〔原 著〕

関節リウマチおよび癌腫における血清 IgG 糖鎖構造の異常

大谷伸久*・メ谷恵子**・狩野有作**・大谷英樹***

SUMMARY

Oligosaccharide chains of IgG purified from sera of patients with rheumatoid arthritis (RA) and various cancers were investigated with fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE). In addition, the relationship between the increased fraction separated by the FACE and the production of anti-agalactosyl IgG antibody was studied. The fluorescence-labeled sugar chains were separated into five fractions (Fr1-5) by PAGE. The Fr4, oligosaccharide lacking galactose, revealed significantly higher levels in RA and cancer ($p < 0.01$), while the Fr1, oligosaccharide with galactose, was significantly decreased in both pathological conditions ($p < 0.01$). Therefore, it suggests that augmentation of the abnormal IgG in sera was not specific to patients with RA. In patients with cancer, the Fr3, oligosaccharide with mono-sialic acid, showed an increased tendency associated with significant increase of the Fr5, oligosaccharide with di-sialic acid ($p < 0.01$), while in patients with RA the Fr3 was found to have a decreased tendency. There was a significant correlation between the contents of Fr4 and anti-agalactosyl antibodies, an autoantibody against galactose free IgG ($p < 0.01$). In patients with either RA or cancer, the Fr4 increasing above approximately 30% was associated with abnormally high level of the anti-agalactosyl antibodies. Accordingly, this finding suggests that the increased Fr4 was related to the production of the anti-agalactosyl IgG antibodies.

Key words: serum IgG, oligosaccharide, electrophoresis, rheumatoid arthritis, cancer.

はじめに

免疫グロブリン IgG 糖鎖は 2 つの C_H2 ドメイン上にある Asn-297 に結合し¹⁾, Fc 領域あるいは IgG 分子の高次構造の維持に関与し, 補体の活性化²⁾ や多核白血球上の Fc レセプターの結合能³⁾ などの重要な役割を担っている。血漿中の IgG 糖鎖は N 結合型オリゴ糖であって, その構造は 30 種類以上が同定されている⁴⁾ が, それらの相対比率は健常者でほぼ一定とされる。

IgG 結合オリゴ糖の異常をきたす病態として, 関節リウマチ (RA)⁵⁾ をはじめ, クローン病⁶⁾, 結核⁶⁾, 骨髄腫⁷⁾ などが報告され, その臨床的意義が明らかにされつつある。とくに RA では血漿ガラクトース欠損 IgG が増量し, リ

ウマトイド因子の産生に関与し, またその発症との関連性が示唆されている⁸⁾。

蛋白結合糖鎖の解析法としては, 高速液体クロマトグラフィー⁹⁾ が普及しているが, 新しい方法として簡易な蛍光標識糖鎖電気泳動 (Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis, FACE) が考案され^{10,11)}, 近年 IgA 結合糖鎖の解析にはじめて応用された¹²⁾。われわれは FACE 分析装置 (FACE SE 1000, Glyko 社, 英国) を用いて血中 IgG 結合糖鎖分析の基礎的検討¹³⁾ を行い, 良好な成績が得られた。今回, 本装置を用いて RA および癌腫血清 IgG 糖鎖を解析し, 併せて抗ガラクトース欠損 IgG 抗体との関連性について検討し, 若干の知見が得られたので報告する。

Abnormality of the oligosaccharide moiety of human immunoglobulin G in sera of patients with either rheumatoid arthritis or cancer.

* Nobuhisa Ohtani; 順天堂大学医学部臨床病理学講座

** Keiko Shimetani, Yusaku Kanou; 北里大学医学部臨床検査診断学

*** Hideki Ohtani; 総泉病院内科

Correspondence address: Hideki Ohtani, Sohzen Hospital, 2592, Sarashina-cho, Wakaba-ku, Chiba 265-0073, Japan.
(受付 2002 年 5 月 17 日, 受理 2002 年 7 月 12 日, 刊行 2002 年 12 月 15 日)

対象および方法

1. 対象

RA 6 例 (41~50 歳) および限局性癌腫 5 例 (45~54 歳, 肺癌, 胃癌, 膵臓癌, 肝細胞癌および卵巣癌各 1 例) は, 北里大学病院入院および外来患者血清より未治療のものを選んだ。

2. 血清 IgG 糖鎖の電気泳動による画像解析

1) 血清 IgG の抽出精製

既報¹³⁾に従った。すなわち, 血清 (300~500 μ l) を 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) で 4 倍希釈し, Protein G カラム (Pharmacia Biotech 社) に添加した。0.01 M phosphate buffer 5 ml でカラムを洗浄した後, 0.1 M glycine-HCl buffer (pH 3.0) 3 ml で蛋白を溶出した。溶出した蛋白に 1 M Tris-HCl buffer (pH 9.0) 0.5 ml を加え, 透析膜 (三光純薬社) を用いて蒸留水で約 48 時間脱塩後凍結乾燥を施した。免疫電気泳動により抗全ヒト血清および抗 IgG ヒト血清を用いて, 溶出蛋白が IgG のみであることを確認した。

2) 血清 IgG の N 結合型オリゴ糖鎖の遊離

上述の抽出精製 IgG 250 μ g を 25 μ l の蒸留水に溶解し, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 25 μ l, 5% SDS 1 μ l および 1.44 M 2-mercaptoethanol 1.5 μ l を加え 100°C, 5 分間加熱した。ついで 7.5% Nonidet P-40 2.5 μ l および peptide N-glycosidase F, recombinant (PNGase F, EC 3.5.152, 生化学工業) 2 μ l を加え, 37°C で 2 時間反応させた。反応終了後, 水中操作下にて 3 倍量の無水エタノール (171 μ l) を加え 10 分間氷冷し, 蛋白を冷却沈殿して 15,000 r.p.m. にて 5 分間遠心後, 上清を凍結乾燥し, 遊離したオリゴ糖鎖を回収した。

3) N 結合型オリゴ糖の蛍光標識

回収したオリゴ糖に 0.15 M 8-aminonaphthalene-1,2,6-trisulphonate (ANTS) 含有 15% 酢酸 5 μ l および 1.0 M sodium cyanoborohydride 含有 dimethyl sulfoxide (DMSO) 5 μ l を加え, 37°C で 16 時間放置し, 蛍光標識した。

4) 電気泳動ならびに画像解析

FACE SE 1000 を用い, 40% ポリアクリルアミドゲルに蒸留水に溶解した ANTS 標識検体 2 μ l を塗布し, OLIGO gel running buffer (Glyko 社) にて定電流 15 mA で 90 分間泳動した。基準液として glucose が 1~20 残基以上重合した糖鎖で構成される OLIGO Ladder Standard (Glyko 社) を用いた。なお, glucose が 4 残基重合した糖鎖 (G4) は 50 pmole に設定されている。

電気泳動後, 直ちに FACE IMAGER (Glyko 社) により gel image を取り込み, FACE imaging software version 2.47 (Glyko 社) を用いて蛍光 fraction (Fr) pat-

tern をコンピューター画像上に表示した。Gel image 上の G4 は他の Fr よりも薄い, これを基準として各 Fr の定量ならびに重合度 (DP: degree of polymerization) が測定される。各 Fr の基準値は既報¹³⁾に準じた。

3. 抗ガラクトース欠損 IgG 抗体の測定

レクチン酵素免疫法に基づく測定キット (エーザイ社) を用いて測定した¹⁴⁾。その測定原理は, (1) ガラクトース欠損 IgG 固相カップに被検血清中に存在する抗ガラクトース欠損 IgG 抗体を結合させる (第 1 反応)。ついで (2) 反応終了後洗浄し, 抗ガラクトース欠損 IgG 抗体結合糖鎖に対してビオチン化レクチンを結合させると, サンドイッチ結合物が形成される (第 2 反応)。 (3) このビオチン化レクチンに酵素標識アビジン溶液を結合させる (第 3 反応)。 (4) 反応終了後洗浄し, 酵素基質液を注入し反応させる (第 4 反応)。反応終了後反応停止液を注入し, 波長 405 nm で抗ガラクトース欠損 IgG 抗体量を測定する。なお, 標準曲線は標準抗体液 50 AU/ml を用いて作成した (AU: arbitrary unit の略で, 抗ガラクトース欠損 IgG 抗体力価の単位)。Cut off 値 6.0 AU/ml 以下を陰性とした¹⁵⁾。

4. 統計学的処理

FACE により分画された各 Fr (%) は, ノンパラメトリック Mann-Whitney U-test を用いて検定し, $p < 0.05$ を有意差とした。

結 果

1. 蛍光標識糖鎖分析法によるオリゴ糖鎖の解析

健常者, RA および癌腫患者血清 IgG オリゴ糖鎖は, 主

Fig.1. Pattern of IgG oligosaccharide-chains in normal individual and a patient with rheumatoid arthritis by SDS PAGE.

OLIGO Ladder Standard (St.) consists of a mixture of glucose polymers, and 50 pmol of maltotetraose fraction (G4).

Fig. 2. Patterns of IgG oligosaccharide-chain in patients with various cancer.

Fig. 3. Fluctuation of fraction of IgG oligosaccharide-chain in normal individuals and patients with either rheumatoid arthritis or cancer.

に5つのfraction (Fr) に分離された (Fig. 1 および 2). 健常者のIgGオリゴ糖鎖は陰極側から2番目のFr2が最も幅広く濃く認められ、ついでFr1, 3, 4, 5の順であった。一方、RAおよび癌腫例のIgGオリゴ糖鎖はFr4およびFr2が濃染され、Fr1の減少が認められた。RAではFr4 (平均値33.1%) は健常者 (Fr4平均値11.5%) に比較し、有意に増加し ($p < 0.01$)、Fr1はRAでは有意に減少を示した ($p < 0.01$) (Fig. 3)。癌腫でも健常者に比べ、RAと同様にFr4の増加とFr1の減少が認められた ($p < 0.01$) (Fig. 3)。さらに癌腫ではFr5が有意に増加した ($p < 0.01$)。Fr3ではRAは減少傾向、癌腫では増加傾向を示した。

2. 抗ガラクトース欠損IgG抗体の変動

抗ガラクトース欠損IgG抗体は、RA 6例中4例は異常高値を示し、それら陽性例はFr4が32%以上であった (Fig. 4)。癌腫では5例中1例が異常高値を示し、Fr4は33%であった。抗ガラクトース欠損IgG抗体とFr4は正の相関関係が認められた ($\gamma = 0.78$, $p < 0.01$) (Fig. 4)。Fr4が29%以上を示した8例について抗ガラクトース欠損IgG抗体との関係は、 $Y = 9.559X - 266.152$, $\gamma = 0.84$, $p < 0.01$ を示し、良好な相関関係が認められた。

考 察

免疫グロブリンIgG糖鎖の解析法としてFACE法を用

Fig. 4. Correlation between anti-agalactosyl IgG antibody and Fr4 in patients with either rheumatoid arthritis or cancer.

Fig. 5. Structure of IgG oligosacchride-chain in the fractions separated by PAGE.

い、本法の基礎的検討、ならびに基準値について報告¹³⁾したが、今回はその臨床的意義を明らかにすべく、RA および癌腫患者血清 IgG 糖鎖の変動について検討した。RA における血中 IgG 糖鎖の特徴的な変動として、ガラクトース欠損オリゴ糖 IgG の著増することはすでに報告^{5,6,16-18)}されている。一方、RA と癌腫の IgG 糖鎖異常の差異の有無については、なお明らかにされていない。

FACE 法により健常者、RA および癌腫血清 IgG 糖鎖は主に 5 つの Fr に明瞭に分離された。各 Fr の糖鎖構造は、Fig. 5 (既報^{13,19)}) に示すように、Fr1 は 2 ガラクトースを有するオリゴ糖、Fr2 は 1 ガラクトースをもつオリゴ

糖であって、Fr4 はガラクトース欠損オリゴ糖が同定されている。それらのオリゴ糖は、今回の成績では RA および癌腫患者血清 IgG 糖鎖において明らかな増減が認められ、両疾患において Fr4 (ガラクトース欠損オリゴ糖) の増加が目立ち、特徴的な変動であった ($p < 0.01$)。この異常は Fr1 (2 ガラクトース結合オリゴ糖) の減少によるもので、Fr2 (モノガラクトース結合オリゴ糖) の変動はほとんど認められなかった。また、癌腫では Fr5 (2 シアル酸結合オリゴ糖) は健常者に比べ、有意に増加を示した。癌腫では血中シアル酸の増加が臨床的に観察されるが、シアル酸結合オリゴ糖 IgG の増加が多少影響していると考えられる。RA と癌腫における IgG 結合オリゴ糖構造の差異としては、Fr3 (モノシアル酸結合オリゴ糖) において RA では減少傾向、癌腫では増加傾向を示した。このような IgG 糖鎖構造異常を呈するメカニズムは明らかではないが、両病態における IgG 代謝の差異によるものと考えられる。

血中ガラクトース欠損 IgG の異常高値は、RA の早期にも出現し、また従来のリウマトイド因子が陰性 (sero-negative) の時期で 60% に認められ、本症の早期診断に有用であることが指摘されている¹⁴⁾。ガラクトース欠損 IgG の増加は RA に特異的な変動と見なされていた¹⁶⁻¹⁸⁾が、RA のほかにクローン病や結核⁶⁾、脊椎関節症²⁰⁾などにも見出されている。今回の成績では癌腫でもガラクトース欠損 IgG は異常高値を示すことが明らかにされたが、それら疾患における機序についてはなお不明である。

Malhotra ら⁸⁾は、ガラクトース欠損 IgG に N-アセチルグルコサミンが末端に表出すると、このものが膠原組織のマノース結合蛋白に結合し、ついで補体の活性化を招き、その結果、滑膜の炎症が惹起され、RA が発症するという機序を提唱し注目された。他方、ガラクトース欠損 IgG の末端に露出した N-アセチルグルコサミンに対して抗ガラクトース欠損 IgG 抗体が産生され、RA では従来のリウマトイド因子よりも高率に、また特異性においても優れていることが指摘されている^{18,21)}。このように RA においてガラクトース欠損 IgG 異常高値の出現頻度と抗ガラクトース欠損 IgG の陽性率が高いことは明らかにされているが、両者を同時に測定し比較検討した報告はみられない。今回の成績では血中ガラクトース欠損 IgG (Fr4) が 30% 以上を占めると、抗ガラクトース欠損 IgG 抗体が著明に増加し、両者の相関関係が明らかにされた。また、RA を随伴しない肺癌例においても Fr4 増加 (33%) を示し、抗ガラクトース欠損 IgG 抗体も異常高値が認められ、両者の関係を示す貴重な症例といえよう。癌腫では RA と異なり、リウマトイド因子の陽性率は非常に低いことが知られているが、IgG 糖鎖の異常が自己抗体の産生に関与していると考えられた。ガラクトース欠損 IgG (Fr4) の

増加, ならびに抗ガラクトース欠損 IgG 抗体との異常高値を伴う癌腫患者において RA のような滑膜炎が認められなかったのは, 両病態における免疫学的背景の差異に基づくものなのか, その機序に関して興味もたれる。

文 献

- Clamp JR, Putnam FW. The carbohydrate prosthetic group of human gamma-globulin. *J Bio Chem* 1964; 239: 3233-40.
- Axford JS. Oligosaccharides: An optional extra of relevance to disease mechanisms in rheumatology? *J Rheumatol* 1991; 18: 1124-7.
- Adler Y, Lamour A, Jamin C, Menz JR, LeCorre R, Shoenfeld Y, Youinou P. Impaired binding capacity of asialyl and agalactosyl IgG to Fc gamma receptors. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13: 315-9.
- Fujii S, Nishiura T, Nishikawa A. Structural heterogeneity of sugar chains in immunoglobulin G. *J Biochem* 1990; 265: 6009-18.
- Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, Rademacher TW, Mizuochi T, Taniguchi T, Matsuta K, Takeuchi F, Nagano T, Tiymoto T, Kobata A. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 1985; 316: 452-7.
- Parekh RB, Isenberg D, Rook G, Roitt I, Dewek R, Rademacher T. A comparative analysis of disease-associated changes in the galactosylation of serum IgG. *J Autoimmun* 1989; 2: 101-4.
- Fleming SC, Smith S, Knowles D, Skillen A, Self CH. Increased sialylation of oligosaccharides on IgG paraproteins: A potential new tumour marker in multiple myeloma. *J Clin Path* 1998; 51: 825-30.
- Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB. Glycosylation changes of IgG associated complement via the mannose-binding protein. *Nature Med* 1995; 238-43.
- Townsend RR, Hardy MR, Lee YC. Separation of oligosaccharides using high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Methods Enzymol* 1990; 179: 65-76.
- Jackson P. The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1, 3, 6-trisulfonic acid. *Biochem J* 1990; 270: 705-13.
- Hu G-F. Fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis: Technology and applications. *J Chromatogr A* 1995; 705: 89-103.
- Allen AC, Bailey EM, Barratt J, Buck KS, Feehally J. Analysis of IgA 1 O-glycans in IgA nephropathy by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *Soc Nephrol* 1991; 10: 1763-71.
- 益子貴臣, 谷惠子, 狩野有作, 大谷英樹. 蛍光標識糖鎖分析法によるヒト血清 IgG 糖鎖構造の解析と基準値の設定について. *北里医学* 1999; 29: 276-80.
- 山田雄二, 細田哲也, 吉沢政行, 山根純卓. レクチン酵素免疫法による抗ガラクトース欠損 IgG 抗体測定キットの開発と測定条件の検討. *基礎と臨床* 1997; 31: 81-101.
- 海老塚岳彦, 小林茂人, 秋元智博, 高崎芳成, 伊藤喜久, 境田博之, 櫛谷昭一, 山田雄二, 細田哲也, 大西啓靖, 吉野谷定美, 東 威, 橋本博史, 河合 忠. 抗ガラクトース欠損 IgG 抗体糖鎖測定キットの基準範囲, カットオフ値の設定及び臨床的有用性に関する研究. *臨床と研究* 1998; 74: 477-82.
- Tang W, Matsumoto A, Shikata K, Takeuchi F, Konishi T, Nakata M, Mizuochi T. Detection of disease-specific augmentation of abnormal immunoglobulin G in sera of patients with rheumatoid arthritis. *Glycoconjugate J* 1998; 15: 929-34.
- Mizuochi T, Hamako J, Nose M, Titani K. Structural changes in the oligosaccharide chains of IgG in autoimmune MRL/MP-1 pr/1 pr mice. *J Immunol* 1990; 145: 1794-8.
- 水落次男. 早期リウマチにおけるリウマチ因子の測定. *リウマチ科* 1994; 12: 331-43.
- 狩野有作, 益子貴臣, 大谷慎一, 砂川慶介, 大谷英樹. 癌腫における血清 IgG 糖鎖構造の解析とその臨床的意義について. *生物物理化学* 2000; 44(補): 14.
- Leirisalo-Repo M, Hernandez-Munoz HE, Rook GAM. Agalactosyl IgG is elevated in patients with active spondyloarthritis. *Rheumatol Int* 1999; 18: 171-6.
- 田窪伸夫, 山本純己, 仲田三平, 山田雄二. 早期 RA 患者における抗ガラクトース欠損 IgG 抗体測定の意義. *リウマチ科* 1997; 17: 228-34.

要 旨

蛍光標識糖鎖電気泳動 (FACE) を用い, 関節リウマチ (RA) および癌腫患者血清 IgG 糖鎖を解析し, 併せて抗ガラクトース欠損 IgG 抗体との関連性について検討した. 蛍光標識糖鎖は PAGE により主に 5 つの分画 (Fr1~5) に分離された. Fr4 (ガラクトース欠損オリゴ糖) は, 健常者に比較し RA および癌腫では有意に増加 ($p < 0.01$) し, Fr1 (2 ガラクトース結合オリゴ糖) の減少によるものであった. したがって, IgG 異常糖鎖の増加は RA 患者血清に特異性は認められなかった. Fr3 (モノシアル酸結合オリゴ糖) は RA で減少傾向, 癌腫では増加傾向を示し, 後者では Fr5 (2 シアル酸結合オリゴ糖) の明らかな増加 ($p < 0.01$) が認められた. Fr4 と抗ガラクトース欠損 IgG 抗体は正の相関を示し, ガラクトース欠損 IgG が 30% 以上を占める RA および癌腫では抗ガラクトース欠損 IgG 抗体が著明に増加し, 本自己抗体産生との関連性が示唆された.