

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860321

研究課題名(和文) 関節リウマチにおけるIgGシアル酸の意義と新規治療戦略

研究課題名(英文) Role of sialylated IgG and novel therapeutic strategy in rheumatoid arthritis

研究代表者

大海 雄介(Ohmi, Yuhsuke)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：10584758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：IgGのFc領域にはN型糖鎖結合部位が一箇所あり多様な糖鎖構造が結合しているが、その機能は不明な点が多い。そこで、活性化B細胞特異的なST6Gal1欠損マウスを樹立し、IgG上のシアル酸欠損マウスに関節炎を惹起した結果、シアル酸欠損マウスでは、正常なマウスに比べリウマチ症状が悪化することが明らかになった。一方、シアル酸を付加した自己抗体IgGを関節リウマチモデルマウスに投与すると、リウマチ症状をむしろ抑制することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Although IgG molecule has single N-glycosylation site in the Fc region and various glycosylation patterns have been reported, their functions have been unclear. Then, we have established ST6Gal1-deficient mice lines lacking sialic acids specifically in activated B cells, and have tried to induce experimental arthritis in them. Consequently, it has been demonstrated that sialylation-deficient mice exhibit exacerbation of RA features compared to wild type mice. On the other hand, administration of sialylated auto-antibody IgG into RA-model mice resulted in rather suppression of clinical features of RA.

研究分野：生化学、糖鎖生物学、免疫学

キーワード：関節リウマチ 自己抗体 シアル酸 N型糖鎖 CIA IgG ST6Gal1

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは罹患率が1%に及ぶ自己免疫疾患であり、慢性的な破壊性関節炎を惹起する。また、RA患者の血清には自己抗体が認められるが、中でもシトルリン化タンパク質に対する抗体価が病態と最も相関することから、診断用のマーカーとして使用されている。しかし、この抗シトルリン化タンパク質抗体(ACPA)の性状や発症への関与についての詳細は不明な点が多い。一方、IgGはFc領域にN型糖鎖(Fc-N glycan)結合部位を一箇所(二量体で二箇所)持ち、多様な糖鎖構造が形成されている。また近年、Fc-N glycanが抗体機能の調節に関与するという報告が散見される。中でも、免疫グロブリン大量静注療法(IVIg)の抗炎症効果において、投与するIgGのFc-N glycanにシアル酸を過剰に付加することによって、IVIgの効果を高めることができることが分かっている(Anthony RM et al: *Science*. 2008)。また、T細胞非依存的な活性化B細胞によって産生されたIgGはFc-N glycanの末端シアル酸(Fc-Sia)が増加し、その後の同一抗原に対する免疫反応を抑制するとの報告がある(Hess C et al: *J Clin Invest*. 2013)。さらにRA患者ACPAにおいてはFc-Siaの減少が確認されている(Scherer HU et al: *Arthritis Rheum*. 2010)。一方、我々の研究においてもRAを発症させたHLA-DR4マウス(シトルリン化したフィブリノーゲン(cit-Fib)の免疫によってRAを誘発するRAモデルマウス)において産生される自己抗体の糖鎖構造をLC/MSを用いて調べたところ、naïve HLA-DR4マウスの血清IgGと比べ、末端シアル酸が減少していることが判明した。このようにIgGはFc-N glycanにシアル酸が付加すると抗炎症反応を、また、シアル酸が欠失すると炎症反応を亢進させることが推測される。

## 2. 研究の目的

我々はRAで産生される自己抗体IgGのシアル酸機能に注目し、RAにおける自己抗体上の糖鎖の病態への関与を明らかにすることを目指した。そこで、IgGシアル酸の変化が実際にRA病態に関与しているのかを明らかにするため、下記の検討を行う。(1)人工的にシアル酸を修飾した自己抗体がRAモデルマウスの病態にどのような影響を与えるかを検討する。(2)IgG末端シアル酸欠損RAモデルマウスを作製し、in vivoにてFc-SiaがRAの病態にどのように関与するかを検討する。(3)RA患者ACPAの病態への関与と、ヒトRAにおいてもIgG上のシアル酸がRAの病態に関与するかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)シアル酸付加IgG自己抗体の機能解析 hybridoma (ACC4及びM2139)はRA自己抗

原に対する抗体であり、DBA1マウスに投与する事によってリウマチ症状を惹起する事が可能である。また、現在までにACC4及びM2139にFc-Sia付加したACC4 Sia+及びM2139 Sia+を作成することによって、RA誘導抗体によるRA発症機能を休止できることを示した。そこでシアル酸付加による自己抗体機能の変化を検討する。

(2)IgGシアル酸欠損RAモデルマウスを用いたFc-SiaのRA病態への影響の検討

糖鎖構造のガラクトースに $\alpha 2,6$ 結合でシアル酸を付加させる糖転移酵素ST6Gal1を活性化B細胞で特異的に欠損したST6Gal1 flox/flox AID creマウスは、IgGのFc-Siaを欠損する。本実験では上記マウスを用いて、RA症状の発症にFc-Siaが関与するのかがin vivoで解明する。

(3)RA患者ACPAの機能と糖鎖構造の検討

上記マウス実験にて確認された自己抗体IgGのシアル酸機能について、RA患者の自己抗体でも同様の抑制機能を示すかを明らかにするため、RA患者ACPAのシアル酸機能を検討する。

## 4. 研究成果

(1)シアル酸が付加した自己抗体ACC4とM2139に対して、それぞれCCP(環状シトルリン化ペプチド)とII型コラーゲンをコートしたプレートを使ってELISAを行った結果、シアル酸が付加していない自己抗体と比べても、シアル酸付加したACC4とM2139は共に、抗原への結合性に変化は無かった。これはシアル酸付加の影響が、抗原への結合性には関与しない事を示唆している。

また、シアル酸が付加した自己抗体ACC4とM2139をDBAマウスの投与したのち、マウスから血清を回収した、生体内でのシアルさん付加抗体の存在率をELISAとlectin blotにて検討したところ、シアル酸が付加した自己抗体は投与後1週間では血清中に多く存在していたが、2週間のちに減少することが判明した。

今後は、Fc領域の機能を明らかにするため、Fc Rとの結合性と、CDC,ADCCの反応性についての課題が残されている。

(2)ST6Gal1遺伝子の活性化モチーフをコードしている exon4 を挟むように loxP 配列を挿入したコンストラクトをB6マウスES細胞に導入し、ST6Gal1 flox/floxマウスを作成した。活性化型B細胞で特異的に発現するAID遺伝子のプロモーターにCreレコンビナーゼ遺伝子を連結したコンストラクトを持つAID-Creマウスと上記 floxdマウスを交配させた。これにより活性化型B細胞で特異的にST6Gal1遺伝子を欠損させたIgGシアル酸欠損マウス(ST6Gal1 flox/flox AID creマウス)を作成した。ST6Gal1 flox/flox AID-Cre

マウス群とコントロールとして AID-Cre マウス群に II 型コラーゲンを皮内に投与し、II 型コラーゲン誘導型関節炎 (CIA) を誘導した所、コントロールである AID-Cre マウスに比べて、ST6Gal1 flox/flox AID cre マウスでは、CIA の発症率が亢進した。またマウス関節組織を確認したところ、ST6Gal1 flox/flox AID-Cre マウスでは好中球や単球などの炎症細胞が浸潤し、関節軟骨の吸収が認められた。また ST6Gal1 flox/flox AID cre マウスから産生される抗原特異的 IgG の量はコントロールマウスに比べ、変化は無かったが、血中 IgG の量はかすかに減少した。これらの結果は、IgG 上のシアル酸の欠損が、関節炎の病態の増悪に関与する事を示している。

(3) RA 患者からの自己抗体の糖鎖構造を MS 解析するため、ACPA 陽性 RA 患者と健常人の血清から CCP1 カラムを用いて ACPA を精製し、それ以外の血中 IgG を ProteinG にて回収した。これらの IgG の糖鎖構造を解析するため、IgG とトリプシン処理し、Fc 領域の糖ペプチドを LC-ESI-MS にて解析した。その結果、健常人からの血中 IgG と比べて、RA 患者からの自己抗体 (ACPA) では明らかに IgG 上のシアル酸が減少していた。さらに、シアル酸が結合するガラクトースの減少も確認した。また、RA 患者からの自己抗体とそれ以外の血中 IgG を比べると、大きな変化は見られなかった。これは、RA 患者の血中 IgG では自己抗体だけでなく、全体的にシアル酸が減少する事を示唆している。

また、これらの研究成果は 2015 年度に Nature Communications にアクセプトされた。

#### 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 7 件)すべて査読あり  
Yusuke Makino, Kazunori Hamamura, Yoshifumi Takei, Robiul Hasan Bhuiyan, Yuki Ohkawa, Yuhsuke Ohmi, Hideyuki Nakashima, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa. A therapeutic trial of human melanomas with combined small interfering RNAs targeting adaptor molecules p130Cas and paxillin activated under expression of ganglioside GD3. *Biochim Biophys Acta*. 2016. In press

Yuhsuke Ohmi, Wataru Ise, Akira Harazono, Daisuke Takakura, Hidehiro Fukuyama, Yoshihiro Baba, Masashi Narazaki, Hirofumi Shoda, Nobunori Takahashi, Yuki Ohkawa, Shuting Ji, Fumihiro Sugiyama, Keishi Fujio,

Atsushi Kumanogoh, Kazuhiko Yamamoto, Nana Kawasaki, Tomohiro Kurosaki, Yoshimasa Takahashi, Koichi Furukawa. Sialylation converts arthritogenic IgG into inhibitors of collagen-induced arthritis. *Nat Commun*. 7, 11205, 2016.

Yuki Ohkawa, Hiroyuki Momota, Akira Kato, Noboru Hashimoto, Yusuke Tsuda, Norihiro Kotani, Koichi Honke, Akio Suzumura, Keiko Furukawa, Yuhsuke Ohmi, Atsushi Natsume, Toshihiko Wakabayashi and Koichi Furukawa. Ganglioside GD3 enhances invasiveness of gliomas by forming a complex with platelet-derived growth factor receptor and Yes. *J Biol Chem*. 290.16043-58, 2015.

Koichi Furukawa, Yuhsuke Ohmi, Yuji Kondo, Yuki Ohkawa, Ori Tajima, Keiko Furukawa: Regulatory Function of Glycosphingolipids in the Inflammation and Degeneration. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 571,58-65, 2015.

Shuting Ji, Yuki Ohkawa, Kyohei Tokizane, Yuhsuke Ohmi, Ryoichi Banno, Keiko Furukawa, Hiroshi Kiyama, Koichi Furukawa. b-series gangliosides crucially regulate leptin secretion in adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 459,189-95, 2015.

Koichi Furukawa, Yuhsuke Ohmi, Yuki Ohkawa, Ori Tajima, Keiko Furukawa. Glycosphingolipids in the regulation of the nervous system. *Adv Neurobiol*. 9, 307-20, 2014.

Yuhsuke Ohmi, Yuki Ohkawa, Ori Tajima, Yasuo Sugiura, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa. Ganglioside deficiency causes inflammation and neurodegeneration via the activation of complement system in the spinal cord. *J Neuroinflammation*. 11: 61, 2014.

[学会発表](計 5 件)

大海雄介、伊藤涉、原園景、川崎ナナ、黒崎知博、高橋宣聖、古川鋼一。シアル酸付加リウマチ抗原特異的 IgG は関節リウマチを抑制する。第 34 回日本糖質学会年会。東京大学 (2015 年 7 月 31 日-8 月 2 日 東京都文京区)

大海雄介、伊藤涉、原園景、福山英啓、川崎ナナ、黒崎知博、高橋宣聖、古川鋼一。抗原特異的 IgG へのシアル酸付加は関節リウマチを抑制する。BMB2015 第

38 回日本分子生物学会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会.神戸ポートアイランド (2015 年 12 月 1 日-4 日 兵庫県神戸市)

大海雄介、伊勢涉、原園景、川崎ナナ、黒崎知博、高橋宜聖、古川鋼一. シアル酸付加リウマチ抗原特異的 IgG は関節リウマチを抑制する. 第 5 回名古屋大学・生理学研究所合同シンポ. 生理学研究所 (2015 年 9 月 19 日 愛知県岡崎市)

Yuhsuke Ohmi, Wataru Ise, Yoshimasa Takahashi, Akira Harazono, Hidehiro Fukuyama, Nana Kawasaki, Tomohiro Kurosaki, Koichi Furukawa. Function analysis of the sialic acid on antigen specific IgG in rheumatoid arthritis. 第 87 回日本生化学会大会. 国立京都国際会館 (2014 年 10 月 15 日-18 日 京都府左京区)

大海雄介、伊勢涉、高橋宜聖、原園景、川崎ナナ、黒崎知博、古川鋼一. 関節リウマチにおける抗原特異的 IgG 糖鎖の機能解析. 第 33 回日本糖質学会年会. 名古屋大学 (2014 年 8 月 10 日-12 日 愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 3 件)

古川鋼一、大川祐樹、松本康之、大海雄介、橋本登、山内祥生、古川圭子. 糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック: 創薬・医療から食品開発まで. ガングリオシドによるがんの悪性形質の制御機構-神経外胚葉系腫瘍 株式会社 エヌ・ティー・エス 678 ページ, pp23-26, 2015.

Koichi Furukawa, Yuhsuke Ohmi, Kondo, Yuji, Ohkawa, Yuki Ohkawa, Noboru Hashimoto, Orié Tajima, Keiko Furukawa.: The role of glycosphingolipids in lipid rafts: lessons from knockout mice. *In* Lipid Rafts: Properties, controversies and roles in signal transduction. Ed. by Dan Sillence, 270 ページ, pp1-20, Nova Science Publishers, London, 2014.

Koichi Furukawa, Yuhsuke Ohmi, Yuki Ohkawa, Noboru Hashimoto, Yoshio Yamauchi, Orié Tajima, Keiko Furukawa: Gangliosides, synthesis and function in nervous tissues. *In Glycoscience: Biology and Medicine* Eds by N. Taniguchi, T. Endo, G. Hart, P. Seeberger, C.-H. Wong, Springer, 1569 ページ, pp 551-556, New Delhi, 2014.

(1) 研究代表者

大海 雄介 (OHMI YUSUKE)  
名古屋大学・医学系研究科・特任助教  
研究者番号: 10584758

(2) 研究分担者

なし