

平成30年6月20日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09270

研究課題名(和文)メタボロームとプロテオームの融合解析による糸球体硬化の病態解明と創薬化研究

研究課題名(英文) Integration of proteomics and metabolomics for drug discovery based on a search for the pathophysiology in glomerulosclerosis

研究代表者

楊 國昌 (YAN, KUNIMASA)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：70255389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：メタボロームとプロテオームの融合解析により、糸球体硬化に関与する細胞内代謝経路を探索した。2種類の糸球体硬化症モデル：アドリアマイシン腎症とNEP25 immunotoxin腎症を対象とした。これらの腎症の初期と後期の単離糸球体を試料に、質量解析を行った。プロテオームでは、両腎症モデルの初期と後期のいずれにおいても、高発現が持続していた分子はtransgelinであった。同試料を用いたメタボロームの結果では、明らかな代謝物の発現パターンの違いが観察された。これらの代謝物の同定は、糸球体硬化の病態の根幹に関わる可能性があるtransgelinの発現を調節するパスウェイの解明に役立つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We studied integration of proteomics and metabolomics to identify the intracellular metabolic pathway involved in the progression to glomerulosclerosis, which contributes to the discovery of the novel anti-glomerulosclerosis agents. The study employed two rodent glomerulosclerosis models: adriamycin nephrosis and NEP25 immunotoxin nephritis. Mass spectrometry for proteomics using isolated glomeruli revealed transgelin to be highly expressed in the glomerulus both at an initial- and late stage in both glomerulosclerosis models. Mass spectrometry for metabolomics revealed the different distribution of the metabolites between the control and NEP25 immunotoxin nephritis. These data suggest that the identification of these altered metabolites may contribute to the regulatory pathway of transgelin that possibly underlies the pathomechanism of the glomerulosclerosis.

研究分野：腎臓病学

キーワード：糸球体硬化 質量解析 アドリアマイシン NEP25

1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全は、慢性透析を必要とすることからも、本邦の医療経済に深刻な影響を与えている国民病の一つである。その病理像は、発症年齢や原疾患に関わらず糸球体硬化症である。巣状糸球体硬化症は、糸球体硬化症の初期病理像の major population であり、小児における臨床像は遺伝性ネフローゼや後天性のステロイド抵抗性ネフローゼである。これらのネフローゼは既存の治療に抵抗性であり、小児、成人ともに新規治療薬が切望されている難治性進行性腎疾患である。糸球体硬化のプロセスの解明は、抗難治性ネフローゼ薬、抗糸球体硬化薬の創薬化研究に大きく貢献するが、今もなお、正常糸球体から巣状糸球体硬化へ、そして更に全般性糸球体硬化に至る成因と病態は殆ど解明されていない。腎臓に限らず多くの臓器において、不可逆性障害の鍵となる病態は、線維化(硬化)への移行である。この線維化の病態解明には、上皮間葉転換を促進あるいは制御する分子とその代謝系の同定が必須である。

2. 研究の目的

最近、難治性疾患の病態の解明のために、オミックス研究が行われるようになった。糸球体疾患においても、オミックス研究が実行されているが、糸球体硬化のプロセスの同定を目的としたものは、極めて少ない。オミックス研究では、特に蛋白の発現の差異を同定するためのプロテオミクスが主として行われているが、これのみでは、創薬化研究の対象となる細胞内代謝パスウェイの同定は困難である。本研究の目的は、糸球体硬化に至るまでの経時的糸球体を材料に、メタボロミクスとプロテオミクスの融合解析を行うことで、硬化病変を惹起する代謝パスウェイを同定し、抗糸球体硬化薬の創薬研究につなげることとした。

3. 研究の方法

(1) 糸球体硬化マウス

2種類のマウスモデルを作成した。BALB/cマウスにアドリアマイシン(ADR)10mg/kgを単回静脈内投与し、ADR腎症を作製した。対照群に生理食塩水静脈内投与マウスを用いた(n=3)。ADR静注の5日後、7日後、14日後のマウスそれぞれ3匹に、マグネット磁気

ビーズを灌流させ、摘出腎から糸球体を単離した。また、糸球体上皮特異的障害を誘導できる NEP25 transgenic mouse を用いた。これに、NEP25 上の CD25 に特異的に作用する immunotoxin LMX1B を静注し、1 週後と 2 週後にそれぞれ、4 匹のマウスを屠殺した。比較対象として、LMX1B を投与しない NEP25 マウス 4 匹を用いた。この実験系を 2 回繰り返した。これらの腎から、磁気ビーズにより、糸球体を単離した。いずれのマウスにおいても、腎の一部からパラフィン切片を作成し、光学顕微鏡下で、糸球体硬化病変の確認を行った。

(2) 尿蛋白の同定

各時期の尿蛋白の出現を、尿試験紙法および、SDS-PAGE 後クマシーブルー染色により判断した。

(3) 質量解析

質量解析装置は、LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific 社製) 質量分析計を用いた。プロテオミクスについては、試料を可溶化後トリプシンで消化させ、ナノ流量の高速液体クロマトグラフを用いて逆相系で分離した。同定の高感度化のために、イオン化はナノスプレーを使用した。差異解析はアイソバリックタグを使用し、解析ソフト Proteome Discoverer (Thermo Scientific 社製) と検索エンジン MASCOT (Matrix Science 社) を用いて行った。メタボロミクスについては、各時期の糸球体サンプルを可溶化し、除タンパク操作を行った後に代謝物を抽出した。質量分析の構成は高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析 (LC-MS/MS) とした。試料の分離を高速液体クロマトグラフで行い、エレクトロスプレーイオン化後、MS、MS/MS 分析を行った。代謝物の差異解析は保持時間と MS、MS/MS スペクトルの強度比を用いて解析した。

(4) 免疫蛍光染色

プロテオミクスで得た高発現分子の糸球体内局在について、パラフィン切片を材料とした免疫蛍光染色法を用いて確認した。パラフィン切片は、加熱による抗原賦活を行い、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

(1) プロテオミクス解析

アドリアマイシン腎症（ADR 腎症）

まず基礎実験を行った。ADR 静脈投与 4 日後からタンパク尿は出現したが糸球体の形態変化はなく、4 週間後に約 10% の糸球体硬化病変が観察された。以上のことから、本系の糸球体試料は、糸球体硬化に至る過程のものであることが確認された。1 回目の実験系として、ADR 投与 7 日後の糸球体を用いて、プロテオーム解析を行った。同定されたタンパク分子群を molecular function、cellular component、biological process に分類した。ADR 腎症群において、molecular function では metal ion binding 関連分子が著明に増加し、一方 DNA binding 関連分子が減少した。Cellular component ではミトコンドリア関連タンパクが増加し、核関連タンパクが減少した。Biological process では transport に関わる分子群が増加し、cell organization and biogenesis 関連分子群が減少した。

次に、各タンパク尿期での糸球体試料を用いたプロテオーム質量解析を行った。蛋白尿出現の直後（5 日後）に高発現がみられた分子は、コントロールに比して、抗線維化作用を有する serine protease inhibitor A3K が 6.5 倍、酸化ストレスに対応する mannose-binding protein C が 3.8 倍、アクチン結合蛋白かつ上皮間葉移行時に高発現するとされている transgelin が 2.0 倍において発現増加がみられた。これらの中で、14 日後の線維化（硬化）への経過中に、漸減後に同定不可となったものは、serine protease inhibitor A3K と mannose-binding protein C であった。また、transgelin は、14 日後においても 1.4 倍であり、その低下は緩やかであった。

一方、50% 以下の発現低下があった分子は、nephrin、ephrin、synaptopodin などの糸球体上皮膜蛋白構造に参与するものが主であった。

免疫染色は、発現増加群として transgelin、発現低下群として nephrin について行った。糸球体上皮およびボウマン上皮での transgelin の染色性の増加と、糸球体上皮での nephrin の染色性の低下が確認された。

NEP25 腎症

光顕所見では、1 週後では有意な糸球体硬化

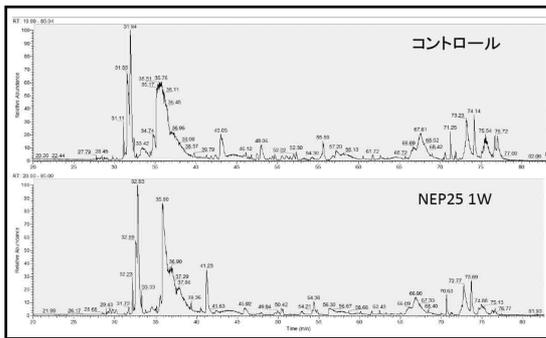
はなかったが、2 週後では約 10% の割合で糸球体硬化が観察され、本方法により糸球体硬化に移行する過程の糸球体を得ていることが確認された。第 1 回目の結果は、1 週後の単離糸球体において、コントロールに比して 1.5 倍以上の発現の促進が見られたタンパク分子は、transgelin (2.267)、glycine amidinotransferase (1.931)、procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (1.604)、electrogenic sodium bicarbonate cotransporter (1.507) であった。これらの分子の発現は、2 週後糸球体では、transgelin (1.960)、glycine amidinotransferase (3.429)、procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (1.624)、electrogenic sodium bicarbonate cotransporter (7.533) と、高値は持続していた。第 2 回目については、transgelin は 1 週後 (4.309)、2 週後 (3.156) と前回と同様に高発現が持続していたが、glycine amidinotransferase、procollagen-lysine、2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2、electrogenic sodium bicarbonate cotransporter については同定されなかった。免疫染色については、糸球体上皮における transgelin の染色性の増強が明らかに観察された。以上のことから、transgelin は糸球体硬化に先立ち、糸球体上皮障害時に高発現する分子として、重要なバイオマーカーであることが同定された。

(2) メタボロミクス解析

NEP25 腎症（4 匹）の糸球体試料を材料に解析した。Immunotoxin LMX1B 静注後 1 週間後の試料をコントロール（生食群 4 匹）と比較した。試料は 4 匹からの単離糸球体を合わせて 1 検体とした。コントロールに比して、糸球体硬化モデルにて増加した代謝物は、分子量 188.09、193.14、212.12、215.13、261.15、279.19、315.20、315.54、316.21、334.18 のものであった。一方、糸球体硬化モデルにおいて減少した代謝物は、135.10、149.02、246.17、267.78、294.86、307.20、332.87、334.48、357.21、372.89 の分子量のものであった（以下、図 1）。

本研究では、糸球体硬化モデルとして糸球体上皮障害機序の異なる 2 種類の腎症を解析対象とした。いずれのモデルにおいても共通して観察された蛋白分子は、transgelin であった。この transgelin の発現は腎症の発症早期

から高発現し、糸球体硬化の進行と平行して徐々に減少した。したがって、transgelin は、



糸球体硬化の発生と進展に関わる重要な分子と結論できた。今後、メタボロームにより同定された代謝物を同定することで、transgelin の発現を調節する代謝経路を探索する。この代謝経路が、新規の抗糸球体硬化薬の標的になる可能性がある。

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)

なし

〔雑誌論文〕(計 件)

なし

〔学会発表〕(計 4 件)

Yan K: Anti-apoptotic function of novel gene product: Glucocorticoid Induced Transcript1 (GLCCI1). Pediatric Nephrology Seminar in Massachusetts General Hospital. Boston, Nov.27, 2017.

楊國昌: グルココルチコイドの抗蛋白尿作用を追い求めて. 第 52 回日本小児腎臓病学会学術総会, 東京, 2017 年 6 月 2 日.

高橋昌兵, 西堀由紀野, 濱野翔, 高木永, 秋元義弘, 宮東明彦, 福富俊之, 楊國昌: Ubiquitin specific protease-40 (USP40) knockout (KO)mouse は糸球体内皮異常によるタンパク尿をしめず. 第 50 回日本小児腎臓病学会学術集会, 神戸, 2015 年 6 月 18 日-20 日.

西堀由紀野, 高橋昌兵, 福富俊之, 秋元義弘, 楊國昌: プロテオーム解析による糸球体硬化の病態解明. 第 50 回日本小児腎臓病学会学術集会, 神戸, 2015 年 6 月 18 日-20 日.

〔図書〕(計 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

楊 國昌 (KUNIMASA, YAN)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号: 70255389

(2)研究分担者

秋元 義弘 (YOSHIHIRO, AKIMOTO)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号: 60184115

西堀 由紀野 (YUKINO, NISHIBORI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号: 70407021

福富 俊之 (TOSHIYUKI, FUKUTOMI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号: 30439187

(3)連携研究者

奥野 恭史 (YASUSHI, OKUNO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号: 20283666

松阪 泰二 (TAIJI, MATSUSAKA)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号: 50317749