に質量分析計 (MS) を用いて取り組み、糖鎖異常部位を含む糖鎖付着部位をすべて解析する方法を開発した (Takahashi K. et al, *Mol Cell Proteomics.* 9: 2545-57, 2010)。続けて、糖鎖不全部位はランダムではなくある特定の部位に生じることを報告した (Takahashi K. et al, *J Proteome Res.* 11:692-702, 2012)。健常者血清 IgA1 糖鎖を同様に MS にて解析すると、糖鎖不全 IgA1 は患者に比しやや少ないものの存在し、糖鎖不全 IgA1 のみで IgAN の病因を説明できない。一方その IgA1 ヒンジ部 O 型糖鎖に対する糖鎖特異的 IgG 抗体を患者血清で認め (Suzuki H. et al, *J Clin Invest.* 119:1668-77, 2009)、さらに IgA 型の糖鎖不全抗体の存在も報告された。この糖鎖不全 IgA1 を含む免疫複合体 (IgA1-IgG 又は IgA1-IgA1) が糸球体に沈着し腎炎を生じると考えられる。

このように IgAN では、免疫グロブリン糖鎖が病因と深く関わるが、正確な糖鎖構造、エピトープ、炎症への関与は未だ明らかではない。そこで本研究では、高分解能 MS を用いて IgAN における免疫グロブリン糖鎖構造を明らかとし、本症特異的糖鎖構造の同定を試みた。

図 1. IgA1 の構造とヒンジ部糖鎖



(A) IgA1 はヒンジ部に O 結合型糖鎖を 3-6 個持ち、N 結合型糖鎖を 2 か所に持つ。アンダーラインの Ser/Thr は通常 O 結合型糖鎖の結合を認める。斜体の Ser/Thr は Gal 欠損 O 結合型糖鎖結合が報告されている部位を

示す。Gal 欠損 GalNAc を糖鎖異常 IgA1 特異的 IgG 抗体が認識すると考えられる。IgA1 ヒンジ部糖鎖のバリエーション (B) Ser/Thr に GalNAc が結合しその外側に Gal, NeuAc が結合する。ヒンジ部糖鎖は、糖鎖数、糖鎖構造、結合部位、にて多数のパラエティを持つ。

3. 研究の方法

レクチン ELISA

IgAN 患者 5 名、健常者 5 名の血清の糖鎖異常 IgA1 を、末端 N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 特異的レクチンである Helix aspersa lectin (HAA) を用い、糖鎖異常 IgA1 (骨髓腫 IgA1; Ale) に対する % を産生した (% HAA)。% HAA 値に血清 IgA1 値をかけることにより血清糖鎖異常 IgA1 値 (Gal-deficient-IgA1; Gd-IgA1) を総量として算出した (U/ml) (Berthoux F. et al. *J Am Soc Nephrol.* 23:1579-87, 2012)。

IgA1 分離・酵素処理

IgA 腎症患者 5 名、健常者 5 名の血清より、IgA1 抗体カラムを用い IgA1 を分離した。シアリダーゼ処理後トリプシンにて酵素処理した。

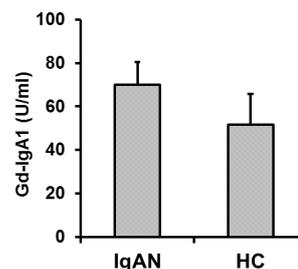
高分解能質量分析 (MS)

酵素処理後の IgA1 は C18 カラムを用いペプチド、糖ペプチドを分離後、Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific) にて解析した。LC 条件は以前の報告と同様に行った (Takahashi K. et al, *J Proteome Res.* 11:692-702, 2012)。得られたスペクトラムは、Xcalibur にて解析し、糖鎖構造は GlycoMod を用いて同定した。

4. 研究成果

IgAN 患者 5 名 (IgAN)、健常者 5 名 (HC) の血清糖鎖異常 IgA1 (Gd-IgA1) を HAA-ELISA にて検出したところ、IgAN 患者では有意に血清 Gd-IgA1 を多く含んでいた (図 2)。しかし HAA-ELISA では糖鎖異常 IgA1 の量は測定できるが詳細な構造の同定はできない。

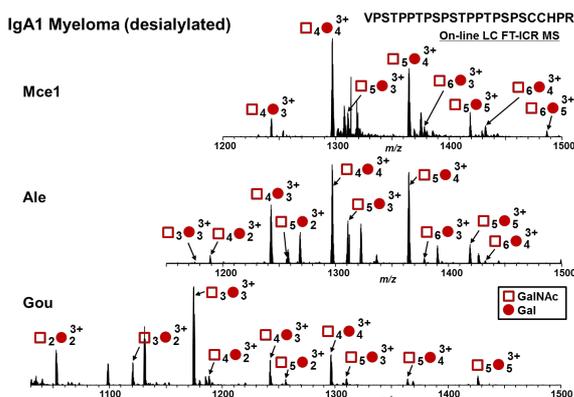
図 2 HAA-ELISA



一方精製 IgA1 を酵素処理後に糖ペプチドの形で MS にて解析することにより、IgA1 のもつ O 型糖鎖のパラエティを検出することが可能で、さらにピークの高さにより相対定量ができる。図 3 に IgA1 産生骨髓腫 3 名 (Mce1, Ale, Gou) の O 型糖鎖のパラエティを示す。これら 3 例は HAA-ELISA 値はシアリダーゼ処理後はほぼ同等であり、高度の Gd-IgA1 を持つことがわかっていたが、3 例

の骨髓腫 IgA1 は異なる O 型糖鎖のパラエティを持っていた。以上より血清 IgA1 の O 型糖鎖パラエティは MS にて正確に解析が可能であった。

図 3. 高分解能 MS による 3 例の IgA1 骨髓腫 (Mce1, Ale, Gou) の血清 IgA1 の O 結合型糖鎖のパラエティの解析



それぞれのピークは異なる糖鎖構造を示し、ピークの高さはその相対的な量を示す。すなわち Mce1 ではヒンジ部に 4-6 個の糖鎖のパラエティを持ち (GalNAc の数であらわされる), Ale は 3-6 個の糖鎖を持つ。Gou では 2-5 個の糖鎖を持つことがわかる。

そこで IgAN 患者血清 5 例, 健常者血清 5 例より IgA1 を分離し, それぞれ高分解能 MS にて糖鎖のパラエティを同定した。健常者, IgAN 共に IgA1 には 3-6 個の糖鎖を持ち, 健常者でも Gal 欠損糖鎖を認めた。GalNAc 欠損糖鎖は IgAN に多く認めたものの, 差は大きくはなかった。

次に高分解能 MS で electron transfer dissociation (ETD) を行うことにより, 糖鎖付着部位の解析を行った。糖鎖付着部の解析により Gal 欠損糖鎖の付着部はランダムではなく, ヒンジ部の 3ヶ所に限定されることが明らかとなったが, 健常者でも同様の位置に認め, 患者のみに存在する糖鎖異常部位はなかった, 患者に多く認める糖鎖構造は明らかとなった。以上の糖鎖解析から, 患者に多く認める糖鎖構造は認めるものの, その糖鎖異常部位は健常者と同じであり, 糖鎖異常 IgA1 の存在のみで本症の病因を説明できないことがわかった。

IgAN では IgA1 ヒンジ部 O 型糖鎖に対する糖鎖特異的 IgG 抗体を血清に認めることが報告されている。そこで糖鎖特異的 IgG 抗体が認識する IgA1 ヒンジ部 O 型糖鎖構造の同定をめざし, IgAN 患者の血清 IgG に結合する糖鎖異常 IgA1 の精製分離を試みたが, 少量のみの分離であり MS 解析は困難であった。今後分離量の増加をはかり, 特異的構造の同定を試みる予定である。

本研究により IgAN 患者血清糖鎖異常 IgA1 の構造が糖鎖付着部位を含めて初めて明らかとなった。糖鎖特異的糖鎖の同定は困難であったが, 本症血清中の糖鎖特異的自己抗体

が, 糖鎖異常部位をエピトープとして認識し免疫複合体の形成がなされると考えられるため, 詳細な異常糖鎖構造の部位を含めた同定の意義は大きく, 今後のバイオマーカー開発や特異的な治療の開発へ大きな貢献になると考えられる。

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 4 件)

- 1) Takahashi K, Raska M, Stuchlova Horynova M, Hall SD, Poulsen K, Kilian M, Hiki Y, Yuzawa Y, Moldoveanu Z, Julian BA, Renfrow MB, Novak J. Enzymatic Sialylation of IgA1 O-glycans: Implications for Studies of IgA Nephropathy. PLoS ONE 2014 In-press (査読あり)
- 2) Yamamoto Y, Hiki Y, Nakai S, Yamamoto K, Takahashi K, Koide S, Murakami K, Tomita M, Hasegawa M, Kawashima S, Sugiyama S, Yuzawa Y. Comparison of effective impact among tonsillectomy alone, tonsillectomy combined with oral steroid and with steroid pulse therapy on long-term outcome of immunoglobulin A nephropathy. Clin Exp Nephrol. 17:218-24. 2013 (査読あり)
- 3) Yamamoto K, Hori H, Yamamoto Y, Takahashi K, Yuzawa Y, Hiki Y. Development of a polyclonal antibody against synthetic human immunoglobulin A1 hinge glycopeptide. J Glycobiol. 1:103. 2013 (査読あり)
- 4) 高橋和男, 湯澤由紀夫. IgA 腎症の治療・病因のトピック: 扁桃摘出術+ステロイドパルス療法と糖鎖異常 IgA1. 口腔・咽頭科 2014 In-press (査読あり)

[学会発表](計 15 件)

- 1) Takahashi K, Kondo A, Hirano D, Akiyama S, Hayashi H, Koide S, Hasegawa M, Yoshida S, Hiki Y, Miura K, Yuzawa Y. IgA Antibodies to Glomerular Endothelial Cells in Patients with Lupus Nephritis: Correlations with Renal Injury. 46th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Atlanta, GA, 2013.
- 2) Takahashi K, Raska M, Stuchlova Horynova M, Kasperova A, Hall S, Hiki Y, Yuzawa Y, Moldoveanu Z, Julian BA, Renfrow MB, Novak J. Enzymatic Sialylation of IgA1 Hinge-region: Pathogenic Role of Sialic Acid in IgA Nephropathy (IgAN). 46th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Atlanta, GA, 2013.
- 3) Takahashi K, Raska M, Stewart T, Stuchlova Horynova M, Hargett A, Kasperova A, Hall S, Hiki Y, Yuzawa Y, Julian BA, Moldoveanu Z, Renfrow MB, Novak J. Synthesis of Galactose-deficient IgA1 O-glycans by GalNAc-transferases: Implications for the

Pathogenesis of IgA Nephropathy. 12th Human Proteome Organization World Congress, Yokohama, Japan, 2013. Selected as oral presentation.

4) Takahashi K, Suzuki H, Yamada K, Hall S, Moldoveanu Z, Poulsen K, Kilian M, Mestecky J, Julian BA, Renfrow MB, Novak J. Molecular Characterization of IgA1 Secreted by IgA1-producing Cell Lines from Patients with IgA Nephropathy. 13th International IgA Nephropathy Symposium, Nanjing, China, 2013

5) Takahashi K, Raska M, Stewart T, Stuchlova Horynova M, Hargett A, Kasperova A, Hall S, Hiki Y, Yuzawa Y, Julian BA, Moldoveanu Z, Renfrow MB, Novak J. Synthesis of Galactose-deficient IgA1 O-glycans by GalNAc-transferases in IgA1-producing Cells: Implications for The Pathogenesis of IgA Nephropathy. 13th International IgA Nephropathy Symposium, Nanjing, China, 2013

6) Takahashi K, Kondo A, Akiyama S, Hayashi H, Koide S, Tomita M, Hasegawa M, Yoshida S, Hiki Y, Miura K, Yuzawa Y. Identification of anti-endothelial cell antibody in patients with IgA nephropathy. 13th International IgA Nephropathy Symposium, Nanjing, China, 2013

7) Takahashi K; Raska M; Horynova-Stuchlova M; Kasperova A; Hall SD; Hiki Y; Yuzawa Y; Moldoveanu; Julian BA; Renfrow MB; Novak J. Enzymatic sialylation of IgA1 hinge-region: toward the understanding of pathogenic role of sialic acid in IgA nephropathy. 61th Annual ASMS meeting, Minneapolis, MN, 2013

8) Takahashi K, Raska M, Stuchlova-Horynova M, Kasperova A, Hall SD, Hiki Y, Yuzawa Y, Julian BA, Moldoveanu Z, Renfrow MB, Novak J. Synthesis of Galactose-Deficient IgA1 O-Glycans by GalNAc-Transferases Expressed in IgA1-Producing Cells: Implications for the Pathogenesis of IgA Nephropathy. 45th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, San Diego, CA, 2012.

9) Takahashi K, Suzuki H, Yamada K, Hall S, Moldoveanu, Poulsen K, Mestecky J, Julian BA, Renfrow MB, Novak J. Molecular Characterization of IgA1 Secreted by IgA1-Producing Cell Lines from Patients with IgA Nephropathy. 45th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, San Diego, CA, 2012

10) Takahashi K, Suzuki H, Yamada K, Hall S, Moldoveanu Z, Poulsen K, Kilian M, Mestecky J, Julian BA, Renfrow MB, Novak J. Molecular Characterization of IgA1 Secreted by IgA1-producing Cell Lines from Patients with IgA Nephropathy. 60th Annual ASMS meeting, Vancouver, BC, 2012

11) 高橋和男, 鈴木仁, 比企能之, 湯澤由紀夫, Matthew B. Renfrow, Jan Novak. IgA1 の O 結合型糖鎖解析、糖鎖異常 IgA1 と免疫複合

体. 第 56 回日本腎臓学会総会総会長特別企画, 東京

12) 近藤亜矢子, 高橋和男, 秋山真一, 林宏樹, 小出滋久, 富田亮, 長谷川みどり, 比企能之, 三浦恵二, 湯澤由紀夫. IgA 腎症における抗血管内皮細胞抗体の検出. 56 回日本腎臓学会総会, 東京

13) 近藤亜矢子, 高橋和男, 秋山真一, 林宏樹, 小出滋久, 富田亮, 長谷川みどり, 比企能之, 三浦恵二, 湯澤由紀夫. ループス腎炎における抗血管内皮細胞抗体の検出と膜表面抗原の同定. 56 回日本腎臓学会総会, 東京

14) 高橋和男, 近藤亜矢子, 比企能之, 三浦恵二, 湯澤由紀夫, IgA 腎症における抗血管内皮細胞抗体の検出, 第 36 回 IgA 腎症研究会, 東京, 2013

15) 高橋和男, 比企能之, 湯澤由紀夫, Renfrow Matthew B., Novak Jan, IgA 腎症病因解明に向けた、糖転移酵素による IgA1 ヒンジ部糖鎖付加の検討, 第 37 回日本医用マススペクトル学会年会; 名古屋市, 2012

〔図書〕(計 2 件)

1) 高橋和男, 湯澤由紀夫. IgA 腎症 (成人): ステロイド療法の適応と実際, 腎疾患・透析最新の治療 2014-2016, 南江堂. 2014

2) 高橋和男, 湯澤由紀夫. IgA 腎症. 今日の臨床サポート, エルゼビア・ジャパン. オンラインサービス. 2013

〔その他〕

ホームページ

藤田保健衛生大学医学部腎内科学 IgA 腎症研究グループ

<http://fujita-jin.blogat.jp/blog/2013/02/iga-f52d.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 和男 (TAKAHASHI KAZUO)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号: 90631391