◆ 総 説 ◆

IgA 腎症患者血清由来 IgA はフィブロネクチン
を介して細胞外基質に沈着する

館山 尚・和賀 忍・中畑 徹・田中 完

要 旨

IgA 腎症における糸球体メサンギウム基質への IgA 沈着機序は不明である。我々はこれまで、IgA 結合性のフィブロネクチン (FN) 断片化物を含む FN のカテプシン D 処理物と IgA の混合物を、FN の細胞外基質への取り込みを検討する条件下で処理すると、IgA が細胞外基質に沈着することを報告した。今回、10 例の患者由来 IgA を同様の条件で処理し培養ヒト線維芽細胞細胞外基質に沈着するか、この沈着には FN がかわっているかを検討した。患者検体全例で小塊状、線維状の IgA 沈着を認めた。添加検体を抗ヒトフィブロネクチン抗体で前処理すると IgA 沈着は減弱あるいは消失した。FN 断片化物を加えると患者において IgA 小塊物の増大、拡大、新規線維状沈着物の形成が見られた。血清 IgA 添加を 2 回繰り返すと患者においてのみ沈着物の増大が見られた。以上から、IgA 腎症患者に見られる IgA は FN を介した細胞外基質沈着性を有することが示唆された。

序 言

IgA 腎症における糸球体メサンギウムへの IgA 沈着機序は確立されていない。我々はこれまで、メサンギウムへの IgA 沈着を再現する実験的検討を行い、精製 IgA

の細胞外基質への沈着には IgA のフィブロネクチン、特に断片化物への結合とフィブロネクチンの細胞外基質への取り込み機序が関与する可能性を示してきた。これまで細胞外基質材料として線維芽細胞をメサンギウム細胞の代用として用いてきたので、今回ヒト培養メサンギウム細胞についても同様であるかどうかを検討した。さらに患者血清より IgA を分離し、これを培養ヒト線維芽細胞上に添加した場合に IgA 沈着物が形成されるのかどうか、またその際、患者血清中 IgA はどのようにフィブロネクチンとかわっているのかを検討した。

対象・方法

1. 患者および対照

IgA 腎症患者 10 例を対象とした。尿異常発見年齢は 8 歳 1 カ月～14 歳 3 カ月 (平均 11.5 歳) で尿異常の発見から腎生検までの期間は 1 カ月～2 年 7 カ月 (平均 7.1 カ月) であった。組織所見は主に中等度以上のメサンギウム増殖性糸球体腎炎で半月体形成を伴っていた。蛍光抗体法ではメサンギウム領域への IgA 優位の沈着、他に IgG、補体 C3 の沈着がみられ、C1q、C4 は全例陰性であった。尿所見は蛋白尿 0 g～2.9 g (中央値 0.45 g)/日、血尿は 15～無数/視野であった。対照は尿異常のない健康小児 10 例 (12～13 歳) とした。

2. 血清

患者の血清採取は腎生検と同時期で副腎皮質ステロイド投与前に行い -80°C で凍結保存した。健康小児対照血清はボランティアの協力により採取、凍結保存した。

Key words : IgA 腎症

フィブロネクチン

患者由来 IgA

細胞外基質

IgA 沈着機序

弘前大学医学部 小児科

(〒 036-8562 青森県弘前市在府 5)

Serum IgA deposition onto extracellular matrix is mediated by fibronectin in IgA nephropathy

Takashi Tateyama, Shinobu Waga, Tohru Nakahata, Hiroshi Tanaka

Department of Pediatrics, Hirosaki University School of Medicine

3. ジャカリンアガロースによる血清 IgA のアフィニティー精製

IgA 親和性レクチンであるジャカリンを用い IgA を採取した¹²⁾。エッペンドルフチューブにトリス緩衝液 (175mM, pH 7.5, Trizma HCl, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) で平衡化したジャカリンアガロース (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) を湿容量 0.5 ml として補填した。これにトリス緩衝液で 1.5 倍希釈した血清 0.75 ml を加え、室温にて 150 分間混和震盪した。その後遠心、上清を廃棄し、トリス緩衝液を加え遠心・上清廃棄を計 4 回繰り返し洗浄した。沈渣に 0.8 MD-ガラクトース (Sigma)・トリス緩衝液 0.75 ml を加え室温にて 150 分間混和震盪後遠心し、上清のジャカリン結合物を採取した。採取物はトリス緩衝液で十分に透析した。

4. IgA 濃度の測定

IgA の濃度は Mazanec らの方法に基づく酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) にて行った³⁾。

5. フィブロネクチンの単離およびフィブロネクチン断片化物の作成

フィブロネクチンは新鮮凍結血漿 (日本赤十字社献血センター、青森支社より供与) 500 ml を用いて Hayashi and Yamada らの方法⁴⁾ により精製した。要約すると、セファロース CL-4B (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 通過物をゲラチンセファロース (Pharmacia)、ヘパリンセファロース (Pharmacia) にて連続的に処理して得た。フィブロネクチンはカテプシン D (Sigma) にて 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma) 含有トリス緩衝液, pH 3.0 のもとで酵素:基質比 1:100 として、37°C, 15 分間孵置した後、分子量比 10 倍の pepstatin A (Sigma) で反応を停止、ついで pH 7.4 に調整し断片化物とした。

6. IgA-フィブロネクチン断片化物混合物の *in vitro* での作成

これまでの方法で得た精製 IgA²⁵⁾ とカテプシン D 処理フィブロネクチンを 2:1 (重量比) で混合し、37°C, 2 時間緩徐に攪拌した。

7. ヒトメサングウム細胞の培養

ヒトメサングウム培養細胞 (妊娠 16~18 週ヒト胎児腎由来, Dr M. R. Daha; University Hospital of Leiden, The Netherlands 供与)⁶⁾ は弘前大学医学部第 2 内科山辺先生から供与された。20% 牛胎児血清 (FCS, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) 加 Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM,

Gibco) にて 37°C, 5%CO₂ 下で継代培養した。

8. ヒト線維芽細胞の培養

培養ヒト幼児皮膚由来線維芽細胞 (El San, ATCC No. CRL 1222 または 1474) を 10%FCS 加 D-MEM (Gibco, ペニシリン 50 単位/ml, ストレプトマイシン 50 µg/ml 加) にて 37°C, 5%CO₂ 下で継代培養した。24,000 個/ml として 6 cm プラスチックディッシュ (Iwaki Glass Co., Ltd., 千葉) にて継代し、実験に用いた。購入播種後第 3~4 継代細胞を用いた。

9. 培養ヒト線維芽細胞単層細胞への血清由来 IgA の添加

McKeown-Longo ら⁷⁾ の実験条件に準じて、患者および対照者保存血清各々 10 例における分離 IgA を培養ヒト線維芽細胞へ加えた (図 1)。培養ヒト線維芽細胞 (65,000 個/ml) を 8 ウェルチャンバースライド (Nunc, Inc. Naperville, IL, USA) に播種 (375 µl/ウェル), 単層化が見られた時点で培養液を交換、翌日、血清由来 IgA を D-MEM で 100 µg/0.5 ml として加え、3 時間培養、IgA 溶液を除去し洗浄し、さらに培養液を加え 24 時間培養した。Periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定⁸⁾ を行い、FITC 標識抗ヒト IgA 抗体を用いた間接免疫蛍光抗体法を行った。100 倍で全視野として約 10 視野を観察し、必要に応じて 400 倍で観察撮影した。細胞外基質が瀰漫性に構築されていることを確認するために、チャンバースライド上でコンフルエントとなった線維芽細胞におけるフィブロネクチン線維は PLP 固定した後、抗フィブロネクチン抗体 (FN 30-8) および FITC 標識抗マウス IgG 抗体による間接免疫蛍光抗体で観察した (図 2)。また、IgA-フィブロネクチン混合物を添加、PLP 固定、抗フィブロネクチン、間接免疫蛍光抗体法による観察も行った。フィブロネクチンの染色性はこれらの操作によって変化は見られなかった。

10. 抗ヒトフィブロネクチンモノクローナル抗体

フィブロネクチン断片化物の検出および血清由来 IgA のフィブロネクチンを介する細胞外基質への結合阻害実験には、マウス抗ヒトフィブロネクチンモノクローナル抗体 FN9-1 (N 末端側フィブリノヘパリン結合ドメイン特異性), FN1-1 (C 末端 s-s 結合部位特異性), および FN30-8 (細胞結合ドメイン特異性) (以上、宝酒造社、京都) を用いた。

11. 統計

2 群間の有意差は StatView J-4.5 (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) を用いて Mann-Whitney-U テストにて検定した。

図1 培養ヒト線維芽細胞細胞外基質へのフィブロネクチンを介したIgAの沈着をみる実験系

8ウェルチャンバースライドに培養ヒト線維芽細胞を播種、単層化した時点でIgA 100 µgをD-MEMで0.5 mlに調整し添加、3時間培養、添加物を除去、洗浄し、さらに培養液を加え24時間培養した。PLP固定を行い、FITC標識抗IgA抗体による免疫蛍光抗体法を行った。

図2 培養ヒト線維芽細胞細胞外基質の構築
チャンバースライド上コンフルエント線維芽細胞にIgA-フィブロネクチン混合物を添加しPLP固定した後、抗フィブロネクチン抗体(FN30-8)およびFITC標識抗マウスIgG抗体により間接免疫蛍光抗体法を行った。細胞外基質が弥漫性に構築されていることが確認された。

成績

1. ジャカリニアガロースによるIgA採取

対照者、患者それぞれ10例の血清IgA濃度をジャカリニアガロースによる処理前後について検討した。対照者原血清中IgA濃度は1,144~2,250 µg/ml (中央値1,596 µg/ml, 95% confidential interval (CI): 1,378~1,810 µg/ml), 患者では1,648~2,622 µg/ml (中央値1,869 µg/ml, 95%CI: 1,763~2,173 µg/ml)で、患者原血清濃度は有意に高値を示した ($p=0.0065$)。ジャカリニアガロース親和性分画IgA濃度は、対照者では260~444 µg/ml (中央値319 µg/ml, 95%CI: 292~371 µg/ml), 患者では336~616 µg/ml (中央値421, 95%CI: 353~516 µg/ml)であり、患者で有意に高値であった ($p=0.0173$)。IgA採取効率は正常者16.7~29.8% (中央値20.5%, 95%CI: 18.5~23.8%), 患者19.2~33.1% (中央値20.6%, 95%CI: 19.2~20.2%)であった ($p=0.5453$)。

2. IgAの腎糸球体メサンギウム領域細胞外基質への沈着機序の検討において培養ヒト線維芽細胞を用いることの妥当性についての検討

我々はこれまで、*In vitro*で作製したIgA-フィブロネクチン断片化混合物は、フィブロネクチンの会合実験で用いられている条件で培養ヒト線維芽細胞単層細胞上にIgAを沈着させることを示した(図3B)⁹⁾。培養ヒトメサンギウム細胞を用い、同様の検体、条件で沈着物を観察したところIgAの沈着が認められた(図3C)。この際に単層化したヒト線維芽細胞あるいはメサンギウム細胞をあらかじめPLP固定し、IgA-フィブロネクチン断

片化混合物を重層し反応させた場合はIgAの沈着は見られなかった(図3A)。このことから、ヒト培養線維芽細胞はメサンギウム細胞の代用物となりうることが示され、以後の実験は培養細胞として入手、手技の容易な線維芽細胞を用いて行った。

3. 血清由来IgAの培養ヒト線維芽細胞単層細胞への沈着

対照10検体では全く染色されないか、全視野に1~2カ所で小塊物を1~2個認めるのみであった(図4A)。患者血清では全てに小塊状のIgAの沈着を認めた(図4B)、沈着物は一部線維束にそったものも混じっていた(図4C)。

4. 抗ヒトフィブロネクチン抗体がヒト培養線維芽細胞への患者由来IgA沈着に及ぼす影響

患者由来IgAの線維芽細胞上への沈着にフィブロネクチンが介在しているかどうかを確認するために、各種抗ヒトフィブロネクチンモノクローナル抗体を用いてIgA沈着が変化するかどうか検討した。3例の患者由来IgA 100 µgに25 µgのFN30-8, FN9-1, FN1-1および対照抗体として抗ヤギIgGモノクローナル抗体(Sigma)を添加し混合37°C, 90分間反応させた。遊離抗ヒトフィブロネクチン抗体は細胞外基質上フィブロネクチンに結合し線維芽細胞培養維持あるいは検体内フィブロネクチンの細胞外基質への会合に影響を与えうるので、混合後の検体をさらに湿潤protein Gアガロース(Protein G-Sepharose 4B Fast Flow, Sigma) 2.5 µgを加え30分間混和振盪後遠沈し上清を採取し試料とした。IgA濃度は処理前後で有意な差を認めなかった。試料を0.5 mlになるようD-MEMで調整しチャンバースライド上培

図3 IgA-フィブロネクチン断片化物による培養ヒトメサンギウム細胞およびヒト線維芽細胞上へのIgAの沈着

単層化培養ヒト線維芽細胞をPLP固定したあと、IgA-フィブロネクチン断片化物混合物を添加し抗IgA抗体による蛍光抗体法を行ったが、IgAの沈着は見られなかった(A, 100×)。単層化培養ヒトメサンギウム細胞にIgA-フィブロネクチン断片化物混合物を添加し、3時間孵置後さらに24時間維持培養を行いPLP固定、同様の蛍光抗体法を行うと明らかな小塊状、斑状のIgA沈着を認めた(B, 160×)。単層化したヒト線維芽細胞に同様の条件でIgA-フィブロネクチン断片化物混合物を添加するとBと類似した沈着を認めた(C, 160×)。

図4 血清由来IgAによる培養ヒト線維芽細胞上でのIgA沈着の形成

すべての患者由来IgAによって培養ヒト線維芽細胞上に小塊状(B 160×)あるいは線維状(C 160×)のIgA沈着が全視野にわたって観察された。対照者由来IgAにおいてはIgAの沈着は観察されなかった(A 160×)。

養線維芽細胞に添加し、上述のようにIgA沈着を観察した。対照抗体である抗ヤギIgGモノクローナル抗体(Sigma)による処理では、IgA沈着は無処理(図4B, C)と同様に観察された(図5A)。抗フィブロネクチン抗体FN1-1処理(図5B)、FN30-8処理(図5C)およびFN9-1処理(図5D)によって明らかなIgA沈着の減少が観察された。特にFN30-8ではIgA沈着の消失を認めた。

5. フィブロネクチン断片化物が患者由来IgAのヒト培養線維芽細胞沈着に及ぼす影響

以上から患者血清分離IgAが細胞外基質に沈着するにはフィブロネクチンが関与することが推測された。そこで各々3例の患者および対照者由来IgA検体に断片

化したフィブロネクチンを添加し、IgA沈着に影響を与えるかどうかを検討した。IgA 100 μ g に対し、断片化フィブロネクチン 50 μ g を加え 37°C, 90 分間振盪、チャンバースライド上培養ヒト線維芽細胞に添加し、方法9の条件でIgA沈着を検討した。

フィブロネクチン非添加検体(図6A)でのIgA沈着はフィブロネクチン添加によって明らかな増加を見た(図6B)。沈着は小塊状のものが線維状の広がりを見る様式で増加した(図6C, 強倍)。対照者由来IgA検体においてもフィブロネクチン非添加ではIgA沈着が認められなかったものが添加によって全視野に一カ所程度であるが同様な性状でIgAの沈着物を形成した。

6. 患者由来IgAの連続的添加によるヒト培養線維芽

図5 患者由来IgAによる培養ヒト線維芽細胞上IgA沈着に対する
抗ヒトフィブロンネクチン抗体の影響

患者由来IgAに添加する抗体として非特異的抗体(抗ヤギIgGモノクローナル抗体)を用いてもIgA沈着には明らかな変化は見られなかった(A 100×)。抗フィブロンネクチン抗体FN 1-1(B)、FN 30-8(C)およびFN 9-1(D)によって明らかなIgA沈着の減少が見られる(100×)。

細胞上IgA沈着の変化

IgA腎症患者においては、腎糸球体メサンギウム細胞は恒常的に沈着因子の暴露を受けている。前述の実験系では、一回につき一定量、一定時間の患者由来IgAの添加によって、IgAの沈着の有無を見るものであるから、同様の操作を連続的に二回繰り返した場合にIgA沈着が変化するのかどうかを検討した。各々3例の患者および対照者由来血清を用いて、検体添加3時間、培養24時間、培養液除去、さらに検体添加3時間、培養24時間を行い、IgA沈着を観察した。一回の処理(図7A)に比べ二回の処理によってさらに沈着物の増加を見た(図7B)。沈着は小塊状沈着物の数の増加に加えて沈着物の拡大(図7C、強倍)あるいは線維状沈着物の新生という様式で変化した。対照における同様の実験では一回処理に比して明らかな沈着物の新生は認められなかった。

考 察

IgA腎症にみられるメサンギウム基質へのIgA沈着の機序は不明であり、これまでに患者血清由来IgAが細

胞外基質に沈着することを示した報告はない。今回我々は、患者血清由来IgAが培養ヒトメサンギウム細胞に沈着し、同様な沈着様式を示す線維芽細胞を用いて、この沈着にはフィブロンネクチンが関与していることを示した。

一般的には腎炎発症機序として、糸球体における循環免疫複合体の沈着あるいはin situでの免疫複合体形成が考えられている。IgA腎症においてもIgA免疫複合体のメサンギウム基質への沈着が考えられており¹⁰⁾、これまでに患者血清中にみられる循環免疫複合体の抗原成分としてC3、IgG、IgM等が報告されている¹¹⁾。しかし、逆に糸球体メサンギウム領域に沈着しているIgAがこれらの複合体であることは示されていない。さらに、免疫複合体等価と考えられるIgA巨大分子としてIgA分子ヒンジ部の糖鎖の変化による自己凝集¹²⁾¹³⁾が報告されている。これらのIgA凝集物が試験管内で形成された凝集IgAが培養メサンギウム細胞に結合するという報告¹⁴⁾や、ラット腎動脈注入によりメサンギウム領域への沈着が見られたとする報告¹⁵⁾があるが、患者由来のIgA

図6 患者由来IgAによる培養ヒト線維芽細胞上IgA沈着に対する
フィブロネクチン断片化物添加の効果

患者由来IgAにフィブロネクチン断片化物を添加すると非添加検体(A 100×)に比較して明らかな単層培養ヒト線維芽細胞増加を見た(B 100×)。沈着は小塊状のものが線維状の広がりを見る様式で増加した(C 400×)。対照者由来IgAに添加した時も全視野に一カ所程度、同様なIgAの沈着物形成が見られた。

図7 患者由来IgAの連続的添加による培養ヒト線維芽細胞上IgA沈着の変化

患者由来IgAを1回添加時のIgA沈着(A 100×)に比較して2回の連続的添加により明らかな沈着増加(B 100×)、および凝集塊の大きさの拡大が見られた(C 400×)。対照者由来IgAの連続的添加では明らかな変化を認めなかった。

がメサンギウム細胞基質上に沈着するかどうかは示されていない。

我々はIgAがフィブロネクチン断片化物と親和性を有することを示したことを機にこのような沈着をもたらす機序として、可溶性フィブロネクチンのフィブロネクチン基質への会合機序を介したIgAの沈着を考えた⁵⁾。可溶性フィブロネクチンの細胞外基質への会合は主にヒト培養線維芽細胞を用いて広範に検討されている。現在までの、①会合に必要なフィブロネクチンの部位はアミノ末端70kDaであり、これは線維芽細胞のmatrix assembly receptorを介して結合し、実際の会合にはカルボキシ末端に存在するS-S結合部分が必要であること⁷⁾、②matrix assembly receptorの一つとして細胞接着因子であるインテグリン $\alpha 1\beta 5$ の存在が重要であり、細胞がこれを表現しない静止期では会合が見られないこ

と¹⁶⁾が示されている。したがって、腎メサンギウム細胞基質は線維芽細胞と同様フィブロネクチンが主要な細胞外基質であり、IgA腎症におけるIgA沈着機序としてIgA結合性フィブロネクチン断片化物をIgAの担体としてIgAの沈着を仮定することは無理ではない。実際、今回の検討において、IgAは通常結合反応で行うPLP固定した単層化培養細胞への添加のみでは結合せず、フィブロネクチンの会合を考慮に入れた実験系で沈着することが示された。また、IgA-フィブロネクチン断片化物の培養ヒトメサンギウム細胞への添加によって線維芽細胞と同様なIgA沈着が認められ、フィブロネクチン基質へのIgA沈着の検討に線維芽細胞を代用できることが示された。線維芽細胞はメサンギウム細胞に比べて信頼できる安定した供給源であり、初期培養が不要であることから有用と考えられた。

血清由来 IgA をジャカリンアガロースにより採取し、培養線維芽細胞上で処理すると患者においてのみ IgA 沈着物の形成をみた。沈着物の沈着様式は一部線維状であったが、多くは小塊物が散在していた。このような IgA の沈着は抗フィブロネクチン抗体により阻害された。この際用いた抗体 3 種のうち、FN9-1 および FN1-1 は、循環フィブロネクチンのフィブロネクチン基質への会合に重要とされている部分^{7)16)~19)}に対する抗体であり、FN30-8 はフィブロネクチンの中心部分をなす細胞接着ドメインに対する抗体である。したがって、患者血清由来 IgA の培養線維芽細胞上への沈着にはフィブロネクチンの細胞外基質への会合機序が関与することが示された。また、IgA 試料の連続的添加によって主に沈着物の数の増加が認められ、カテプシン D で作成したフィブロネクチン断片化物を培養系に添加することにより明らかな IgA 沈着の増加とともに沈着物の拡大が見られたことは、さらにこの機序を支持するものと考えられる。

最近、Zheng ら²⁰⁾ はブラストキニンとともに、ステロイド誘導性、サイトカイン様、多機能性の抗炎症性、免疫調節機能を持つ分泌蛋白としてしられるウテログロビン をノックアウトしたマウスにおいてフィブロネクチンの発現とともに糸球体に IgA が沈着することを偶然に発見した。我々の提唱した糸球体 IgA 沈着におけるフィブロネクチンの直接的関与がこの点からも支持されるものである。今後患者フィブロネクチンがなぜ、どのようにして断片化するのかなどさらなる解析が必要である。

結 論

IgA 腎症患者血清より分離した IgA を培養ヒト線維芽細胞に添加すると細胞外基質上に IgA 沈着物を形成した。対照には認められなかった。この沈着は抗フィブロネクチン抗体によって阻害され、細胞外基質への IgA 沈着にはフィブロネクチンの細胞外基質への会合機序が関与していることが示された。

文 献

- 1) Roque-Barreira MC, Campos-Neto A : Jacalin : An IgA-binding lectin. *J Immunol* 134 : 1740-1743, 1985.
- 2) Loomes LM, Stewart WW, Magengera RL, Senior BW, Kerr MA : Purification and characterization of human immunoglobulin IgA 1 and IgA 2 isotypes from serum. *J Immunol Methods*, 141 : 209-218, 1991.
- 3) Mazanec MB, Nedrud JG, Liang XP, Lamm ME : Transport of serum IgA into murine respiratory secretions and its implications for immunization strategies. *J Immunol* 142 : 4275-4281, 1989.
- 4) Hayashi M, Yamada KM : Divalent cation modulation of fibronectin binding to heparin and to DNA. *J Biol Chem* 257 : 5263-5267, 1982.
- 5) Waga S, Sugimoto K, Tanaka H, Ito T, Nakahata T, Tateyama T, Kakizaki Y, Yokoyama M : IgA interaction with carboxy-terminal 43-kD fragment of fibronectin in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 10 : 256-263, 1999.
- 6) Yamabe H, Osawa H, Inuma H, Kaizuka M, Tamura N, Tsunoda S, Baba Y, Shirato K, Onodera K : Thrombin stimulates production of transforming growth factor-beta by cultured human mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* 12 : 438-442, 1997.
- 7) McKeown-Longo PJ, Mosher DF. The assembly of the fibronectin matrix in cultured human fibroblast cells, in *Fibronectin* edited by Mosher DF, San Diego, Academic Press, pp 163-180, 1989.
- 8) 渡辺慶一, 中根一穂 : 酵素抗体法 (三版) 一巻 東京, 学際企画, pp 88-90, 1992.
- 9) Waga S, Sugimoto K, Ito T, Yokoyama M : Carboxyl-terminal fragment of fibronectin found in IgA nephropathy binds IgA 1 and IgG to extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol* 8 : 546A, 1997.
- 10) Emancipator SN : Primary and secondary forms of IgA nephritis, Schonlein-Henoch Syndrome, in *Pathology Of the Kidney* 4th edition, edited by Heptinstall RH, Boston, Little, Brown and Company, pp 389-476, 1983.
- 11) Emancipator SN : Nephrology forum. Immunoregulatory factors in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Kidney Int* 38 : 1216-1229, 1990.
- 12) Hiki Y, Iwase H, Kokubo T, Horii A, Tanaka A, Nishikido J, Hotta K, Kobayashi Y : Association of asialo-galactosyl β 1-3N-acetylglactosamine on the hinge with a conformational instability of jacalin-reactive immunoglobulin A1 in immunoglobulin A nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 7 : 955-960, 1996.
- 13) Kokubo T, Hiki Y, Iwase H, Horii A, Tanaka A, Nishikido J, Hotta K, Kobayashi Y : Evidence for involvement of IgA 1 hinge glycopeptide in the IgA 1-IgA 1 interaction in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 8 : 915-919, 1997.
- 14) Van den Dobbsteven MEA, Van der Woude FJ, Schroeijers WEM, Van den Wall Bake AWL, Van Es LA, Daha MR : Binding of dimeric and polymeric IgA to rat renal mesangial cells enhances the release of interleukin 6. *Kidney Int* 46 : 512-519, 1994.
- 15) Hiki Y, Kokubo T, Iwase H, Masaki Y, Sano T, Tanaka A, Toma K, Hotta K, Kobayashi Y : Underglycosylation of IgA1 hinge plays a certain role for its lomerular deposition in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 10 : 760-769, 1999.
- 16) Wu C, Kevins FM, O'Toole TE, McDonald JA, Ginsberg MH : Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly for the assembly of a fibronectin matrix. *Cell* 83 : 715-724, 1995.
- 17) Ichihara-Tanaka K, Maeda T, Titani K, Sekiguchi K : Matrix assembly of recombinant fibronectin polypeptide consisting of amino-terminal 70 kDa and carboxyl-terminal 37 kDa regions. *FEBS Lett* 299 : 155-158, 1992.
- 18) Mohri H, Tanabe J, Katho K, Okubo T : Identification of a novel binding site to the integrin α IIb β 3 located in the C-terminal heparin-binding domain of human plasma fibronectin. *J Biol Chem* 271 : 15724-15728, 1996.

- 19) Scotti J, Wiley S : Assembly of amino-terminal fibronectin dimers into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 269 : 17492-17498, 1994.
- 20) Zheng F, Kundo GC, Zhang Z, Ward J, DeMayo F, Mukherjee AB : Uteroglobin is essential in preventing immunoglobulin A nephropathy in mice. *Nat Med* 5 : 1018-1025, 1999.

Serum IgA deposition onto extracellular matrix is mediated
by fibronectin in IgA nephropathy

Department of Pediatrics, Hirosaki University School of Medicine

Takashi Tateyama, Shinobu Waga, Tohru Nakahata, Hiroshi Tanaka

The mechanism of IgA deposition on glomerular mesangial matrix in IgA nephropathy is unknown. We have demonstrated that IgA was incorporated into the extracellular matrix when mixture of IgA and cathepsin D-digested fibronectin fragments was reacted with confluent cell layers of cultured human fibroblasts for 3 hr and was cultured with medium for an additional 24 hr. Since we have also demonstrated that IgA 1-associated fibronectin fragments was present in patient's serum, we examined in this paper if patient's IgA obtained by affinity chromatography using jacalin-agarose is able to deposit in extracellular matrix in association with fibronectin, which might be co-purified along with IgA. Samples obtained from serum were applied to the culture system of above described. In all of 10 patients with IgA nephropathy, but not in 10 normal controls, IgA was deposited in extracellular matrix of cultured human fibroblast. The coarse and punctate clusters of IgA staining by immunofluorescence was obtained, and the pattern was similar to that seen in the experiment using mixture of IgA and fibronectin fragments. The staining was abolished by treatment of patients' samples with anti-human fibronectin monoclonal antibodies, suggesting that IgA deposition on extracellular matrix is associated with fibronectin. Furthermore, an addition of cathepsin D-digested fibronectin to the samples from patients augmented the size and the number of IgA deposition on extracellular matrix. When samples were sequentially reacted to the cell layers just after a series of sample application was finished, IgA staining was also augmented. These results suggest that the complex of IgA and fibronectin fragments may co-exist in serum from patients with IgA nephropathy and contribute to IgA deposition onto mesangial matrix through the mechanism of assembly of exogenous fibronectin into extracellular matrix.

Key words : IgA nephropathy, extracellular matrix, fibronectin, IgA deposition, human fibroblast, human mesangial cell