

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08623

研究課題名(和文) 前向き研究に向けたIgA腎症の組織学的重症度分類の解析プラットフォームの構築

研究課題名(英文) Development of an analytical platform for histological severity classification of IgA nephropathy for prospective studies.

研究代表者

齊藤 成 (Saitoh, Sei)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：10456444

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)：レーザーマイクロダイセクション法を用いた糸球体プロテオーム解析により2450個のタンパク質が定量化された。IgAN患者において対照群と比較して主に有意な上位25のタンパク質は、補体系と細胞外マトリックスタンパク質のグループであった。IgAN患者では、対照群と比較して、補体系の代替成分経路および古典成分経路の成分、ならびにH因子およびH関連タンパク質などの制御因子の存在量が有意に高かった。保守療法のIgAN患者と比較して、免疫抑制療法の患者は補体因子H関連蛋白1(CFHR1)の存在量が多かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgAN研究では、ゲノムワイド関連研究(GWAS)により、疾患感受性遺伝子が同定され注目されている。アレル(A)を伴うCFHR1とCFHR3遺伝子の欠損では、補体副経路の活性抑制を促進し、IgA腎症と加齢黄斑変性症発症を抑制する。現在までに、IgAN患者の糸球体の網羅的なプロテオミクスを用いた報告した4つほどの論文がある。今回の研究では、臨床的変数から予後を予測できない患者において、補体タンパク質の糸球体存在量がIgANの活動性と関連するかどうか患者検体を用いて検討した。その結果、補体蛋白の糸球体蓄積量のCFHR1の多さは、IgANの活動性を予測するバイオマーカー候補であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Glomerular proteomic analysis with laser microdissection quantified 2450 proteins. The top 25 proteins that are mainly significant in patients with IgAN compared to that of controls were the complement system and a group of extracellular matrix proteins. Compared to controls, patients with IgAN had significantly higher abundance of components of the alternative and classical component pathway and regulatory factors, such as factors H and H-related proteins of the complement system. Compared to patients with IgAN for conservative therapy, those for immunosuppressive therapy had abundance for complement factor H-related protein 1 (CFHR1).

研究分野：分子組織学

キーワード：IgA腎症 糸球体プロテオミクス レーザーマイクロダイセクション

## 1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症 (IgAN: IgA nephropathy)は、世界でも最も一般的な糸球体腎炎であるため、疾患の進行を予測する有効な方法が検討されている (*Barbour SJ et al. JAMA Intern Med.2019*)。20年の経過で約40%が末期腎不全に陥る。IgAN は単一遺伝子の異常を原因とせず、多因子の感受性遺伝子に加え、上気道感染などの外来抗原の暴露を機に急性増悪することが知られている。IgAN の糸球体の糸球体血管の微細構造の破壊される。それらの病態は微細構造変化を電子顕微鏡レベルで正確に捉えられてきた。IgAN の病因仮説として、Multi-hit mechanism が提唱されている(*Suzuki H. et al. JASN 2011, Novak J.etal. Kidney disease 2015*)。IgAN の疾患特性として、“糖鎖異常 IgA1(Gd-IgA1)”とそれに反応する自己抗体の形成が報告されている。ただし、Gd-IgA1 単独で腎炎は生じないため、IgAN 患者の腎炎惹起には Multi-hit が必要である。Multi-hit mechanism の Hit3から Hit4への段階で「糸球体沈着物性の糖鎖異常 IgA1免疫複合体(Gd-IgA1-IC)は、糸球体メサンギウム細胞を活性化し、基底膜を破壊する活動性の高い形態変化を引き起こす」と考えられている。最終段階の Hit4へと進むと、糸球体の廃絶により、間質線維化・尿細管萎縮(IFTA: interstitial fibrosis/tubular atrophy)へと進むため、慢性腎臓病(CKD: chronic kidney disease)へと悪化する。研究課題の核心をなす学術的「問い」は、『糸球体沈着物性の糖鎖異常 IgA1免疫複合体(Gd-IgA1-IC)は、糸球体メサンギウム細胞を活性化し、基底膜を破壊する活動性の高い形態変化を引き起こす時に、変性する糸球体が腎臓組織全体に対しどのような影響を及ぼすのであろうか?』である。IgAN の糸球体変性が間質線維化・尿細管萎縮と関連し、慢性腎臓病への悪化とどのように関連しているのか? 電顕解析から得られた構造的な所見を“分子”の言葉で置き換えるための新たな手法論の導入は不可欠であると考え。糸球体の電顕構造の多くの“分子”はその多くが同定されており、かつ、足細胞・メサンギウム細胞・血管内皮細胞に選択的に発現する蛋白のプロファイルデータベースの構築も非常に進んでいる(*Takemoto M et al. EMBO J 2006, Liu P et al. J Am Soc Nephrol.2017, Krochmal M et al.Sci Rep.2017*)。研究代表らが用いる、先端電子顕微鏡と最新の糖鎖プロテオーム解析に共通する特徴は「網羅性」と「定量性」であり、その解析スピードとデータ量の大きさから、AI(人工知能)による解析結果が社会のニュースで話題になることが多くなってきた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、前向き研究に適した「科学的エビデンスを集約させる IgA 腎症の組織学的重症度分類(H-Grade)の解析プラットフォーム構築」である。IgAN の病因仮説の Multi-hit mechanism に基づいて、病態進行と関連が深いと考えられる①Gd-IgA1+Gd-IgA1-IC と糸球体電顕評価+臨床パラメーター、②Gd-IgA1+Gd-IgA1-IC と 間質線維化・尿細管萎縮の電顕評価+臨床パラメーターに対応する、「個別症例ごとの組織因子のプロファイル」を作成する。(A)糸球体沈着性 Gd-IgA1-IC の定量解析、(B)糖鎖プロテオミクス解析、(C)3D 電顕解析、(D)数理モデルシミュレーション e-GFR の推定、4つの異なる解析情報より構成される。研究の学術的な独自性と創造性は、「個別症例ごとの組織因子のプロファイル」を構成する4つの異なる解析結果とその評価方法にある。藤田医科大学で後向き研究が施行された扁

桃切除＋ステロイドパルス療法の効果判定(Yamamoto et al. Clin Exp Nephrol 2013)のIgAN症例を用いて、「個別症例ごとの組織因子のプロファイル」を作成する。そのため、解析のため整理された臨床と組織学データと腎生検保存サンプルを活用することができる。解析プラットフォームをもとに、統計学的な検定により病態関連因子の推定が可能である。Oxford 分類(MEST の組織学的スコア)で区分されている糸球体の病理像とも照合できるため、臨床研究のためのデータと紐づけることも容易となっている。

### 3. 研究の方法

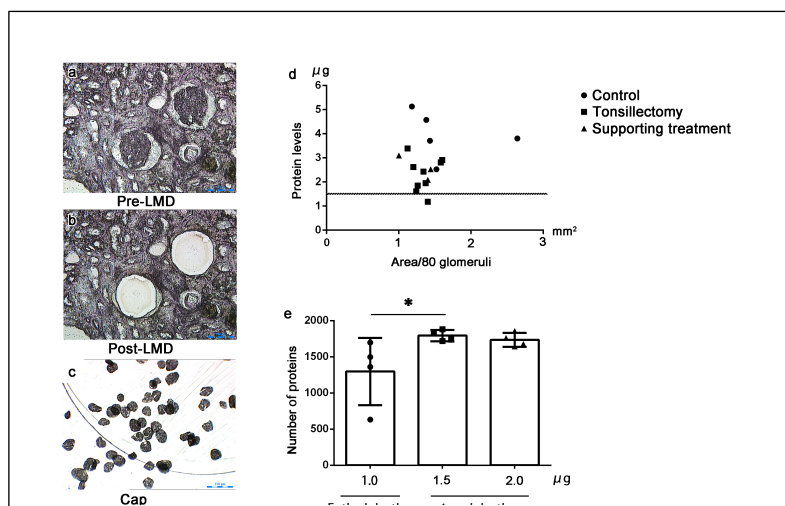
#### レーザーマイクロダイセクション法を用いた腎臓糸球体プロテオミクス解析

##### 目的:腎臓組織の網羅的プロテオミクス

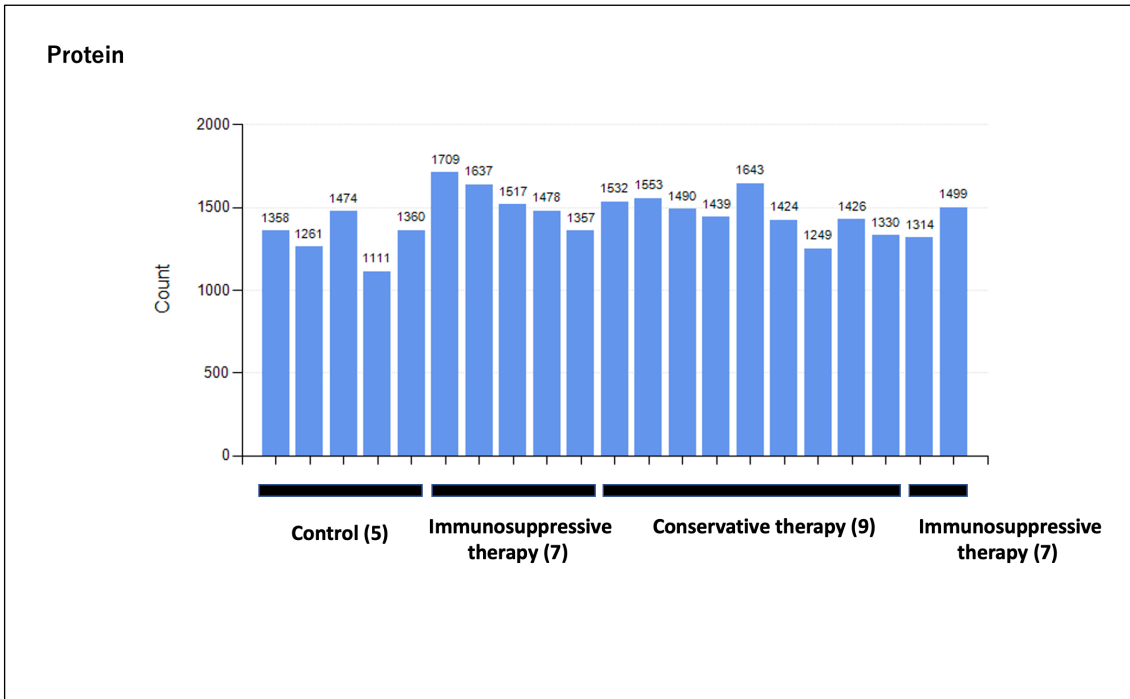
材料と方法: 正常腎組織(N=5)と IgAN 患者 (N=16; N=7 免疫抑制療法, N=9 対症療法)の臨床ヒト検体での糸球体と尿細管での網羅的プロテオミクス解析をレーザーマイクロダイセクション(LMD)-液体クロマトグラフィータンデム質量分析法(LC-MS/MS)を用いて行い、「各疾患ごとの網羅的プロテオミクスのプロファイル」の作製する。IgAN 特異的な病態変化を見るために、疾患コントロールを置く。前向き試験での各症例ごとの臨床経過と治療介入(対症療法:レニン・アンジオテンシン系阻害薬、免疫抑制療法:扁桃摘出術＋ステロイドパルス療法)前後の成績をまとめていく。Oxford 分類との関係は、免疫抑制療法では endocapillary hypercellularity (E) and/or crescents (C) lesion が含まれている。「個別症例ごとの組織因子のプロファイル」として、各症例ごとの臨床因子と発現タンパク質のリストを得る。IgA 腎症の診断には電子顕微鏡の病理診断を全例おこなっている。血清中の Gd-IgA1 の測定と IgA1-IC のプロテオミクスのデータとの比較をおこなった。

### 4. 研究成果

腎臓組織の網羅的プロテオミクスとして、レーザーマイクロダイセクション(LMD)-液体クロマトグラフィータンデム質量分析法(LC-MS/MS)を用いて、糸球体を含むホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPE)から IgAN 患者のタンパク質を特定する簡易な方法の開発を進めている。網羅的プロテオミクスは、糸球体 80 個から約 1,300 個、尿細管(糸球体 80 個に相当する面積)から約 1,800 個のタンパク質を同定できる。相間移動(PTS)バッファーでの加熱式抗原賦活化法と超音波処理後の SP3 法を組み合わせ、液中操作のみでのペプチドショットガン解析が可能になった(Hughes CS et al, Nat Protoc. 2019)。



レーザーマイクロダイセクション法により切り出した糸球体 80 個から PTS バッファーを用いてタンパク質を 1.5 µg 以上抽出し、プロテオミクス解析したもの。



ダイセクション法を用いた糸球体プロテオーム解析により総計 2450 個のタンパク質が定量化された。

**IgA (16) VS Control (5) Top25**

	UniProtKB accession	N unique peptides	Protein name	Fold change	P Value
1	Q03591	3	Complement factor H-related protein 1	9.818	4.21194E-16
2	P36980	2	Complement factor H-related protein 2	6.144	9.21485E-14
3	P02452	5	Collagen alpha-1(I) chain	5.43	8.81605E-12
4	Q9BXR6	15	Complement factor H-related protein 5	5.097	8.09428E-11
5	P01031	40	Complement C5	4.087	8.63122E-08
6	P07360	9	Complement component C8 gamma chain	4.024	1.31975E-07
7	P13671	15	Complement component C6	4.011	1.43465E-07
8	P10643	12	Complement component C7	3.79	6.65642E-07
9	P07358	16	Complement component C8 beta chain	3.648	1.81662E-06
10	P01876	12	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	3.506	4.97566E-06
11	Q15063	17	Periostin	3.445	7.63151E-06
12	P02748	23	Complement component C9	3.36	1.39042E-05
13	P0C0L5	5	Complement C4-B	3.176	5.10243E-05
14	P08519	8	Apolipoprotein(a)	3.071	0.00107518
15	P07357	11	Complement component C8 alpha chain	3.012	0.000155302
16	P23142	20	Fibulin-1	2.909	0.000313588
17	P08603	23	Complement factor H	2.802	0.00068145
18	Q02985	2	Complement factor H-related protein 3	2.768	0.000870899
19	P02751	81	Fibronectin	2.747	0.001006127
20	Q99715	28	Collagen alpha-1(XII) chain	2.572	0.003243795
21	P02649	20	Apolipoprotein E	2.551	0.00361507
22	P36269	6	Glutathione hydrolase 5 proenzyme	2.544	0.003779033
23	P04003	9	C4b-binding protein alpha chain	2.519	0.004477427
24	P24821	46	Tenascin	2.468	0.006219947
25	P21810	2	Biglycan	2.41	0.009145546

IgAN 患者と正常コントロールを比較した結果 Top25 を示す、補体系と細胞外マトリックスタンパク質が主に重要であることが示された。補体系では、補体系の成分が高く、補体制御因子も多かった。IgAN 患者では、対照群と比較して、補体系の代替成分経路および古典成分経路の成分、ならびに H 因子および H 関連タンパク質などの制御因子の存在量が有意に高かった。

UniProt accession	N unique peptides	Protein name	Immunosuppressive therapy VS Conservative therapy		Conservative therapy VS Control	
			Fold change	p value	Fold change	p value
<b>Complement system components</b>						
P02747	3	Complement C1q subcomponent subunit C	1.042	0.974245727	2.161	0.044698498
P00751	9	Complement factor B	0.94	0.956588036	0.829	0.420357819
P01024	99	Complement C3	1.116	0.854732486	2.143	0.049625162
P0C0L4	5	Complement C4-A	1.007	0.999133389	1.614	0.609545073
P0C0L5	5	Complement C4-B	1.09	0.930158378	2.826	0.00058054
P01031	40	Complement C5	0.971	0.972788804	4.102	7.12553E-08
P13671	17	Complement C6	0.942	0.945258778	4.192	3.89338E-08
P10643	12	Complement C7	0.977	0.980567098	3.802	5.82406E-07
P07357	11	Complement C8 alpha chain	0.914	0.887462946	3.181	4.80528E-05
P07358	16	Complement C8 beta chain	0.942	0.945258778	3.676	1.43217E-06
P07360	9	Complement C8 gamma chain	0.89	0.794698506	4.215	3.35768E-08
P02748	24	Complement C9	0.853	0.552984198	3.67	1.48396E-06
<b>Complement system regulators</b>						
P13987	2	CD59 glycoprotein	0.994	0.993180445	1.139	0.998015027
P10909	3	Clusterin	1.054	0.323704977	1.784	0.964861707
P08603	23	Complement factor H	1.139	0.771122061	2.603	0.002664116
Q03591	3	Complement factor H-related protein 1	1.46	0.006644571	9.222	4.31385E-16
P36980	2	Complement factor H-related protein 2	1.105	0.905751317	5.622	2.65287E-12
Q02985	2	Complement factor H-related protein 3	1.301	0.204485586	2.478	0.006137069
Q9BXR6	15	Complement factor H-related protein 5	1.33	0.082434812	4.901	3.03528E-10
P17927	10	Complement receptor type 1	0.984	0.982771898	0.642	0.030987226
P04003	9	C4b-binding protein alpha chain	1.279	0.180792479	2.335	0.015575338
P04004	13	Vitronectin	0.896	0.811300155	1.883	0.204215245
P05155	4	Plasma protease C1 inhibitor	1.158	0.762034857	0.791	0.295913579

IgA N 患者の補体系のタンパク質の比較した結果。免疫抑制療法の IgAN 患者では保存療法 IgAN 患者と比較して、Complement factor H-related protein 1 (CFHR1)の存在量が多かった。免疫抑制療法を受けた活動性の高い IgAN 患者の糸球体において、CFHR1 の存在量が多いことが示された。このことは、CFHR1 が IgAN の活動性を判定する新しいバイオマーカーとなる可能性があることを示唆している。今後は、CFHR1 が IgAN の進行とどのように関連するかを調べる必要がある。

今回の研究では、臨床的変数から予後を予測できない患者において、補体タンパク質の糸球体存在量が IgAN の活動性と関連するかどうか患者検体を用いて検討した。その結果、補体蛋白の糸球体蓄積量の CFHR1 の多さは、IgAN の活動性を予測するバイオマーカー候補であることがわかった。

血清中の Gd-IgA1 の測定結果は血清 IgA1 の測定量に比例していた。また、IgA1-IC のプロテオミクスの結果も、免疫抑制療法の IgAN 患者では保存療法 IgAN 患者と比較して、Complement factor H-related protein 1 (CFHR1)の存在量が多かった。

臨床因子との解析はまだ途中ではあるため、結論が出ていない。糸球体プロテオミクスと尿管間質プロテオミクスの比較解析の結果は現在進行中で、結論が出ていない。

電子顕微鏡解析は、数理モデルの解析に必要な画像の取得は3次元 SBF-SEM 画像と TEM 画像は済んでいる。血管から基底膜に流れるフローを算出する数理モデル計算式を導き出すための模式図を作成した。実際に血管から基底膜に流れるフローの算出は複雑なため、うまくデータを得ることができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	高橋 和男  (Takahashi Kazuo)  (90631391)	藤田医科大学・医学部・教授   (33916)	
研究分担者	片山 鑑  (Katayama Kan)  (90742247)	三重大学・医学部附属病院・准教授   (14101)	
研究分担者	熊本 海生航  (kumamoto kanako)  (10469322)	藤田医科大学・病態モデル先端医学研究センター・講師   (33916)	
研究分担者	鏡 裕行  (Kagami Hiroyuki)  (00347824)	名古屋市立大学大学院・看護学研究科・教授   (33916)	

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