

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07445

研究課題名（和文）質量分析法を用いた抗刷子縁抗体病の病態解明と疾患関連バイオマーカーの検索

研究課題名（英文）Identification of potential biomarkers for elucidation of pathogenesis in anti-brush border antibody disease by mass spectrometry

研究代表者

康 徳東（Kang, Dedong）

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：00571952

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：新しく腎疾患概念として提唱された抗刷子縁抗体病は、重篤な腎尿細管障害により急速に腎機能が低下する予後不良の疾患である。原因不明の腎尿細管障害として認識され、発生機序の解明と治療法の開発が急がれている。近年LC-MS/MS法を用いた微量タンパク質解析の著しい進歩により、疾患メカニズムに関連した因子の解析が原理的に可能になってきた。本研究ではHeymann腎炎を用い、ヒトABBADの発症メカニズムを明らかにすることを目的とする。得られた知見は薬剤性や虚血性尿細管、さらに糸球体疾患の二次的尿細管間質障害の機序にも関連し、腎機能低下のCommon pathwayを阻止する治療戦略に繋がると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マーカー蛋白を用いた診断法の開発により、近位尿細管障害の早期診断が可能になり、適切な治療の早期開始で患者の予後が改善される。新規治療法が開発されることで、現在の治療法では効果が限定的な患者に対しても有効な治療が提供され、患者の生活の質が向上する。早期診断と治療により、腎疾患の進行が抑制され、特に慢性腎臓病の末期腎不全進行を防ぐことで高額な透析治療の必要性が減り、長期的な医療コストの削減につながる。得られた知見を基に、腎臓病予防と早期発見の重要性について啓発活動が強化され、一般市民の健康意識が向上し、生活習慣改善や定期的な健康チェックの推進が期待される。

研究成果の概要（英文）：Anti-brush border antibody disease, a newly proposed renal disease concept, is a disease with a poor prognosis in which renal function rapidly declines due to severe renal tubular damage. Recognized as a renal tubular disorder of unknown cause, there is an urgent need to elucidate the mechanism and develop treatments. In recent years, remarkable advances in trace protein analysis using LC-MS/MS methods have made it possible in principle to analyze factors related to disease mechanisms. The purpose of this study is to clarify the onset mechanism of human ABBAD using Heymann's nephritis. The findings obtained are related to the mechanisms of tubulointerstitial damage secondary to drug-induced and ischemic tubules, as well as glomerular diseases, and are expected to lead to therapeutic strategies that block the common pathway of renal function decline.

研究分野：病理学

キーワード：LCMS/MS 腎疾患 尿細管間質 近位尿細管 Megalin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗刷縁抗体病 (Anti-brush border antibody disease: ABBAD) は、新しい腎臓疾患概念として提唱されており、急速に腎機能が低下し、予後不良となる深刻な腎尿細管障害を引き起こす疾患である。この疾患は血中の Megalin に対する自己免疫抗体が関与しているが、尿細管障害を引き起こすメカニズムについては不明な点が多く存在している。質量分析方法 (Mass Spectrometry: MS) は、ABBAD のような複雑な疾患におけるタンパク質やペプチドの同定および定量において強力なツールである。特に、LCMS (液体クロマトグラフィー質量分析) は、尿細管障害に関与する分子を詳細に解析するために用いられる。LCMS によって、血中および尿中の自己抗体や関連するタンパク質のプロファイリングが可能となり、ABBAD の病態メカニズムの解明に貢献する。Heymann 腎炎は、自己免疫性腎疾患のモデルとして広く研究されており、Megalin に対する抗体が関与する疾患である。このモデルは、ABBAD の病態解明において重要な洞察を提供する可能性がある。Heymann 腎炎では、抗体が近位尿細管の刷子縁に結合し、補体の活性化を引き起こすことで、細胞障害と炎症反応が誘導される。これにより、尿細管基底膜に沈着物が形成され、腎機能の低下が引き起こされる。ABBAD においても、類似のメカニズムが関与していると考えられ、抗刷縁抗体が Megalin に結合することで、尿細管上皮細胞の障害が引き起こされる可能性がある。しかし、具体的な分子メカニズムや、どのような補体成分やシグナル伝達経路が関与しているかについては、さらに詳細な研究が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ABBAD の Heymann 腎炎モデルラットの近位尿細管上皮障害を LC-MS/MS で関連バイオマーカーを探究し、本疾患の形成メカニズムを解析することである。

3. 研究の方法

(1) 本研究には Lewis/SsNS1c (Lewis) 及び Sprague Dawley (SD) の 2 系統のラットを使用する。Heymann 腎炎 (HN) は SD ラットより腎近位尿細管刷子縁蛋白 (FxA1) 抗原を抽出し、Lewis ラットに投与後誘導される膜性腎症モデルであり、他の系統ラットにより Lewis ラットで発症させやすいことがわかっている。また、このモデルは FxA1 抗原を Lewis ラットの footpad に投与して免疫し抗体を産生させて惹起する Active 型 (AHN) 腎炎と家兎抗ラット FxA1 抗体を SD と Wister ラットに静注して惹起する Passive 型 (PHN) 腎炎に大別さ

れる。

(2) 3型のモデルで免疫複合体沈着による腎系球体及び尿細管障害を病理組織学、生化学、分子生物学的に検討する。各々の尿・末梢血・腎組織をレーザーマイクロディゼクション(LMD)およびLC-MS/MSにて関連因子を網羅的に解析する。さらに腎尿細管間質の特定部位をLMDで切り出し、mRNA量とタンパク量を測定する。同定したタンパク質をABBAD病理組織に免疫染色や免疫電子顕微鏡を施行して局在を確認する。

4. 研究成果

(1) Heymman 腎炎ラットモデルの確立

使用動物の匹数を計画通りの範囲内で使用し、Low Dose 群 と High Dose 群に分け、尿タンパクや血中クレアチニンの濃度を測定した。High Dose 群のラットには広範囲の炎症細胞浸潤を伴う尿細管間質炎、近位尿細管の刷子縁の消失が形態学的に確認された。ABBAD モデルとして実験に必要な数の High Dose 群のラットを作成した。

(2) 近位尿細管上皮障害および尿細管基底膜沈着物形成におけるマーカー蛋白の解析

近位尿細管上皮障害および尿細管基底膜の沈着物の形成におけるマーカー蛋白を明らかにするため、発症時期の異なるラットに対して IgG, C3, megalin, cublin などの分布変化を蛍光抗体法で検討し、電子顕微鏡を用い尿細管基底膜の沈着物も確認できた。また、LMD-LCMS/MS 法で近位尿細管を単離し、傷害された近位尿細管に蛋白の変化を網羅的に検討した。

この研究は近位尿細管上皮障害および尿細管基底膜沈着物形成におけるマーカー蛋白を明らかにするだけでなく、将来発現した蛋白を目標とする尿細管炎の進行を抑制する新規治療方法の開発にも非常に意義があるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Li Yuan, Zhang Ying, Zhou Xinjin, Xue Xinli, Wang Muxi, Kang Dedong, Zhou Yali, Hu Ruimin, Quan Songxia, Xing Guolan, Yang Jinghua	4. 巻 24
2. 論文標題 Precise diagnosis and typing of early-stage renal immunoglobulin-derived amyloidosis by label-free quantification of parallel reaction monitoring-based targeted proteomics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Nephrology	6. 最初と最後の頁 481 ~ 484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12882-023-03105-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Gunji Mariko, Sawa Chika, Akiyama Minako, Mukai Shumpei, Takaki Takashi, Kang Dedong, Honda Kazuho	4. 巻 9
2. 論文標題 Gencitabine alters sialic acid binding of the glycocalyx and induces inflammatory cytokine production in cultured endothelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-022-00347-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Arakawa Haruna, Yokoyama Shohei, Ohira Takehiro, Kang Dedong, Honda Kazuho, Ueda Yoshihiko, Tojo Akihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Juvenile Membranous Nephropathy Developed after Human Papillomavirus (HPV) Vaccination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 1442 ~ 1442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines10091442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akiyama Minako, Shimomura Kosuke, Yoshimoto Hiroshi, Sako Minako, Kodama Makoto, Abe Keiko, Gunji Mariko, Kang Dedong, Takaki Takashi, Wada Yukihiro, Iyoda Masayuki, Honda Kazuho	4. 巻 481
2. 論文標題 Crohn's disease may promote inflammation in IgA nephropathy: a case?control study of patients undergoing kidney biopsy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 553 ~ 563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-022-03373-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishimitsu Akira, Tojo Akihiro, Hirao Jun, Yokoyama Shohei, Ohira Takehiro, Murayama Yoshiki, Ishimitsu Toshihiko, Kang Dedong, Honda Kazuho, Ehara Takashi, Ishida Kazuyuki, Ueda Yoshihiko	4. 巻 61
2. 論文標題 AL-Kappa Primary Amyloidosis with Apolipoprotein A-IV Deposition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 871 ~ 876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.7955-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lan Ping, Kang Dedong, Mii Akiko, Endo Yoko, Tagawa Masako, Yu Xiaoyang, Lyu Jia, Xie Liyi, Shimizu Akira, Terasaki Mika	4. 巻 26
2. 論文標題 Evaluation of ultrastructural alterations of glomerular basement membrane and podocytes in glomeruli by low-vacuum scanning electron microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 216 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02147-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishimitsu Akira, Tojo Akihiro, Hirao Jun, Yokoyama Shohei, Ohira Takehiro, Murayama Yoshiki, Ishimitsu Toshihiko, Kang Dedong, Honda Kazuho, Ehara Takashi, Ishida Kazuyuki, Ueda Yoshihiko	4. 巻 61
2. 論文標題 AL-Kappa Primary Amyloidosis with Apolipoprotein A-IV Deposition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 871 ~ 876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.7955-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mukai Shumpei, Takaki Takashi, Nagumo Tasuku, Sano Mariko, Kang Dedong, Takimoto Masafumi, Honda Kazuho	4. 巻 54
2. 論文標題 Three-dimensional electron microscopy for endothelial glycocalyx observation using Alcian blue with silver enhancement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 95 ~ 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-020-00267-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawata Naoto, Kang Dedong, Aiuchi Toshihiro, Obama Takashi, Yoshitake Osamu, Shibata Takanori, Takimoto Masafumi, Itabe Hiroyuki, Honda Kazuho	4. 巻 25
2. 論文標題 Proteomics of human glomerulonephritis by laser microdissection and liquid chromatography tandem mass spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nephrology	6. 最初と最後の頁 351 ~ 359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nep.13676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ibuki Emi, Shiraishi Aiko, Sofue Tadashi, Kushida Yoshio, Kadota Kyuichi, Honda Kazuho, Kang Dedong, Joh Kensuke, Minamino Tetsuo, Haba Reiji	4. 巻 21
2. 論文標題 Characteristic electron-microscopic features of cryofibrinogen-associated glomerulonephritis: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Nephrology	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12882-020-1696-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yang Kaibo, Kang Dedong, Chen Lei, Ning Hong, Hu Yuedong, I. Leiderman Yannek	4. 巻 40
2. 論文標題 Diagnostic and Therapeutic Challenges	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Retina	6. 最初と最後の頁 591 ~ 594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IAE.0000000000002401	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 康 徳東、相内敏弘、高木孝士、澤智華、板部洋之、矢持淑子、本田浩一、本田一穂
2. 発表標題 LCMS/MS法を用いた糸球体腎炎の近位尿細管のプロテオミクス解析法の確立
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 康 徳東, 相内 敏弘, 高木 孝士, 澤 智華, 板部 洋一, 本田 一穂
2. 発表標題 プロテオミクス解析を用いたラットHeymann腎炎モデルにおける尿中蛋白の解析
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 康 徳東, 相内 敏弘, 高木 孝士, 板部 洋之, 矢持 淑子, 本田 浩一, 本田 一穂
2. 発表標題 LMD-LC-MS/MS法を用いたラット膜性腎症モデルの病態に関与する蛋白の検討
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川西 邦夫, 康 徳東, 渡邊 幸秀, 広川 貴次, 加藤 光保, 遠藤 知美, 鈴木 智, 小川 弥生, 清水 章
2. 発表標題 変貌する糸球体疾患の概念:近年のトピックス Fibriillary腎炎とDNAJB
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 康 徳東, 余 暁洋, 高木孝士, 竹内和博, 澤 智華, 清水 章, 本田一穂
2. 発表標題 ラット腎臓の発生におけるネフロンの3次元再構築
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 康 徳東、相内敏弘、板部洋之、高木孝士、矢持淑子、本田浩一、本田一穂
2. 発表標題 プロテオーム解析を用いた糸球体腎炎の近位尿細管障害の検討
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akiyama M, Shimomura K, Yoshimoto H, Sakou M, Kodama M, Abe M, Sano M, Kang D, Takaki T, Wada Y, Iyoda M, Honda K
2. 発表標題 IgA nephropathy complicated with Crohn's disease; a clinical and pathological study of kidney biopsied cases
3. 学会等名 American Society of Nephrology(ASN) Kidney Week 2020 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 康 徳東
2. 発表標題 プロテオミクス解析を用いたラットHeymann腎炎モデルにおける尿中蛋白の解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 康 徳東
2. 発表標題 レーザー・マイクロダイセクションと質量分析法を用いた糸球体腎炎の近位尿細管のプロテオミクス解析法の確立
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 康 徳東
2. 発表標題 LMD-LC-MS/MSを用いたFibrillary球体腎炎の原因蛋白の検討
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 康徳東
2. 発表標題 質量分析法を用いて腎沈着症の診断の検討
3. 学会等名 中国上海華山病院腎臓超微病理研究会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 康徳東
2. 発表標題 腎生検の電顕診断
3. 学会等名 中国西安交通大学腎病理研究会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 康徳東
2. 発表標題 低真空走査電子顕微鏡を用いたヒト腎疾患および動物モデルにおける腎系球体基底膜傷害の検討
3. 学会等名 第35回医学生物学電子顕微鏡技術学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	本田 一穂 (Hongda Kazuho) (10256505)	昭和大学・医学部・教授 (32622)	
研究分担者	高木 孝士 (Takaki Takashi) (10774820)	昭和大学・大学共同利用機関等の部局等・准教授 (32622)	
研究分担者	澤 智華 (Sawa Chika) (80422541)	昭和大学・医学部・講師 (32622)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 American Society of Nephrology, Kidney Week 2019 in Washington, DC.	開催年 2019年～2020年
---	--------------------

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------