

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19488

研究課題名(和文) Collagenofibrotic glomerulopathyの病態解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of collagenofibrotic glomerulopathy

研究代表者

後藤 俊介 (GOTO, Shunsuke)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40457057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Collagenofibrotic glomerulopathyという稀な腎臓病の病因を解明するため、本疾患で血清中のヒアルロン酸が著明に高値となる原因を調べた。結果として増加しているヒアルロン酸は分子量100kDa未満である可能性が示された。またヒアルロン酸と同じグリコサミノグリカンであるコンドロイチン硫酸コアタンパクが著明に増えている可能性が示された。ヒアルロン酸の合成酵素や分解酵素および産生を刺激するTGF- $\beta$ やIL-4との関連は見いだせなかった。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the pathogenesis of rare kidney disease collagenofibrotic glomerulopathy, we investigated the causes of marked elevation of serum hyaluronan levels in this disease. Our results have demonstrated that molecular weight of increasing serum hyaluronan was under 100 kDa. In addition, serum levels of core protein of chondroitin sulfate was markedly increased in patients with collagenofibrotic glomerulopathy. On the other hand, either the hyaluronan synthase, hyaluronidase, TGF- $\beta$ , or IL-4 was not associated with collagenofibrotic glomerulopathy.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎不全 ヒアルロン酸 グリコサミノグリカン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Collagenofibrotic glomerulopathy は型コラーゲンの糸球体への沈着を特徴とする疾患で、腎予後は悪く 10 年で 50% が透析導入になるといわれている。現在までに国内で 30 例程度しか報告がない稀少腎疾患であるが、この疾患の病因・病態はほとんどわかっておらず、治療法も確立されていない。

我々は collagenofibrotic glomerulopathy において血清中のヒアルロン酸が基準値の 1000 倍以上高いことを発見した。血清中のヒアルロン酸は肝疾患や炎症性疾患、腎不全でも上昇するが、基準値の 1000 倍以上上昇することは極めて稀で、高ヒアルロン酸血症は collagenofibrotic glomerulopathy の臨床診断マーカーとなり、また病因に深く関わっている可能性があると思われる。

ヒアルロン酸の合成にはヒアルロン酸合成酵素 (HAS) またヒアルロン酸の分解にはヒアルロニダーゼ (HYAL) が関わっている。collagenofibrotic glomerulopathy において、血清中の HYAL の活性や主な HYAL とされている HYAL-1 および HYAL-2 の蛋白量については健常人と変わらないという結果を、我々の検討で報告しているが、それ以外の検討はなされていない。また本症例において尿中からのヒアルロン酸の排泄や、TGF- $\beta$  などのヒアルロン酸の産生を増やすことされている因子の検討もされていない。

またヒアルロン酸はグリコサミノグリカンの一種であるが、ヒアルロン酸以外のグリコサミノグリカンが collagenofibrotic glomerulopathy において異常を呈しているか検討した報告もない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は大きく 2 つに分けられた。一つは collagenofibrotic glomerulopathy における高ヒアルロン酸血症の原因を検討するために様々な検討を行った。もう一つは

collagenofibrotic glomerulopathy において、グリコサミノグリカンの一種であるコンドロイチン硫酸の異常があるかどうかについて検討した。

この二つの目的を達成するために、血液および尿における HAS および HYAL の解析および血清中のヒアルロン酸の分子量同定、尿中のヒアルロン酸測定、ヒアルロン酸増加作用のある物質の測定、グリコサミノグリカンの 1 種であるコンドロイチン硫酸および関連因子の解析の、4 つの項目について検討を行った。

## 3. 研究の方法

(1) Collagenofibrotic glomerulopathy 患者の HAS や HYAL について検討するために、HAS や HYAL の血液および尿中の mRNA の測定と、ヒアルロン酸の分子量を測定からどの HAS や HYAL が関わっているか推測した。

血液および尿からの RNA の抽出はキットを用いて抽出する。そして Real-time PCR にて HAS として HAS-1、HAS-2、HAS-3 および HYAL として HYAL-1、HYAL-2、HYAL-3、HYAL-4 の RNA を測定した。

また collagenofibrotic glomerulopathy 患者の血清中から得た粗グリコサミノグリカン画分をアガロース電気泳動にて分離し、ヒアルロン酸結合蛋白 (HABP) を用いてバンドを検出する。そして分子量の分かっているヒアルロン酸も同時に流し、血清中のヒアルロン酸の分子量を測定した。

(2) Collagenofibrotic glomerulopathy における尿からのヒアルロン酸の排泄について検討するため、尿中のヒアルロン酸の濃度を測定した。

(3) ヒアルロン酸産生を亢進させる作用のある物質として TGF- $\beta$  および IL-4 について、collagenofibrotic glomerulopathy 患者の血清を用いて、血清中の濃度を測定した。

(4) ヒアルロン酸はグリコサミノグリカ

ンと呼ばれる枝分れの無い多糖の一種であるが、グリコサミノグリカン他にもいくつか存在する。そのグリコサミノグリカンの一つであるコンドロイチン硫酸について検討した。

具体的には、HPLC を用いて血清中のコンドロイチン硫酸の濃度およびコンドロイチン硫酸の二糖組成分析を行った。またコンドロイチン硫酸はコアとなるタンパクと結合したプロテオグリカンであるため、このコアタンパクの測定を Western blotting で行った。具体的には血清をコンドロイチナーゼで処理を行い、コアタンパクにコンドロイチン硫酸の切株構造を生成させ、その切株構造に特異的な 2B6 または 3B3 に対する特異的な抗体を用いて、Western blotting を行った。

(5) 初年度の検討から、collagenofibrotic glomerulopathy 患者において、180kDa を超える分子量の 3B3 陽性のコアタンパクが著明に増えている可能性が示唆されたため、その蛋白が何であるか検討を行った。

具体的にはまず既存のコアタンパクとして知られている、versican、aggrecan、phosphacan、neurocan について Western blotting を行った。また血清について、アルブミンと IgG をカラムで除去後、免疫沈降を用いて蛋白の精製を行い、その後 LC/MS/MS を用いて質量分析を行った。

#### 4 . 研究成果

(1) Collagenofibrotic glomerulopathy 患者における血中および尿中の HAS-1、HAS-2、HAS-3 および HYAL-1、HYAL-2、HYAL-3、HYAL-4 の mRNA を Real-time PCR で測定を行ったが、これらの項目について、健常人と比較して、大きな差は認めなかった。

また血清中ヒアルロン酸の分子サイズの測定を行ったところ、40~80kDa のヒアルロン酸分子量マーカーよりやや大きいサイズ (~100kDa) のところに HABP 陽性のバンド

を認め、100kDa までの分子量のヒアルロン酸が血中に増加していることが示された。

(2) 尿からのヒアルロン酸の排泄について、尿中のヒアルロン酸の測定を行ったところ、クレアチニン補正で 5205 ng/gCr と健常コントロール (34 ng/gCr) と比べ著明に高値であり、尿への排泄低下により血液中のヒアルロン酸が高値であることを示すデータは得られなかった。

(3) ヒアルロン酸増加作用があるといわれている因子として TGF- $\beta$ 、IL-4 について血中の値について測定を行った。TGF- $\beta$  は 4.88 ng/ml (基準値 : 1.56 ~ 3.24 ng/ml) と基準値と比べ高値であったが軽度で、また IL-4 は感度以下 (基準値 : 感度以下) であり、collagenofibrotic glomerulopathy 患者におけるヒアルロン酸著明高値の原因とは考えづらかった。

(4) 血中のコンドロイチン硫酸および血中のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの測定の結果としては、血中のコンドロイチン硫酸は collagenofibrotic glomerulopathy 患者では 28075.3 pmol/ml と健常コントロール (16920.5 pmol/ml) に比べ高値ではあったが、ヒアルロン酸と比較するとそれほど高値ではなかった。また血中の主なコンドロイチン硫酸の二糖組成を検討したところ、どちらも 4 硫酸化構造で組成にも差は認めなかった。

コアタンパク質の検討においては 2B6 による検討では特に差を認めなかったが、3B3 による検討では 180kDa 以上のところで、3B3 陽性のコアタンパク質が顕著に増加していることが示された。

(5) 既存のコアタンパクとして versican、aggrecan、phosphacan、neurocan について Western blotting を行ったが、どれも collagenofibrotic glomerulopathy 患者において顕著な増加を認めなかった。また質量分析の結果において、健常人と異なるタンパク質を同定することはできなかった。

以上今回の研究の結果をまとめると、mRNAの検討では HAS や HYAL での関連を見出すことはできなかった。ただ本疾患で増えているヒアルロン酸は 100kDa 未満のものである可能性が示唆された。

また尿中からの排泄低下がある可能性は示されず、またヒアルロン酸の産生を刺激する因子の著明な増加も認めなかった。

コンドロイチン硫酸における検討では 3B3 陽性のコアタンパクが著明に増加している可能性が示された。今回の検討ではそのタンパクの具体的な同定には至らなかったが、今後さらなる検討を行うことで、本疾患の病態に結び付けたい。

#### 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 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

[ その他 ]

ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

後藤 俊介 ( GOTO, Shunsuke )

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 40457057

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

##### (4) 研究協力者

( )