

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08694

研究課題名(和文)膜性腎症の病因・病態に關与する新規自己抗原の同定と臨床応用に向けた発展的研究

研究課題名(英文)The study to identify novel pathogenesis and autoantigens in patients with membranous nephropathy

研究代表者

小松田 敦 (Komatsuda, Atsushi)

秋田大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：70272044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：原發性膜性腎症(pMN)と薬物誘發性二次性(sMN)の糸球体蛋白質の相違をレーザーマイクロダイセクションで糸球体を摘出し、比較プロテオミクス分析で検討した。抗PLA2R抗体(+)pMNの6人、PLA2R Ab(-)pMNの6人、ブシラミン(BCL)誘發sMNの6人、5人の対照症例。pMNおよびsMNグループの中で、免疫グロブリン、補体、補体調節蛋白質、足細胞關連蛋白質、糸球体基底膜蛋白質、および既知の蛋白質などpMNグループとBCL誘發sMNグループの間で、既知の疾患關連タンパク質や潜在的な疾患マーカー蛋白質などの蛋白質レベルの異なる分布が明らかになった。疾患による病因の相違と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特發性MN症例での抗PLA2R抗体の陽性率は、諸外国では約70-80%と高頻度であるが、本邦症例では我々の検討も含め約35-50%と低頻度である。従って、本邦の特發性MN症例では未知の抗原・抗体系の關与が推定される。本研究の目的は、本邦の特發性MNの病因・病態に關与する糸球体内細胞内の蛋白質分布が異なる事を明らかにすることである。これらの相違を利用して、特發性MN症例と二次性MN症例の新たな鑑別診断法を確立できれば、MN症例の診療に寄与できる。また、新たな治療法の開発に繋げることもでき、關連分野への波及効果は大きい。

研究成果の概要(英文)：We characterized glomerular proteins in primary membranous nephropathy (pMN) and drug-induced secondary (sMN) by laser microdissection and comparative proteomic analysis. We used renal biopsy specimens from 6 patients with anti-PLA2R Ab (+) pMN, 6 patients with PLA2R Ab (-) pMN, 6 patients with bucillamine (BCL)-induced sMN, and 5 control cases (time 0 transplant biopsies). Proteins were extracted from laser-microdissected glomeruli and analyzed using mass spectrometry. The quantification values of protein abundance in each MN group were compared with those in the control group. More than 800 proteins with high confidence were identified. Principal component analysis revealed a different distribution between the pMN and sMN groups. Between the pMN and BCL-induced sMN groups, we observed common and different alterations in protein levels such as known disease-associated proteins and potential disease marker proteins.

研究分野：腎臓内科

キーワード：膜性腎症 PLA2R陽性 PLA2R陰性 Bucillamine腎症 質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性 MN 症例での抗 PLA2R 抗体の陽性率は、諸外国では約 70-80%と高頻度であるが、本邦症例では我々の検討も含め約 35-50%と低頻度である。従って、本邦の特発性 MN 症例では未知の抗原・抗体系の関与が推定される。本研究の目的は、本邦の特発性 MN の病因・病態に關与する新規自己免疫異常を明らかにすることである。更に、自己抗体測定系を確立し、その臨床的意義についての検討も行う。新たな血清診断法を確立できれば、特に腎生検が困難な高齢者 MN 症例の診療に寄与できる。また、新たな治療法の開発に繋げることもでき、関連分野への波及効果は大きい。

2. 研究の目的

膜性腎症 (MN) は、腎糸球体基底膜に免疫複合体が沈着し、蛋白尿が惹起される自己免疫疾患である。諸外国の特発性 MN 症例では、M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) に対する自己抗体が約 70-80%に検出される。一方、本邦の特発性 MN 症例では、抗 PLA2R 抗体の陽性率は約 35-50%である。本邦症例での抗 PLA2R 抗体の低陽性率は、我々の検討でも確認しており、本邦症例での重要な特徴と考えられる。本研究では、本邦の特発性 MN 症例に多い新規自己抗原を腎生検標本の糸球体から抽出した試料を用い、質量分析法で他疾患と比較し同定する。また薬剤性 MN の代表的疾患、プシラミン誘発 MN についても、同様に検討する。

3. 研究の方法

(1) この研究の解析対象は、PLA2R (+) pMN の 6 人の患者、PLA2R (-) pMN の 6 人の患者、BCL 誘発 sMN の 6 人の患者、および 5 人の健康な移植ドナー (時間 0 の移植生検) とした。すべての患者と健康なドナーは日本人。

(2) 患者と移植ドナーの臨床データは、腎生検時の年齢、性別、尿タンパク質、血清アルブミン、クレアチニン (Cr) の医療記録から収集した。BCL 誘発性 sMN の患者については、BCL 療法中および BCL 中止後の尿中タンパク質値も収集した。NS は、尿中タンパク質 ≥ 3.5 g/日または g/gCr および低アルブミン血症 (血清アルブミン ≤ 3.0 g/dl) として定義した。推定糸球体濾過率 (eGFR) は、日本人患者の式を使用して計算した (Matsuo et al. 2009)。循環 PLA2R Abs は、前述のように (Kaga et al. 2019) 酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) 社内 ELISA、および標準化された市販の ELISA (Euroimmun、リューベック、ドイツ) を使用して pMN 患者で測定した。

(3) 腎生検標本は、光学、免疫蛍光、および電子顕微鏡の標準的な技術を使用して処理した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を、ヘマトキシリンおよびエオシン、過ヨウ素酸シッフ、マッソントリクローム、および過ヨウ素酸メテナミン銀で染色した。免疫蛍光顕微鏡用のクライオスタット切片を、ヒト IgG、IgA、IgM、C3、および C1q に対するフルオレセインイソチオシアネート結合ウサギポリクローナル抗体で染色した。IgG サブクラスも、既報と同様に検討した (Komatsuda et al. 2008)。

(4) 厚さ 8 μ m のホルマリン固定パラフィン包埋腎生検切片を PEM-メンブレンスライド (MicroDissect GmbH、ドイツ、ヘルボルン) にマウントした。ライカ LMD7000 レーザーマイクロダイセクションシステム (ライカマイクロシステムズ、東京、日本) を使用して、糸球体をマイクロダイセクションし、1 症例あたり約 1,000,000~4,000,000 μ m² を採取した。採取された糸球体は、0.5ml に 0.002%ヘキサデシルジメチル (3-スルホプロピル) アンモニウムヒドロキシド内部塩 (東京メディカルインダストリー、東京、日本) を含む約 100~200 μ l の TE バッファー (プロメガコーポレーション、マディソン、ウィスコンシン州、米国) で処理した。糸球体タンパク質は、超音波処理によってマイクロ遠心チューブで抽出した。ナノ液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (nLC-MS / MS) は、既報と同様に行った (Miyakawa et al. 2020)。抽出した糸球体タンパク質はトリプシンで消化し、トリプシン消化物 (0.01 μ g) を Easy-nLC 1200 (Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州ウォルズマン、米国) で、C18 分析カラム (NTCC-360 / 75-3-155、日京テクノス、東京、日本) を使用して分離した。次に、分離したペプチドを、Easy-nLC 1200 (Thermo Fisher Scientific) と組み合わせた Q-Exactive HF-X 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) で分析した。

(5) データ分析は、既報と同様に行った (Miyakawa et al. 2020)。nLC-MS / MS 実験で得られたデータは、Proteome Discover 2.4 (Thermo Fisher Scientific) および Mascot Server 2.7 (Matrix Science; <http://www.matrixscience.com/server.html>) を使用して分析した。米国国立バイオテクノロジー情報センターのデータベース (NCBI nr) は、タンパク質を同定するための事前定義されたデータベースである。各グループのサンプルのデータの再現性は、主成分分析によって確認された (Gastinel 2012)。タンパク質量の相対的定量化中に得られた倍率変化値を、各 MN グループとコントロールグループ間で比較した (PLA2R (+) / コントロール、PLA2R (-) / コントロール、および BCL / コントロール比として表される)。画分の分母がゼロまたはほぼゼロの場合、相対的なタンパク質存在比は 100 と定義した。画分の分子がゼロまたはほぼゼロの場合

合、相対的なタンパク質存在比は 0.01 と定義した。

4. 研究成果

(1) MN 患者と移植ドナーの臨床病理学的特徴を示す。PLA2R (+) pMN、PLA2R (-) pMN、または BCL 誘発 sMN の患者の年齢の中央値、および健康な移植ドナーは 63、78、45、および 53 歳であった。BCL によって誘発された sMN の患者は女性が優位であった。pMN グループでは、12 人の患者のうち 10 人が NS を発症していた。BCL 誘発 sMN グループでは、6 人の患者のうち 2 人が BCL 療法中に NS を発症し、タンパク尿は BCL 中止後に改善した。腎機能はすべてのグループで維持されていた。糸球体 IgG 沈着はすべての MN 患者で観察された。IgG4 の優位性は pMN グループで観察されたが、BCL によって誘発された sMN グループでは、IgG4 の沈着に加えて IgG1 の沈着が特徴的であった。IgA、IgM、および C1q の同時沈着は、pMN グループよりも BCL 誘発 sMN グループでより多く認められたが、C3 沈着はほとんどの MN 患者で認められた。MN ステージは、すべてのグループの患者間で様々であった。

(2) レーザー顕微鏡で糸球体から抽出された糸球体タンパク質のプロテオミクス分析では、主成分分析により、pMN グループと sMN グループの間で異なる分布パターンが明らかになった。信頼性の高い 846 個のタンパク質 (実験的 $Q < 0.01$) を特定することができ、さらに 3 つ以上のペプチドと一致する 441 個のタンパク質を選択した。

(3) Ig は、Ig 1、Ig 2、Ig 4、Ig μ 重鎖、および Ig μ および Ig 軽鎖が検出された。Ig 4、Ig μ 重鎖、および Ig 軽鎖のレベルの上昇がすべての MN グループで見られた。Ig 1 および Ig 2 重鎖、および Ig 軽鎖のレベルもすべての MN グループで増加した (> 1.8)。

(4) 補体および補体調節タンパク質は、補体 C3、C4A、C4A3、および C9 が検出された。これらの補体タンパク質は、すべての MN グループで増加していた。補体因子 H 関連タンパク質 (CFHR1 および CFHR5)、クラステリン、補体受容体 1、C4b 結合タンパク質 鎖、およびビトロネクチンも検出された。それらの中で、CFHR5 はすべての MN グループで多かったが、CFHR1 は BCL によって誘発された sMN グループで多かった。

(5) トロンボスポンジン 1 型ドメイン含有 7A、ネフリン、ポドシン、閉鎖帯-1 を含む、検出された有足細胞関連タンパク質 (De Vriese et al. 2017; Pozdzik et al. 2018; Blaine and Dylewski 2020; Kopp et al. 2020)、F-アクチンキャッピングタンパク質 2 (CapZ) (van Duijin et al. 2010)、シナプトポディン、 α -アクチニン-4、ミオシン-9、ポドカリキシン (Zhang et al. 2019)、インテグリン $\alpha 3$ 、ネスチン (Zou et al. 2006; Su et al. 2007) およびビメンチン (Zou et al. 2006) を表 4 に示す。PLA2RAb (+) pMN グループでは、CapZ、ネスチン、およびビメンチンが豊富でした。レベルのネスチンが BCL 誘発 sMN グループで観察された。

(6) IV 型コラーゲン 鎖、ラミニン鎖、ニドゲン-1、アグリリン、およびヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) パーレカンを含む、検出された GBM タンパク質 (Naylor et al. 2021) を表 5 に示す。すべての MN グループで IV 型コラーゲン 1 鎖のレベルが低く観察された。他のタンパク質のレベルはほとんど変化していなかった。

(7) VII 型コラーゲン 1 鎖 (Onetti Muda et al. 2001)、XVIII 型コラーゲン 1 鎖 (Kinnunen et al. 2011)、カルモジュリン (Izadi et al. 2018)、ポリユビキチン (Meyer-Schwesinger et al. 2011) を含む他の糸球体タンパク質、および F-box のみのタンパク質 50 (以前は非特異的細胞毒性細胞受容体タンパク質 1 として知られていたが、現在は FBX050 ユビキチンリガーゼとして知られている) (Kallio et al. 2011) を表 6 に示す。XVIII コラーゲン 1 鎖、カルモジュリン、ポリユビキチン、および FBX050 ユビキチンリガーゼはすべての MN グループで増加していた。VII コラーゲン 1 鎖のレベルは、BCL 誘発 sMN グループで増加していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加賀一、小松田敦、涌井秀樹、堂前直
2. 発表標題 Characterization of Glomerular Proteins in Primary and Bucillamine-induced Membranous Nephropathy
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2021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	堂前 直 (Dohmae Naoshi) (00321787)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・副部門長 (82401)	
研究分担者	涌井 秀樹 (Wakui Hideki) (70240463)	秋田大学・理工学研究科・教授 (11401)	

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0件

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
---------	---------