

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670269

研究課題名(和文)新規蛋白尿惹起因子の同定と臨床検査診断法への応用

研究課題名(英文) Possible circulating permeability factors related to proteinuria in nephrotic syndrome

研究代表者

和田 隆志 (Wada, Takashi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40334784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓病において、蛋白尿は腎予後、生命予後と関連する。本研究の目的は、オミクス技術を用いてネフローゼ症候群における糸球体透過性因子の探索を行うことである。これまで、白血球除去療法(LCAP)が有効であったネフローゼ症候群の蛋白尿と相関性の高い因子をプロテオーム解析により抽出した。その結果、寛解時に比して発症時、再燃時において3倍以上発現した4因子が抽出された。このうち、1因子はLCAPで低下した。一方、寛解時に比較して発症時、再燃時において0.5倍以下に低下する9因子が抽出された。このうち、LCAPにより、4因子の相対的発現量が増加した。これらは蛋白尿に関連する糸球体透過性因子の可能性が有る。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to determine circulating permeability factors possibly related to proteinuria in patients with nephrotic syndrome. Permeability factors derived from circulating T and/or B cells are speculated to have a crucial role in the proteinuria of nephrotic syndrome. Circulating factors in patients with beneficial effects of reducing proteinuria by removing lymphocytes treated with lymphocytapheresis were examined using proteomic studies and bioinformatics analyses. There were several circulating factors related to the onset and relapse of nephrotic syndrome. In contrast, other circulating factors could be detected when patients achieved remission. These factors might be involved in the pathogenesis of proteinuria in patients with nephrotic syndrome.

研究分野：腎臓病

キーワード：蛋白尿 ネフローゼ症候群 オミクス プロテオーム 透過性因子 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

あらゆる腎臓病において、蛋白尿は腎機能低下、全死亡率ならびに心血管系死亡率と密接に関連する。腎臓病による透析患者はいまだに増加し、その克服は社会的課題になっている。そのため、蛋白尿の出現機序に関連する分子の同定、その診断・治療反応性・予後を反映するバイオマーカー確立は予後改善にむけた重要な課題である。しかし、目下のところ、国内外で蛋白尿を惹起する糸球体透過性因子は同定されていない。これまで、申請者らは白血球と蛋白尿の関連に着目し、ケモカイン制御による白血球を介した蛋白尿出現機構の解明、白血球除去療法(LCAP)によるネフローゼ症候群の蛋白尿減少効果を示してきた。

さらに、申請者は約1万例の腎生検標本、血液、尿検体を経時的に保管し、予後が追える世界有数のコホートを有すること、

プロテオミクスなどオミクス解析とバイオインフォマティクスによる高い技術とを有することなど新規分子の同定とその検証に利点となる背景を有する。

## 2. 研究の目的

本研究は、ネフローゼ症候群に代表される蛋白尿をきたす糸球体透過性因子をプロテオミクス技術による同定、ネフローゼ症候群の新規診断法の開発、治療効果判定・予後予測への応用を目指す。蛋白尿は腎臓病の最大の予後規定因子であり、その成因解明は重要である。その病因として糸球体透過性に影響を及ぼす白血球由来の透過性因子の存在が推測されているが、未だ同定されていない。そこで、白血球除去療法により蛋白尿が改善し、白血球由来の蛋白尿を惹起する糸球体透過性因子が示唆される症例に標的を絞ること、低分子を中心に蛋白解析を行うことを組み合わせることにより因子を同定する。同定後、測定系を樹

立し、金沢大学・日本腎臓学会・厚生労働省班研究のネフローゼ症候群コホートによる検証を倫理申請のうえ行う。本研究を通じて、腎生検によらないネフローゼ症候群の非侵襲的な診断、治療・予後を反映するバイオマーカーの確立と本邦での検証、その制御による新規治療法開発につなげることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ネフローゼ症候群例のうち、LCAPが有用であるなど蛋白尿を惹起する因子の存在が疑われる症例を解析標的とした。経時的な血清蛋白質の変化を飛行時間質量分析計(time-of-flight mass spectrometer; TOF-MS)を組み合わせた表面エンハンス型レーザー脱離イオン化法(surface-enhanced laser desorption/ionization; SELDI)(SELDI-TOF-MSシステム)で検討した。その中で、病勢、特に尿蛋白量や血清アルブミン濃度と相関性のよいペプチドを抽出した。これらの標的因子につき、精製ならびに同定を行った。候補蛋白について、腎臓病例のスクリーニングをかけ、陽性例では臨床病理学的な意義を検討し、バイオマーカーとしての臨床的な意義を検討した。さらに測定条件を最適化し、診断、治療判定ならびに予後評価を可能とする新規臨床検査診断法を確立することを最終的な目標とする。

## 4. 研究成果

本研究の目的は、オミクス技術を用いてネフローゼ症候群患者の血清中における糸球体透過性因子の探索を行うことである。これまで、LCAPを行ったネフローゼ症候群のうち、巣状分節性糸球体硬化症および微小変化型ネフローゼ症候群の蛋白尿の出現、病勢と相関性の高い因子をプロテオーム解析により抽出した。方法として、前処理し

た血清サンプルを iTRAQ 試薬でラベル化した後、精製・脱塩処理を通じて、LC-MS/MS 分析を行った。このうち、用いたチップで検出された血清中のペプチド発現と臨床的な蛋白尿の極期、寛解時の変化、LCAP との相関が強いものを選択した。その結果、発症時、再燃時に上昇し、LCAP で低下するもの、逆に蛋白尿と逆相関するペプチドもそれぞれ数個特定した。寛解時に比較して発症時および再燃時において3倍以上の発現が確認された因子として4つが抽出された。このうち、LCAP で低下するものとして、ひとつが抽出された。これらは、上記ネフローゼ症候群の原因となる糸球体透過性因子または蛋白尿の極期を診断するマーカー候補となる可能性がある。一方、寛解時に比較して発症時および再燃時において0.5倍以下に低下する9因子が抽出された。これらのうち、LCAP により、相対的発現量が増加する4種類が抽出された。これらについては、腎臓において抗蛋白尿効果を有する保護的因子としての可能性がある。これらの病態にはたす意義について解析をさらに進めている。

#### 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2件)

1) Revisiting inflammation in diabetic nephropathy: the role of the Nlrp3 inflammasome in glomerular resident cells. Sakai N, Wada T. *Kidney Int.* 2015 Jan;87(1):12-4. doi: 10.1038/ki.2014.322. (査読あり)

2) Pro-inflammatory/Th1 gene expression shift in high glucose stimulated mesangial cells and tubular epithelial cells.

Iwata Y, Furuichi K, Hashimoto S, Yokota K, Yasuda H, Sakai N, Kitajima S, Toyama T, Shinozaki Y, Sagara A, Matsushima K, Kaneko S, Wada T.

*Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Jan 17;443(3):969-74. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.072. Epub 2013 Dec 19. (査読あり)

[学会発表](計5件)

1) 第49回糖尿病学の進歩 2015年2月21日  
岡山コンベンションセンター(岡山)

シンポジウム 糖尿病性腎症の病態と病期  
分類 和田隆志

2) 第57回日本腎臓学会学術総会 2014年7月  
4日 パシフィコ横浜(横浜)

Asian Morning

Symposium Outcome and risk factors in patients with diabetic nephropathy  
Takashi Wada

3) 第63回日本医学検査学会 2014年5月17日  
朱鷺メッセ(新潟)

教育講演 I I 臨床検査の視点からみた腎臓と生体ネットワーク 和田隆志

4) 第43回日本腎臓学会西部学術大会 2013年10月11日  
松山全日空ホテル(松山) シンポジウム 糖尿病性腎症と高血圧: 病態と治療 和田隆志

5) 第28回日本糖尿病合併症学会 2013年9月13日  
旭川グランドホテル(旭川) シンポジウム 糖尿病性腎症における炎症の意義とその制御 和田隆志

[図書](計2件)

1) 和田隆志 腎疾患 急速進行性腎炎症候群(ANCA 関連腎炎を含む) 559-561, 今日の治療指針 2014, 監修山口徹、北原光夫 総合編集 福井次矢、高木誠、小室一成 医学書院, 2014

2) 和田隆志 11. 腎・尿路系の疾患  
11-12 中毒性腎障害, 1524-1526, 内科学  
第10版 矢崎義雄総編集 朝倉書店, 2013

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[www.lab-med.w3.kanazawa-u.ac.jp](http://www.lab-med.w3.kanazawa-u.ac.jp)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 隆志 (Wada Takashi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 40334784

### (2) 研究分担者