

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19452

研究課題名(和文) 新規沈着腎症の同定および病態・治療標的の解明

研究課題名(英文) Identification of new deposited nephropathy and elucidation of pathological target

研究代表者

武田 尚子 (Takeda, Naoko)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：20737655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：当院で経験した既知の疾患に分類できない沈着腎症の糸球体沈着物を解析した。レーザーマイクロタイセクションにより糸球体を分離し、LC-MS/MSによる解析を行い、病因蛋白質の同定を行った。診断に使用済の残余腎生検検体を用いて解析を行い、通常用いられる資料量の20%程度である1mm²の総面積を回収した。解析の結果、234種類の構成蛋白質を同定しえた。沈着物のない微小変化型ネフローゼ症候群および沈着物が明らかな腎アミロイドーシス検体を対照とし病原蛋白質を検討した。現在も検討を継続しており、今後は候補蛋白に対する抗体を作成し、染色を行い、沈着物を同定する予定である。

研究成果の概要(英文)：Glomerular deposits of deposited nephropathy that can not be classified as known diseases experienced at our hospital were analyzed. The glomerulus was separated by laser microdissection and analyzed by LC-MS/MS to identify the etiological protein. Analysis was performed using residual renal biopsy specimens that were used for diagnosis, and the total area of 1 mm², which is about 20% of the usual volume, was collected. As a result of the analysis, 234 constituent proteins could be identified. We investigated pathogenic proteins using minimal change nephrotic syndrome without deposits and renal amyloidosis specimens with obvious deposits as controls. We are still studying now, and in the future we plan to produce antibodies to candidate proteins, stain with them, and identify deposits.

研究分野：腎臓内科

キーワード：沈着腎症 蛋白質同定

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病の早期診断と治療のため腎生検が実施されているが、比較的早期に腎疾患の存在を疑い腎生検を施行し、十分なサンプルを採取できているにも関わらず今なお診断に至ることができない症例も存在している。近年疾患概念が明らかとなってきた沈着腎症では、レーザーマイクロダイセクションによりサンプルを回収し、分子生物学的な解析方法をとることで病態の解析に役立てている。今回我々は、光学顕微鏡所見にて糸球体にPAS陽性の無構造な塊状沈着物を認める症例を経験した。本症例は、蛋白尿、腎機能低下のため当院で腎生検を施行されたものであり、同一家系内で原疾患不明のまま末期腎不全に至っている症例も存在し、何らかの遺伝子異常による疾患である可能性があった。

光学顕微鏡所見では、すべての糸球体の内皮下、傍メサンギウム、メサンギウム領域にびまん性、多量に、無構造なPAS強陽性、PAM陰性の沈着物を認めた(図1)。沈着物の形態や大きさからは浸出性病変の可能性は否定的であった。完全硬化、部分硬化した糸球体はなく、半月体形成も認めなかった。また、メサンギウム増殖はなく、炎症細胞浸潤、管外性増殖性病変は認めなかった。血管壁や尿細管など糸球体外には沈着物は認めず、間質の炎症細胞浸潤や線維化、尿細管萎縮は軽度であった。

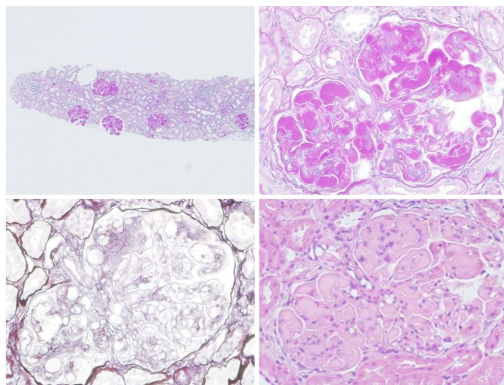


図1 糸球体内にPAS強陽性物質の沈着をびまん性に認める。
上段: PAS染色(左40倍、右400倍)、左下: PAM染色、右下: H.E.染色

電子顕微鏡では、沈着物は内皮下腔からメサンギウム領域に認められたが、内部には細線維構造を認めなかった。沈着物は解離性微小毛細血管瘤を形成していた(図2)。

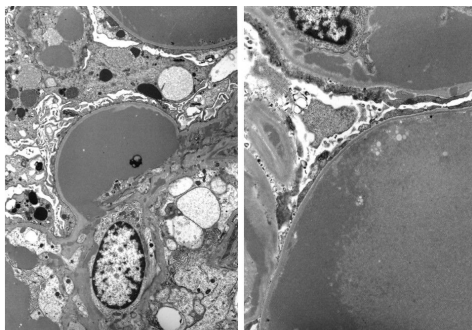


図2 電子顕微鏡で内皮下腔に無構造な沈着物を認める。
沈着物内部には細線維構造は認められない。

免疫組織学的な検討では、この沈着物は、IgM・C4が強陽性、IgG・IgAは弱陽性、C1qは陰性であった(図3)。以上の光学顕微鏡、電子顕微鏡所見から、本疾患は、沈着腎症と考えられたものの、クリオグロブリン性糸球体腎炎、イムノタクトイド腎症、Fibrillary腎症は否定的であった。免疫組織学的な検討で広範な免疫グロブリンの沈着を認めたものの、C1q陰性であり、その他の所見も典型的ではないため、SLEも否定的であった。沈着腎症の中で組織学的に類似の所見を持つフィブロネクチン腎症の鑑別のため、仙台社会保険病院病理部城謙輔先生により抗血清+抗組織フィブロネクチン、抗組織フィブロネクチン抗体で免疫染色を施行していただいた。その結果、沈着物はいずれの抗体も陰性であり(図3)、また、電子顕微鏡所見にて沈着物内部にフィブロネクチンの細線維構造を認めないことから、フィブロネクチン腎症も否定的であった。

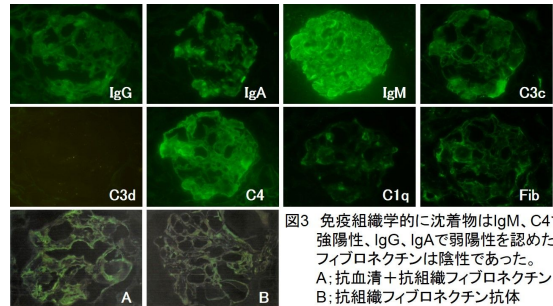


図3 免疫組織学的に沈着物はIgM、C4で強陽性、IgG、IgAで弱陽性を認めた。フィブロネクチンは陰性であった。
A: 抗血清+抗組織フィブロネクチン
B: 抗組織フィブロネクチン抗体

以上の検討から、既存の疾患で本疾患に当てはまるものはなく、現在報告されていない未知の疾患の可能性があると考えた

2. 研究の目的

本研究では、既存の疾患に当てはまらない未知の沈着腎症の沈着物を明らかとし、新たな沈着腎症を明らかとする。本疾患の患者と、同様に大量の沈着物を生じる既知の糸球体疾患、正常糸球体の保存腎生検検体からレーザーマイクロダイセクションにより糸球体を選択的に回収、沈着物の蛋白質をLC-MS/MSによるショットガン解析により網羅的に解析し、それぞれの蛋白質組成を比較、本疾患に特異的な沈着物を絞り込む。絞り込んだ蛋白質に対する抗体をそれぞれ作製し、免疫染色によりどの蛋白質が糸球体の沈着物と合致するのかを特定する。その結果、沈着物がこれまでの報告で認められないものであると確認できれば、新規の疾患として報告を行う。また、解析の結果同定した蛋白質が糸球体に異常沈着する機構について、遺伝子組み換えマウスを用いた動物実験により検討を行う。沈着機構の検討により、治療標的を推定し、当該疾患の患者および同家系者に対する治療の道筋をつくる。

3. 研究の方法

- 1) レーザーマイクロダイセクションにより糸球体を分離する。
- 2) 蛋白質を抽出し、LC-MS/MS によるショットガン解析を行う。
- 3) NCBI Inr データベースにより蛋白質を同定する。
- 4) 候補蛋白質の絞り込みを行う。

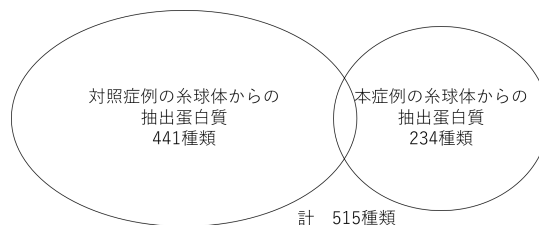
4. 研究成果

1) まず、予定の手技にて構成蛋白質の同定が可能か、アミロイドーシス検体、正常糸球体検体を用い、予備検討を行った。検体は腎生検診断後のホルマリン固定パラフィン包埋組織を使用した。検体は $10\mu\text{m}^2$ 厚に薄切し、検討を行った。上記 2 検体からレーザーマイクロダイセクションにより糸球体を分離した。その結果、2 検体からそれぞれ 2.12mm^2 、 1.67mm^2 の試料を回収することが可能であった。これらは通常解析に用いる試料量の 20% 相当ではあったが、38 種類、47 種類の蛋白質が同定可能であった。引き続き、本症例からの検体、沈着物のない対照群としての微小変化型ネフローゼ症候群からの検体を用いて検討を行った。糸球体 74 個に対して同様の処理により糸球体の分離し、本症例、対照症例からそれぞれ 1.31mm^2 、 1.11mm^2 の試料を回収した(図 4)。本症例は、診断のために複数の免疫染色を繰り返し施行していたため、予想よりも確保できた検体量が少なかった。対照症例は本症例の検体量に合わせて調整を行った。

2) 回収後、 $5\mu\text{l}$ 蛋白質抽出液を添加し、懸濁液を 95°C で 90 分間保温した後室温まで冷却した。続いて検体単位で抽出用液を混合し、 $0.5\mu\text{g}$ のトリプシンを加えた。 37°C で 16 時間保温しペプチド溶液を得た。ペプチド溶液に DTT を加えて還元反応を行い、反応液を減圧化で乾燥し、ペプチド混和物を得た。予備検討での結果、試料量が極微量であることが予想され、また今回のほうがより試料量が減少していたため、網羅的な測定モードではなく、より短い LC カラム(15cm)を使用し、測定時間も 120 分に減らし、微量試料に適した測定条件で測定を行った。

3) ペプチド MS/MS データの配列データベース検索によって蛋白質同定結果を取得した。検索ソフトウェアとして Matrix Science 社の Mascot(ver2.5)を用いた。検索用配列データセットは SwissProt 2018_01 版からヒト由来の蛋白質エントリー(計 20,259 件)を出力した。解析結果を閲覧ソフトウェア Scaffold(Proteome Software 社)に出力した。Identity threshold 以上の Mascot イオンスコアを示すペプチド同定を有意とみなし、各

蛋白質エントリーにこれらのペプチド同定を帰属させた。以上の解析の結果、本症例の糸球体からは 234 種類の、対照症例の糸球体からは 441 種類の構成蛋白質を同定した。予備検討時よりも LMD の環境、LC-MS/MS の測定条件を変更したため多数の蛋白質を同定することが可能となった。



4) 本症例では、事前の免疫組織学的検討で C4、IgM の沈着を認めていた。同定した蛋白質には、本症例からの検体にものみ C4 関連蛋白質を検出しており、解析は妥当と考えた。その他、血清中の蛋白質、線維化に関連する蛋白質、免疫関連蛋白質、細胞接着に関連する蛋白質などを検出しており、現在、候補蛋白質の絞り込みを進めている。

今後は絞り込んだ候補蛋白質それぞれに対して本疾患との関連を検討し、沈着をおこしうるか検討を行う。絞り込んだ病原候補蛋白質に対する抗体を作製し、沈着腎症、他の沈着物を認める糸球体疾患、正常糸球体の腎生検検体をそれぞれ免疫染色し、沈着物に対する染色性を検討し、沈着腎症の原因物質を同定する。同定した蛋白質が本疾患に特異的な染色を示すか他の疾患に対する免疫染色を施行し検討する。その結果、沈着物がこれまでの報告で認められないものであると確認できれば、新規の疾患として報告を行う。また、解析の結果同定した蛋白質が糸球体に異常沈着する機構について、遺伝子組み換えマウスを用いた動物実験により検討を行う。沈着機構の検討により、治療標的を推定し、当該疾患の患者および同家系系に対する治療の道筋をつくっていく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6．研究組織

(1)研究代表者

武田 尚子 (Takeda Naoko)

滋賀医科大学付属病院・血液浄化部・特任助
教

研究者番号：20737655