

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790264

研究課題名（和文） 傷害により誘導される蛋白質 CARP を用いた
糸球体腎炎の診断と治療法の確立研究課題名（英文） Development of assessment method for glomerular nephritis
with cardiac ankyrin-repeat protein.

研究代表者

中田 知里(NAKADA CHISATO)

大分大学・医学部・技術職員

研究者番号：60379625

研究成果の概要：これまでに、糸球体腎炎の蛸足細胞において CARP 蛋白質が発現誘導されることが分かっていた。今回の研究では、腎炎患者の尿中に剥離した蛸足細胞から CARP 蛋白質が検出できることが明らかとなった。また種々の糸球体腎炎によって CARP 陽性細胞の尿中への出現頻度が異なっていることから、CARP を指標とした腎炎の病態のモニターが可能であるかもしれない。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,000,000	0	1,000,000
20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	330,000	2,430,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：CARP 蛋白質・糸球体腎炎

1. 研究開始当初の背景

Cardiac ankyrin-repeated protein (CARP) は、血管内皮細胞に炎症性サイトカイン(IL-6, TNF α)を添加することにより誘導される蛋白質として単離同定された蛋白質である。そのうち、所属研究室において、CARP は正常骨格筋組織では発現していないのに対して、ネマリンミオパチー、ミオチューブラーミオパチー、セントラルコア病などの先天性ミオパチーや、筋萎縮性側索硬化症などの神経筋疾患の萎縮骨格筋で発現誘導されることが発見された(Nakada et al., Pathobiology, 2004、Nakamura et al., Pathobiology, 2002)。また、

マウス除神経モデルにおいて、骨格筋で一過性に発現誘導された(Tsakamoto et al., 2002)。以上のことから、傷害された細胞で発現誘導され、何らかの機能を果たしていると考えられた。さらに、別のグループからは心筋梗塞領域の心筋細胞において CARP が誘導されることが報告された(Zolk et al., Biochem Biophys Res Commun, 2002)。また別のグループから、CARP が創傷治癒過程の肉芽組織で発現亢進すること、さらに CARP 発現アデノウイルスにより肉芽組織に CARP を過剰発現させると、内皮細胞の生存率が向上することで血管新生が亢進し、治癒が促進される

ことが報告された(Shi et al., Am J Pathol, 2005)。したがって CARP は傷害された細胞で誘導され、壊死を免れるような保護作用を有するのではないかと考えられている。

一方、最近、所属研究室において、CARP が糸球体腎炎の蛸足細胞で発現誘導することが発見された。興味深いことに、発現誘導はすべての症例でみられるのではなく、ネフローゼ症候群(重症の蛋白尿)を呈する重症例のみで観察された(Matsuura et al., Human Pathology, 2006)。蛸足細胞は糸球体のろ過機能を担っており、糸球体腎炎のメカニズムにおいて蛸足細胞に対する傷害が重要である(Barisoni et al., Am J Nephrol, 2003、Kerjaschki et al., J Clin Invest, 2001、Somlo et al., Nat Genet, 2000)。したがって、糸球体腎炎において CARP が蛸足細胞に誘導されるという我々の知見から、蛸足細胞に対する傷害に対して CARP が誘導され、保護作用を果たしている可能性が推測された。

2. 研究の目的

(1) 腎炎尿沈さを用いた ELISA による CARP 検出システムを構築する

糸球体腎炎の確定診断、病態のモニターには、腎生検が必要である。しかし、腎生検は処置後にしばしば出血がみられること、数日間の安静が必要であることなど、患者の身体的、社会的負担が大きい。腎炎尿沈さを用いた ELISA による CARP 検出が成功すれば、糸球体腎炎の確定診断、病態モニターに役立ち、将来的に患者の負担の軽減につながる可能性がある。

(2) CARP が蛸足細胞傷害に対して保護的な効果を有するか否かを解析し、糸球体腎炎の遺伝子治療モデルとなりうるか、その可能性を検討する

CARP を蛸足細胞に強制発現させることで、傷害を緩和し、糸球体腎炎の進行を抑制できるのではないかと考え、糸球体腎炎の治療モデルとなりうるか、その可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 糸球体腎炎患者の尿中剥離細胞

(尿沈さ)における CARP 蛋白質の検出

まず、CARP 蛋白質が尿沈さから検出できるかどうかを確認する。

糸球体腎炎と診断された患者の尿から、遠心により沈殿された細胞を回収する。

回収した細胞をサイトスピンによってスライドグラスに貼り付け、免疫染色により CARP 蛋白質を検出する。

蛸足細胞のマーカースとしてポドカリキシ

ン、シナプトポディンを利用し、CARP 抗体との蛍光二重染色を行い、尿中に剥離した蛸足細胞を同定し、これが CARP 蛋白質を発現する頻度を検討した。

(2) CARP 発現が腎炎の病態のモニターや診断に有効であるかどうかを検討する

個々の腎炎患者において、尿沈さにおける CARP 蛋白質の検出と、糸球体腎炎の重症度や病態が関連するか否かを調べ、モニターが可能であるかを調べる。

腎炎の組織学的分類

蛋白尿検出の有無や尿中蛋白量

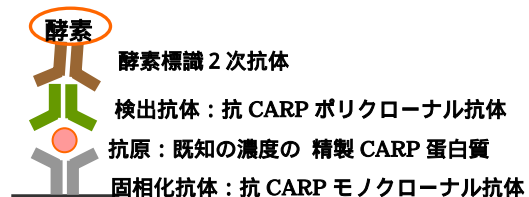
血清アルブミン量

の項目について、CARP 発現と関連があるかどうかを検討する。

(3) 抗 CARP モノクローナル抗体を用いた CARP 蛋白質の検出用 ELISA システムの構築

ELISA 法には、動物種の異なる 2 種類の抗体が必要である。我々は以前に抗 CARP ポリクローナル(ウサギ)抗体を作製し、これまでの解析に用いている。今回、抗 CARP モノクローナル(マウス)抗体を作製し、両抗体を用いた、サンドイッチ法による CARP 検出 ELISA システムを構築する。

サンドイッチ法に基づく ELISA プレート



固相化抗体と検出抗体を逆にしたイムノプレートも作製し、どちらの検出感度がよいかを比較する

抗 CARP モノクローナル抗体を大量精製する。ハイブリドーマをヌードマウスに移植し、腹水から高濃度のモノクローナル抗体を得る。CARP ポリクローナル抗体はウサギ血清よりアフィニティー精製する。

抗 CARP モノクローナル抗体を固相化したイムノプレートを作製する。抗原として、既知の濃度の精製 CARP 蛋白質を用いる。あるいは、CARP 蛋白質を過剰発現させた 293 細胞の蛋白質抽出液を反応させる。続いて抗 CARP ポリクローナル抗体を検出抗体とし、さらに酵素標識 2 次抗体を反応させ、イムノプレートの検出感度を評価する。さらに、反応時の両抗体の濃度を最適化する。

逆に、抗 CARP ポリクローナル抗体を固相化し、ポリクローナル抗体を検出抗体としたイムノプレートを作製する。 で作製したプ

レートと検出感度を比較し、よい方を CARP-ELISA システムとして以後の実験に用いる。

(4) マウス糸球体腎炎モデルにおける CARP 蛋白質の発現の検討

糸球体腎炎の実験動物モデル(マウス)として、

- LPS 腹腔内投与
- アドリアマイシンの尾静脈注射
- アンギオテンシン投与

がしばしば用いられている。

これらのモデルにおいて、蛸足細胞に CARP の発現が誘導されるかを調べた。

マウスに薬剤投与後(コントロール群には PBS を注射) 1 週間、2 週間後に腎臓を摘出し、ホルマリン固定、パラフィン包埋し、CARP とシナプトポディン(蛸足細胞マーカー)について蛍光二重染色を行った。糸球体における CARP 陽性率を調べた。

4. 研究成果

(1) 糸球体腎炎患者の尿中剥離細胞(尿沈さ)に、蛸足細胞が剥離してくること、また、CARP 蛋白質の発現が検出できることを確認した。

糸球体腎炎患者のべ 86 人から尿試料の提供を受け、そのうち 76 検体を実験に用いた。

診断	症例数
IgA 腎症	38
膜性腎症	13
糖尿病性腎症	6
微小変化型ネフローゼ症候群	4
巣状糸球体硬化症	3
その他	12
	計 76 例

76 例中 33 例(43.4%)で CARP 陽性細胞が検出された。沈さには円柱上皮も含まれていたが、これには CARP 発現は認められなかった。

(2) 種々の糸球体腎炎により、尿沈さ中への CARP 陽性細胞の出現頻度が異なっていた。

IgA 腎症と糖尿病性腎症では、CARP 陽性症例の頻度が高く(50%以上)また、陽性症例における尿沈さにおいて、CARP 陽性細胞の出現数も多い傾向があった。

膜性腎症と、微小変化型ネフローゼ症候群においては、CARP 陽性細胞の出現数が低かった。

検討した 76 例には、扁摘やステロイド、アンギオテンシンレセプター阻害剤などによる治療がなされている症例がある。これらの治療により、CARP の発現誘導が抑制された症例が含まれる可能性があるため、今後治療の有無を考慮して結果を再検討する必要がある。

(3) CARP-ELISA 構築のための抗 CARP マウスモノクローナル抗体の作製

抗体産出ハイブリドーマの作製を 3 度試みた(マウスの系統を変えるなどの手法の改善を行った)。しかしながら、精製 CARP 蛋白質には反応するが、内因性の CARP 蛋白質に反応しない、あるいは、反応しても IgM クラスであったといったことから、モノクローナル抗体の大量精製に至らなかった。このため、研究期間中に CARP-ELISA の構築まで至らなかった。

(4) マウス糸球体腎炎モデルにおける CARP 蛋白質の発現の検討

LPS を腹腔内投与またはアドリアマイシンを尾静脈注射すると、蛸足細胞が傷害され、蛋白尿が検出されることから、ネフローゼ症候群を伴う腎炎モデルの一つとして用いられている(Reiser et al., J Clin Invest 2004, Teixeira et al., Kidney Int 2005)。

血圧の制御に関与しているレニン・アンギオテンシン系も糸球体腎炎の発症・進展に重要であると考えられている。マウスにアンギオテンシンを腹腔内投与すると糸球体腎炎を引き起こす。

LPS 投与、アドリアマイシン投与モデルについて

コントロール群に比較して、糸球体における CARP 陽性率が、LPS 投与群では 4.4 倍、アドリアマイシン投与群では 5.0 倍に上昇した。シナプトポディン陽性率は、LPS 投与群において 50%に低下した。アドリアマイシン投与群では変化がなかった。

アンギオテンシン投与モデルについて

と同様に CARP 発現が誘導され、コントロール群に比較して CARP 陽性率が 3.1 倍に上昇した。シナプトポディン陽性率は 12.5%に低下した。

3 種類の薬剤における腎炎モデルは、起序が異なっており、糸球体におけるシナプトポディンの陽性率が異なることから、蛸足細胞障害のメカニズムが異なっていると考えられる。一方、すべての薬剤で CARP が誘導されたことから、CARP は糸球体腎炎のマーカーとして有用であると考えられる。

CARP 蛋白質は主に心筋、骨格筋において発

現し、筋線維のサルコメアに局在していることから、主に心筋や骨格筋における解析がなされている(Wei et al. Eur J Heart Fail. 11:559-66 (2009)、Torrado et al. Gene. 440:28-41 (2009)、Lee et al. Exp Mol Med. 41(4):243-52 (2009)、Lehti et al. J Appl Physiol. 106:1419-24 (2009)、Laure et al. FEBS J. 276:669-84 (2009))。しかし、腎臓系球体における CARP 発現に注目している研究グループは他にはない。

系球体腎炎の確定診断、病態のモニターには腎生検が必要であるが、これは患者の身体的、社会的負担が大きい検査法である。尿検査で病態モニターできれば、患者の負担をなくすことができる。今回の研究では、CARP 陽性細胞が腎炎尿沈さ中に検出された。今後 CARP が病態と関連することが示されれば、ELISA 法といった簡便な検査法の構築が可能であると考えられる。

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 1 件)

Arpp/Ankrd2, a member of the Muscle Ankyrin Repeat Proteins (MARPs), translocates from the I-band to the nucleus after muscle injury.

Histochemistry and Cell Biology 129 (1) 55-64, 2008

Yoshiyuki Tsukamoto, Naoki Hijiya, Yano S, Yokoyama S, Chisato Nakada, Tomohisa Uchida, Keiko Matsuura, Masatsugu Moriyama
査読あり

6. 研究組織

(1)研究代表者

中田 知里 (NAKADA CHISATO)

大分大学・医学部・技術職員

研究者番号：60379625