

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08619

研究課題名(和文)系球体腎炎の原因抗原の同定と腎沈着症の沈着物の沈着機序の解明

研究課題名(英文)The identification of the antigen and deposition proteins in glomerulonephritis and glomerular deposition diseases

研究代表者

清水 章 (Shimizu, Akira)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：00256942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、免疫複合体型系球体腎炎の抗原の同定や腎沈着症の沈着物の解析を目的に、腎生検検体を用いて、標的組織をレーザーマイクロダイセクションで切り出し、高感度の液体グロマトグラフィ/タンデム質量分析法(LC-MS/MS法)で微量蛋白質を網羅的に解析した。一次性および二次性膜性腎症や免疫複合体型系球体腎炎の既知の抗原蛋白質の同定を進めた。また、系球体沈着症の沈着蛋白質の解析を行い、Fibrillary腎炎のDNAJB9、Cryofibrinogen腎症のfibrinogen、単クローン性免疫グロブリンの同定、補体経路の活性化の証明を行い症例報告として報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腎生検病理検体から、液体グロマトグラフィ/タンデム質量分析法(LC-MS/MS法)を用いた微量蛋白質解析を行い、免疫複合体型系球体疾患の既存の抗原蛋白質の同定が可能であることを確認した。また、系球体沈着症に関連した蛋白質の同定を行い、疾患関連蛋白質が明らかな疾患の腎生検検体からの解析を進め、確定診断に至った症例を報告した。腎生検病理検体を用いたLC-MS/MS法の解析は、腎疾患の発症・進展機序の解析や確定診断に貢献することを示し、疾患関連蛋白質の解析の継続する意義を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To identify the antigens in several immune complex type glomerulonephritis and to analyze deposited proteins in several glomerular deposition diseases, we performed laser microdissection-liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)-based proteomic analysis using formalin-fixed paraffin embedded renal biopsy kidney tissues. We progressed to identify several antigens in primary and secondary membranous nephropathy and immune complex type glomerulonephritis. We also analyzed several deposited proteins in glomerular diseases to identify DNAJB9 in Fibrillary GN, fibrinogen in Cryofibrinogen glomerulopathy, monoclonal immunoglobulin in monoclonal immunoglobulin deposition diseases, and complement activated proteins demonstrated activation of the complement pathway, and these cases were reported as case report in several journals.

研究分野：病理学(腎臓病理学)

キーワード：質量分析 LC-MS/MS法 プロテオミクス 腎生検 レーザーマイクロダイセクション 系球体沈着症 免疫複合体型系球体腎炎 腎病理診断

1. 研究開始当初の背景

近年、高感度の液体クロマトグラフィ/タンデム質量分析法(LC-MS/MS法)を用いた微量蛋白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可能になってきた。免疫複合体型糸球体疾患では、抗原に対して特異抗体が形成され、抗原・抗体複合物の形成から発症する。しかし、原因抗原が明らかな免疫複合体型糸球体疾患は非常に限られており、多くの疾患の原因抗原は同定されていない。免疫複合体型糸球体疾患の原因抗原が明らかになることで、糸球体疾患の理解が進むことが期待される。また、糸球体沈着症や尿細管間質沈着症の腎沈着症には単クローン性異常免疫グロブリンなどの原因蛋白質や疾患関連蛋白質が存在している。それらの腎沈着症の原因もしくは関連蛋白質を同定することで、確定診断に直接関連することが期待され、疾患の理解が進み、特異な沈着物の性質が明らかになる。

2. 研究の目的

(1) 免疫複合体型糸球体疾患の腎生検病理検体から糸球体などの標的組織をマイクロダイセクションで単離し、LC-MS/MS法により微量蛋白質群を解析し、免疫複合体型糸球体疾患の原因抗原を同定する。その原因抗原蛋白質の全身や腎での局在や発現の変化を解析し、原因抗原蛋白質の機能と特異抗体の産生機序を明らかにする。免疫複合体型糸球体疾患の原因抗原蛋白質を明らかにし、免疫複合体型糸球体疾患の理解を深める。

(2) 糸球体沈着症や腎沈着症の沈着物の組成の特徴を明らかにする。それらの腎沈着症の原因もしくは関連蛋白質を同定し、確定診断をつけ、疾患の理解を深め、特異な沈着物の沈着機序や、沈着物の特異な構造の形成機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 免疫複合体型糸球体疾患の腎生検病理検体から糸球体をマイクロダイセクションで単離し、LC-MS/MS法により得られた網羅的微量蛋白質群を解析し、既存の抗原蛋白質を同定する。抗原蛋白質が存在する場合には、免疫染色により同定蛋白質が抗原抗体複合物形成しているかを確認する。抗原蛋白質による臨床病理的な特徴を検討する。膜性腎症であれば、PLA2R、THSD7Aをはじめとする既存の抗原蛋白質について、Lupus腎炎や自己免疫疾患であれば、Exostosin 1/2など、すでに報告されている抗原蛋白質を確認するとともに、既存の抗原蛋白質が確認できない症例の場合には、症例の蓄積を行い、新規抗原を検討する。

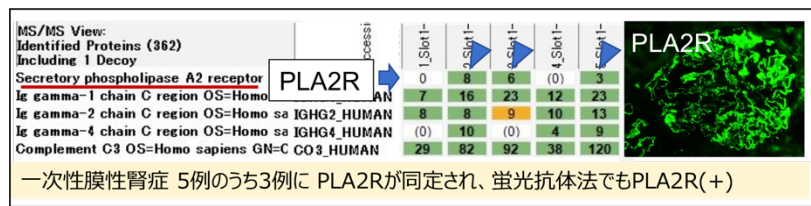
(2) 糸球体沈着症や腎沈着症の沈着物の構成蛋白質を、腎生検病理検体から糸球体もしくは沈着組織をマイクロダイセクションで単離し、LC-MS/MS法により微量蛋白質群を解析し同定する。沈着物もしくは疾患関連蛋白質が同定された場合には、免疫染色により同定蛋白質の存在部位を確認し、沈着物との関連や疾患との関連を明らかにし、確定診断を進める。また、それらの腎沈着症の原因もしくは関連蛋白質から、疾患の特徴や特異な沈着物の沈着機序、沈着物の特異な構造の形成機序を検討する。

4. 研究成果

(1) 免疫複合体型糸球体疾患の腎生検病理検体から糸球体をマイクロダイセクションで単離し、LC-MS/MS法により得られた網羅的微量蛋白質群を解析し、既存の抗原蛋白質の同定を進めた。既知の抗原蛋白質が報告されている、一次性および二次性膜性腎症症例を対象に、腎生検検体を用いLC-MS/MS法で解析を行い、M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R)に加え、thrombospondin type-1 domain-containing 7A (THSD7A), nerve epidermal growth factor-like 1 (NELL-1), Exostosin 1/Exostosin 2 (EXT1/EXT2), semaphorin 3B (Sema3B), protocadherin 7 (PCDH7), Neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1), Serine Protease HTRA1 (HTRA1), type III transforming growth factor-beta receptor (TGFB3)などの既知の

抗原について検討を進め、免疫染色を用いて LC-MS/MS 解析結果の検証を行った。

① 一次性膜性腎症の腎生検検体からレーザーマイクロダイセクションで糸球体を単離し、LC-MS/MS 法により PLA2R を同定し、これらの症例は蛍光抗体法においても陽性になることを確認した。



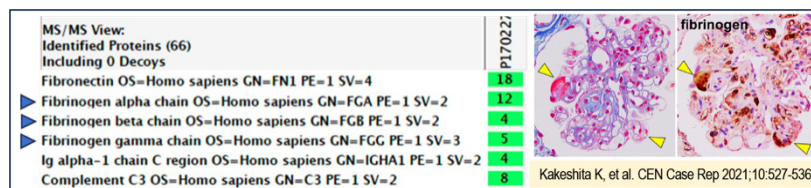
② 膜性ループス腎炎 (Class V) の症例で Exostosin 1/2 (EXT1/EXT2) が同定された。この症例では傾向抗体法所見と同様に IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 の全ての IgG subclass が存在することが LC-MSMS の結果からも確認された。現在、EXT1/EXT2 の免疫染色を進めている。

Protein	Accession Number	Alternate ID	MW	Charge
Exostosin-2 OS=Homo sapiens GN=EXT2 PE=1 SV=1	EXT2_HUMAN	EXT2	82 kDa	29
Exostosin-1 OS=Homo sapiens GN=EXT1 PE=1 SV=2	EXT1_HUMAN	EXT1	86 kDa	27
Ig gamma-3 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG3 PE=1 SV=2	IGHG3_HUMAN	IGHG3	41 kDa	40
Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	IGHG1_HUMAN	IGHG1	36 kDa	38
Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2	IGHG2_HUMAN	IGHG2	36 kDa	33
Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1	IGHG4_HUMAN	IGHG4	36 kDa	20
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	K2C1_HUMAN	KRT1	66 kDa	224

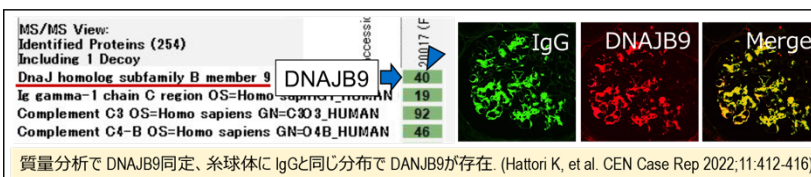
③ 他の一次性および二次性膜性腎症症例に、LC-MS/MS 法で既知の抗原蛋白質の存在を認めており、免疫染色での同定を行い報告を進めている。また、既知の抗原蛋白質の頻度、免疫染色との感度・特異度の関係について検討を進めている。

(2) 糸球体沈着症の沈着物の構成蛋白質を LC-MS/MS 法により同定し、確定診断に貢献した。

① Cryofibrinogen 腎症: 胃癌症例で、40-50nm の microtubular 構造を呈する係蹄内皮下沈着物を有する症例に対し、LC-MS/MS 法の解析が cryofibrinogen 腎症の確定診断に貢献した。この症例を症例報告として報告した。



② Fibrillary 腎炎: 病理学的に糸球体腎炎所見を呈し、糸球体への IgG, C3, C1q, C4 の沈着を認め、メサングウム領域、係蹄内皮下や上皮下の deposit に 20nm の microfibril 構造を認める症例に対し、LC-MS/MS 法の解析により DNAJB9 を同定し、免疫染色でその存在を証明し、fibrillary 腎炎の確定診断に貢献した。この症例を症例報告として報告した。



③ LC-MS/MS 法解析により確定診断に貢献した症例として、クリオグロブリン血症性腎症、AHL アミロイドーシス、軽鎖沈着症、Proliferative glomerulonephritis with monoclonal immunoglobulin deposits、奇異な横紋様線維性構造の高電子密度物質沈着による膜性増殖性糸球体腎炎などの症例の解析を行った。これらの症例の報告を進めている

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nomura K, Miyatake N, Okada K, Hayashi N, Fujimoto K, Adachi H, Furuichi K, Shimizu A, Yokoyama H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Steroid-sensitive recurrent mesangial proliferative glomerulonephritis with monoclonal IgG deposits.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CEN Case Rep.	6. 最初と最後の頁 308-313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13730-020-00562-x.	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 Kakeshita K, Yamazaki H, Imamura T, Ando T, Kobayashi S, Fujioka H, Koike T, Shimizu A, Kinugawa K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cryofibrinogen-associated glomerulonephritis accompanied by advanced gastric cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CEN Case Rep.	6. 最初と最後の頁 527-536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13730-021-00602-0.	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 Sawada A, Okumi M, Horita S, Tamura T, Taneda S, Ishida H, Hattori M, Tanabe K, Nitta K, Honda K, Koike J, Nagashima Y, Shimizu A.	4. 巻 71
2. 論文標題 Monoclonal and polyclonal immunoglobulin G deposits on tubular basement membranes of native and pretransplant kidneys: A retrospective study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathol Int.	6. 最初と最後の頁 406-414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13092.	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 Adachi Misa, Kitamura Mineaki, Muta Kumiko, Maekawa Akihiro, Uramatsu Tadashi, Tadokoro Masato, Funakoshi Satoshi, Hisano Satoshi, Kuwahara Naomi, Shimizu Akira, Mukae Hiroshi, Nishino Tomoya	4. 巻 21
2. 論文標題 IgM monoclonal gammopathy with heavy-and-light-chain amyloidosis resembling fibrillary glomerulonephritis determined by tandem mass spectrometry: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Nephrology	6. 最初と最後の頁 195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12882-020-01851-4	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 Higashihara Takaaki, Okada Akira, Nakamura Yasuna, Saigusa Hanako, Homma Shiko, Matsumura Mimiko, Kusano Taiko, Shimizu Akira, Takano Hideki	4. 巻 59
2. 論文標題 Proliferative Glomerulonephritis with Monoclonal Immunoglobulin Deposits without Conspicuous Mesangial Proliferation, Complicated with Squamous Cell Lung Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 557 ~ 562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2993-19	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 Tsushima Takafumi, Suzuki Tomo, Terao Toshiki, Miura Daisuke, Narita Kentaro, Takeuchi Masami, Shimizu Akira, Matsue Kosei	4. 巻 22
2. 論文標題 Light chain deposition disease involving kidney and liver in a patient with IgD myeloma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Nephrology	6. 最初と最後の頁 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12882-021-02246-9	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 Hattori Keita, Shimizu Ryo, Tanaka Shoichiro, Terashima Takashi, Hiramatsu Miya, Shimomura Taishi, Ito Takeshi, Morinaga Takatoshi, Terasaki Mika, Shimizu Akira, Morozumi Kunio, Tamai Hirofumi	4. 巻 11
2. 論文標題 A case of juvenile-onset fibrillary glomerulonephritis diagnosed by mass spectrometry and immunohistochemistry of DNAJB9	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 412 ~ 416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-022-00693-3	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 Muto Reiko, Maeda Kayaho, Fukui Sosuke, Saito Shoji, Kato Noritoshi, Kosugi Tomoki, Shimizu Akira, Maruyama Shoichi	4. 巻 -
2. 論文標題 IgA-dominant glomerulonephritis with DNAJB9-negative fibrillar polytypic immunoglobulin deposits in the subepithelium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-022-00759-2	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 Mii Akiko, Terasaki Mika, Kunugi Shinobu, Seki Miyako, Kashiwagi Tetsuya, Sakai Yukinao, Shimizu Akira	4. 巻 11
2. 論文標題 A case of proliferative glomerulonephritis with monoclonal IgG3 deposits accompanied by glomerular capillary microaneurysms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 333 ~ 338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-021-00676-w	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 Arai Momoko, Mii Akiko, Hirama Akio, Kaneko Tomohiro, Kashiwagi Tetsuya, Shimizu Akira, Sakai Yukinao	4. 巻 12
2. 論文標題 A possible role of classical complement pathway activation in the pathogenesis of immunoglobulin G nephropathy: a case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 14 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-022-00710-5	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 清水章	4. 巻 39
2. 論文標題 腎生検病理診断：病型診断から病因診断へ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 病理と臨床	6. 最初と最後の頁 934-937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔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 清水章
2. 発表標題 腎生検病理診断コンサルテーション・アンド・レビュー ・ 腎生検病理診断への質量分析の応用
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
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	石井 永一 (Ishii Eiichi) (00193243)	日本医科大学・大学院医学研究科・研究生 (32666)	
研究 分担者	桑原 尚美 (Kawahara Naomi) (00599011)	日本医科大学・医学部・テクニカルスタッフ (32666)	

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