

令和元年6月5日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19572

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける糖鎖制御機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of aberrant glycosylation in rheumatoid arthritis

研究代表者

伊藤 清亮 (Ito, Kiyooki)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：10467110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ患者血中IgGにおいては、結合しているN結合型糖鎖のガラクトース欠損が知られている。近年TNF阻害薬治療により、糖鎖異常が正常パターンに戻ることが報告された。糖鎖は、抗体の受容体であるFc受容体との相互作用や、補体結合作用において重要な働きをしている。我々は、IL-6阻害薬投与症例およびDMARDs投与症例において、治療前後の血清を用いIgGを精製した。そして、MALDI-TOF MSを用いて血清IgGの糖鎖解析を行った。その結果、治療法に関わらず、治療後にはガラクトースが増加しているプロファイルがみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回は少数例の関節リウマチ患者において治療前後のIgG糖鎖の変化を解析した。今後症例数を増やして解析を行う必要がある。問題点としては、今回糖鎖解析に外注を利用したが、輸送費・解析費用など費用面での問題がある。またサイトカインが糖鎖合成酵素発現に与える影響をin vitroで明らかにしようとしたが、十分なデータを得ることができなかった。

研究成果の概要(英文)：N-glycosylation pattern of IgG in patients with rheumatoid arthritis is reduced galactosylation. This aberrant glycosylation improve after TNF-alfa blockade therapy. Glycosylation of IgG is important in effector function of IgG such as interaction with Fc receptor. We purify serum IgG in patients who recieved IL-6 blockade or DMARDs. And we performed glycan analysis using MALDI-TOF MS. The aberrant glycosylation of IgG improve after each therapy.

研究分野：リウマチ膠原病

キーワード：関節リウマチ IgG 糖鎖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は、多発関節炎を主徴とする原因不明の炎症性疾患である。患者数も国内で70~100万人と多く、膠原病の中では最も多い疾患である。RA患者血中IgGにおいては、結合しているN結合型糖鎖のガラクトース欠損が知られている(Parekh RB et al., Nature, 1985)。これまでの研究でRA患者において循環Bリンパ球の糖鎖合成酵素活性は、健常者より低いことがわかっている(Axford JS et al., Lancet, 1987)。また炎症性関節炎において血清糖鎖の状態が、病勢マーカーとなる可能性や、病原性への関わっている可能性が示唆されている(Dwek RA et al., Nat Rev Drug Discov, 2002)。これらの報告から、**糖鎖異常はRAの病態に深く関わっていると考えられる。**近年TNF阻害薬治療により、この糖鎖異常が正常パターンに戻ることが報告された(Collins ES et al., Rheumatology (Oxford), 2013)。またRAは妊娠中に病状が改善することが報告されているが、糖鎖構造もその病状と共に変化することが報告された(Bondt A et al., J Proteome Res, 2013)。**しかしながら、これらのメカニズムは不明である。**

糖鎖はその構造からN結合型糖鎖とO結合型糖鎖に分けられる。N結合型糖鎖は免疫グロブリンのFc部分であるCH2ドメインに結合する糖蛋白で、個体でもheterogeneousな分布を示している(図1)。**糖鎖は、抗体の受容体であるFc受容体との相互作用や、補体結合作用において重要な働きをしている。**申請者らは、これまでに自己免疫性溶血性貧血(AIHA)のマウスモデルを使い、糖鎖を人工的に改変させ、その病原性を明らかにしてきた(図2)(Yamada K, Ito K et al. J Autoimmun. 2013 Dec;47:104-10.)。

2. 研究の目的

これらからRAにおける糖鎖の制御メカニズムが不明であり、病態の解明において解決が望まれている。RAの病態解明における糖鎖への注目は新たな視点であり、また新たな治療ターゲットとなる可能性がある。今回の目的は関節リウマチにおいて、1) TNF、IL-6などのサイトカインに注目し糖鎖の制御メカニズムの解明を行うこと、2)その臨床応用の基礎を得るである。

3. 研究の方法

(1) RA患者の血清IgG糖鎖の解析

当科のRA患者データベースを用いて、生物製剤治療群、DMARDs治療群で、治療前後の糖鎖を比較することで、治療による糖鎖変化が治療薬の直接効果かどうかを検討する。

(2) in vitroの系を用いたサイトカインによる糖鎖構造の変化

AIHAマウスモデル由来の自己抗体産生ハイブリドーマを用いて、サイトカインによる糖鎖変化を検討する。ハイブリドーマを培養し、その上清にサイトカインを加え、リアルタイムPCRにて糖鎖合成酵素に差があるかどうかを解析する。

図1 N-結合型糖鎖パターン

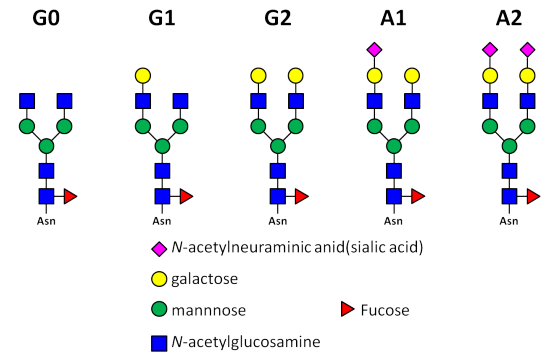
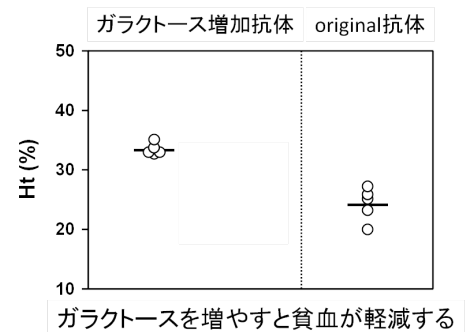


図2 糖鎖による病原性の違い



4. 研究成果

(1) RA 患者の血清 IgG 糖鎖の解析

我々は、IL-6 阻害薬投与症例および従来型の抗リウマチ薬投与症例において、治療前、治療後の血清を用い、カラムにて血清から IgG を精製した。そして、MALDI-TOF MS を用いた GlycanMap Xpress (住友ベークライト社) により血清 IgG の糖鎖解析を行った。その結果、治療法に関わらず、治療後にはガラクトースが増加しているプロファイルがみられた (下表)。以上より IgG 糖鎖異常は、関節リウマチの病勢改善と相関している可能性が示唆された。

	(%)	ガラクトース			シアル酸	
		G0	G1	G2	A1	A2
症例 (IL-6阻害薬)	前	39.7	25.7	6.3	15.4	12.9
	後	36.0	28.5	8.5	16.4	10.5
症例 (DMARDs)	前	30.1	32.0	12.8	16.5	8.6
	後	27.5	31.7	14.9	16.6	9.3

(2) in vitro の系を用いたサイトカインによる糖鎖構造の変化

サイトカインの糖鎖合成酵素発現に与える影響を解析するため IgG 産生ハイブリドーマ (34-3C IgG2a) を培養し、IL-6、TNF のサイトカインを加えた後 RNA を抽出し、糖鎖合成酵素の発現を解析した。ガラクトース転移酵素である 4GalT1 の発現は、IL-6 投与 (1 µg/ml) 48 時間後には増加している傾向が確認された。また、IL-6 の他の濃度でも検討したが、100ng/ml、10ng/ml では 4GalT1 の発現は変化しなかった。4GalT family である、4GalT2-6 においても同様の検討を行ったが、サイトカインによって発現の変化はみられなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

関節リウマチにおける糖鎖制御機構 伊藤 清亮, 山田 和徳
アレルギーの臨床 37(5) 501-505 2017 年 5 月
査読 あり DOI なし

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。