

令和元年6月24日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08698

研究課題名(和文)系球体病変を規定する分子の同定とその応用

研究課題名(英文)Definitive molecules for pathogenesis of glomerulonephritis

研究代表者

長濱 清隆 (Nagahama, Kiyotaka)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：00336538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、系球体腎炎の診断についてより客観的な指標の確立をすべく、質量分析を用いて系球体病変を規定する分子の同定を行った。

条件検討の結果、腎生検検体のわずかな系球体からも蛋白質の同定を行うことが可能となった。軽鎖によるアミロイドーシスでは、免疫染色で同定困難だった症例についてkappa鎖もしくはlambda鎖の同定が極めて容易となった。患者血清を用いた解析が困難な解剖例において、質量分析を用いた解析が特に有効であった。加えて、アミロイドを形成しないapoEやfibrinogenによる沈着症においても質量分析が有効であることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

系球体腎炎の診断は系球体の光学顕微鏡を用いた形態変化に基づいてなされるが、軽微な形態変化である場合、観察者間のばらつきが大きく診断の確定が困難である症例がしばしば経験される。今回、形態以外の客観的指標を確立するため質量分析を用いた解析を行った。結果、アミロイドーシスのみならず、apoEやfibrinogenの沈着による系球体病変を証明することができ、適切な治療法の提案、開発につなげることができた。従来の沈着症の概念が大きく変わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Some cases of glomerulonephritis pose problems in accurate typing of glomerulonephritis due to lack of appropriate tool for dissecting molecules responsible for glomerular lesions. We thus utilized technique of laser microdissection (LMD) and tandem mass spectrometry-based proteomic analysis (LC-MS/MS) as a sensitive and specific tool for the diagnosis of glomerulonephritis. Using kidney specimens, we successfully diagnose accurately the type of amyloid deposited in the glomeruli while immunofluorescence or immunohistochemistry failed to reveal amyloid precursors. Especially, our system was very useful for amyloid cases diagnosed solely at autopsy because serum or urine samples of autopsy cases were generally unavailable for further testing of precursors such as free light chains. In addition, we successfully determined non-amyloid depositions such as apoE and fibrinogen using renal biopsy specimens with LMD and LC-MS/MS.

研究分野：人体病理学

キーワード：系球体腎炎 質量分析

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

1. 研究開始当初の背景

多くの症例において、腎不全は糸球体障害を契機として進行するため、早期に適切な治療を導入するためには糸球体病変の分類、とくに病因に基づいた分類を行い適切な治療を早期に開始することが重要である。しかしながら、糸球体病変の分類は形態学的変化のみに基づいているのが現状で、しかも、腎病理を専門とする医師ですら意見の相違が絶えず、最終診断の確定が困難であることがしばしば経験され結果として治療方針の決定に難渋する。その原因の1つとして、形態学以外の客観的評価法に基づいた糸球体病変診断法の欠如が挙げられる。

2. 研究の目的

本研究計画ではレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) およびタンデム型質量分析法 (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS/MS) を用いて、病変糸球体に含まれる蛋白質の解析を行い、増殖性変化をきたす各種糸球体腎炎、とくに診断困難例に注目して糸球体における各種分子の発現を検討し、疾患ごとに発現プロファイルを決定する。最終的に、腎生検の診断を行う上でより客観的な指標の決定を目指した。

3. 研究の方法

研究代表者が勤務する施設から診断困難な増殖性腎炎を主体に腎生検検体のパラフィンブロックあるいは LCM 用の未染切片を収集した。当初は解剖例の検体を用いて、糸球体に存在する蛋白質を質量分析にて解析し条件検討を行った。得られた条件を元に、生検検体から同様の手技にて糸球体病変に関連する蛋白質を解析した。診断困難例については、パラフィン切片、凍結切片を用いた免疫染色を行い、質量分析の結果の妥当性を確認した。

4. 研究成果

LCM および LC-MS/MS による安定したデータを得るために、まず剖検症例を用いた検討をまず行った。LCM を用いた多数の糸球体から蛋白質を抽出し、軽鎖アミロイドーシスの症例に対して質量分析を施行したところ、生前の血清学的データに一致した軽鎖沈着を証明することができた。そこで腎生検検体を用い、より少ない糸球体数から抽出したサンプルで同様の解析を行ったところ、剖検症例と同様に軽鎖アミロイドーシスを同定することができた。続いて、診断の確定が困難であった、アミロイド陰性の腎障害例変に対して同様の解析を行ったところ、apoE が多量に検出された (図1)。

#	Visible? Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (74) Including 1 Decoy	Probability Legend		Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	
			over 95%	80% to 94%			初回腎生検	2回目腎生検
1	<input checked="" type="checkbox"/>	Apolipoprotein E OS=Homo sapiens GN=APOE PE=1 SV=1	over 95%	80% to 94%	APOE_HU...	36 kDa	79	47
2	<input checked="" type="checkbox"/>	Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4	80% to 94%	50% to 79%	VIME_HUM...	54 kDa	41	35
3	<input checked="" type="checkbox"/>	Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4	50% to 79%	20% to 49%	MYH9_HU...	227 kDa	24	28
4	<input checked="" type="checkbox"/>	Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1	20% to 49%	0% to 19%	ACTG_HU...	42 kDa	39	27
5	<input checked="" type="checkbox"/>	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	0% to 19%		K2C1_HUM...	66 kDa	31	35
6	<input checked="" type="checkbox"/>	Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=1 SV=2			ACTN4_HU...	105 kDa	37	24
7	<input checked="" type="checkbox"/>	Laminin subunit beta-2 OS=Homo sapiens GN=LAMB2 PE=1 SV=2			LAMB2_HU...	196 kDa	25	23
8	<input checked="" type="checkbox"/>	Keratin type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PF=1 SV=6			K1C10_HU...	59 kDa	26	12

図1. LC-MS/MSの結果。apoEが極めて高い頻度で検出されている (枠内)。

さらに、同一検体を用いて、免疫組織化学、また免疫電顕を用いたところ、沈着物に一致して apoE が証明された (図2)。当該症例は遺伝子検査の結果、apoE2 の遺伝子異常があることが明らかとなっており、特定の apoE2 遺伝子異常において、膜性腎症を呈することを明らかにした。また、同様に診断確定が困難なアミロイド陰性腎障害例に対して上記と同様の質量分析を行った結果、fibrinogen が検出され、蛍光抗体法による免疫染色において fibrinogen の沈着が証明された。

従来、腎機能不全をきたす沈着症はアミロイドーシスが広く知られているが、アミロイド以外の分子も同様に沈着することで腎機能不全を呈することが明らかとなった。今後、症例を集め、非アミロイド物質の沈着頻度や臨床像を明らかにしていく必要があると考えられた。

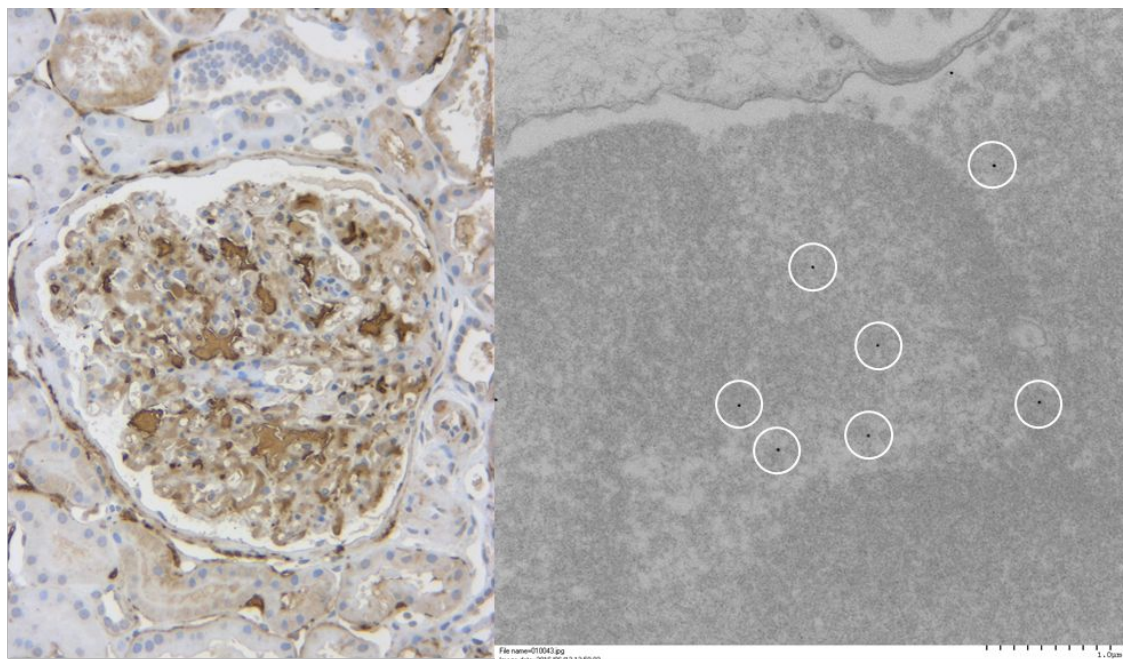


図2. 酵素抗体法では、糸球体にapoEの沈着が証明される（左）。免疫電顕では、沈着物内にapoEの沈着を認める（白枠内）（右）。

研究期間中、研究代表者の所属先の変更があった。異動先での倫理委員会等各種書類の再申請、質量分析器の変更に伴う条件再設定を行う必要があり、期間内では限られた症例数の解析にとどまった。今後、症例数を増やし、引き続き腎炎および沈着症に関する質量分析の結果を集積する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Katsuragawa F, Nagahama K, Naito S, Tsuura Y, Otani M, Koide T, Nishiyama S, Yanagi T, Nanamatsu A, Aki S, Aoyagi M, Tanaka H, Rai T, Uchida S: Ruptured infected aneurysm of the thoracic aorta associated with tunneled dialysis catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in a hemodialysis patient. *CEN Case Rep*, 査読有, 2018, DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13730-018-0352-z>
2. Kishimoto D, Kirino Y, Tamura M, Takeno M, Kunishita Y, Takase-Minegishi K, Nakano H, Kato I, Nagahama K, Yoshimi R, Igarashi K, Aoki I, Nakajima H: Dysregulated heme oxygenase-1low M2-like macrophages augment lupus nephritis via Bach1 induced by type I interferons. *Arthritis Res Ther*, 査読有, 2018, 20:64. DOI: [10.1186/s13075-018-1568-1](https://doi.org/10.1186/s13075-018-1568-1)
3. Fukunaga M, Nagahama K, Aoki M, Shimizu A, Hara S, Matsunaga A, Muso E, Saito T: Membranous Nephropathy-Like Apolipoprotein E Deposition Disease with Apolipoprotein E Toyonaka (Ser197Cys) and a Homozygous Apolipoprotein E2/2. *Case Rep Nephrol Dial*, 査読有, 2018, 8:45–55.
4. Yamazaki J, Kanehisa E, Yamaguchi W, Kumagai J, Nagahama K, Fujisawa H: Idiopathic collapsing focal segmental glomerulosclerosis in an 81-year-old Japanese woman: a case report and review of the literature. *CEN Case Rep*, 査読有, 2016, 5:197–202.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Nomura N, Naito S, Okado T, Rai T, Nagatsuji K, Nagahama K, Mishima E, Mochizuki T, Sekine A, Mori T, Hoshino J, Ubara Y, Uchida S, Sohara E, Mandai S, Chiga M, Kikuchi H, Ando F, Mori Y, Susa K, Isobe K: Genomic Background of Adults with Suspected Ciliopathy on Renal Biopsy. *Kidney Week 2018*.
2. Fukunaga M, Nagahama K, Aoki M, Shimizu A, Shigeo H, Matsunaga A, Muso E,

Saito T: Membranous Nephropathy-like Deposition of Apolipoprotein E in a patient with Apolipoprotein E Toyonaka (Ser197Cys) and a Homozygous Apolipoprotein E2/2. ISN FRONTIERS 2018.

3. 桂川史子, 西山早乃, 小出高彰, 大谷恵, 柳智貴, 七松東, 安藝昇太, 青柳誠, 田中啓之, 長濱清隆: ネフローゼ症候群を呈し腎生検を施行した妊娠 16 週の一例. 第 47 回日本腎臓学会東部学術大会 2017.
4. 柳智貴, 大谷恵, 小出高彰, 西山早乃, 桂川史子, 七松東, 安藝昇太, 青柳誠, 田中啓之, 長濱清隆: 緩徐な経過を辿った抗糸球体基底膜 (GBM) 抗体型糸球体腎炎の 1 例. 第 47 回日本腎臓学会東部学術大会 2017.
5. 金久恵理子, 中野雄太, 大橋敦希, 山室めぐみ, 山口若葉, 熊谷二郎, 長濱清隆, 藤澤一.: ステロイドとシクロスポリンにより透析を離脱した TAFRO 症候群の一例. 第 47 回日本腎臓学会東部学術大会 2017.
6. 源馬拓, 大石真理子, 平井俊行, 西田秀範, 藤井徹郎, 長濱清隆: 高齢女性に発症した TINU 症候群に対し経口ステロイド投与で加療した一例. 第 47 回日本腎臓学会東部学術大会 2017.
7. 山室めぐみ, 中野雄太, 大橋敦希, 金久恵理子, 山口若葉, 熊谷二郎, 長濱清隆, 藤澤一.: ANCA 関連血管炎に続発する TMA を発症し、免疫抑制剤と血漿交換療法にて透析を離脱した 1 例. 第 47 回日本腎臓学会東部学術大会 2017.
8. Aoki M, Kang D, Katsuma A, Okabayashi Y, Kanemitsu T, Kajimoto Y, Nagahama K, Shimizu A: The Diagnosis of Renal Amyloidosis Using Laser Microdissection and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. Kidney Week 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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

<https://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/education/staff/detail/?id=med51024>

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。