

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19661

研究課題名(和文)小児特発性ネフローゼ症候群の病態解明 - 質量分析法による病勢関連蛋白質の同定 -

研究課題名(英文)Identification of the protein that associated with the status of ISSNS

研究代表者

青柳 順 (Jun, Aoyagi)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：80438639

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)：特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群(ISSNS)の病態解明に寄与する知見を得て、発症予防、及び、治療薬の開発を促進させることを目的として本研究を開始した。対象は33名のISSNS患児で、ステロイド治療開始前の非寛解期の血清を用いた。我々が先の研究でISSNSのdeep proteinとして同定した、ISSNSの病因候補一次質量ペプチドイオン3個に対し、ペプチドシークエンスタグ法を用い、病因候補蛋白質を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の既報では、二次性ネフローゼ症候群や尿所見正常群との比較においてISSNS群で有意に上昇していたポリペプチドを対象に検討しており、今回同定したprotein Xの上昇がネフローゼ症候群に続発する高脂血症に伴うものであるとは言い難かった。つまり、ISSNSの病態形成において、腎臓から大量の蛋白漏出が起こる過程のどこかにprotein Xの関連性を示唆するものと考えられた。protein Xを病因候補蛋白質として同定することができ、いまだ不明であるISSNSの病態の解明を進めていく新たな研究の起点となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Humoral factors may cause idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome (ISSNS). In the present study, we analyzed serum proteins using mass spectrometry (MS) to identify proteins associated with the pathophysiology of pediatric ISSNS. We collected serial serum samples from 33 children with ISSNS at the acute phase prior to steroid treatment (STx). We used surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight MS for sample analysis. The intensity of an m/z of 8,915 was identified as protein X. Our findings provide new insights into the pathophysiology of ISSNS.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：特発性ネフローゼ症候群 質量分析法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

[1] 小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群 (ISSNS) の病態解明の必要性、及び、病因因子同定に関する国内外の研究動向

小児 ISSNS は、本邦で年間約 1300 人の新規患者がある慢性腎疾患である。本症の原因は不明で、特異的治療法や根本的治療法はない。ステロイド治療により生命予後は良好になったが、長期間のステロイド治療は様々な合併症を起し、小児の健やかな成長・発達を妨げている。ISSNS の病因因子は血清中に存在することが、これまでの臨床・研究報告より強く推測されている。この病因因子同定の研究は、特定推定病因物質の蛋白尿誘導の再現の有無リンパ球遺伝子発現量変化 という手法が中心であった。しかし、両方法とも、患者血清中蛋白質の網羅的解析を、十分にできるものではない。

[2] 現在までの我々の研究成果

我々は、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析法 (SELDI-TOF MS 法) を用い、本症罹患児の、血清全蛋白質とその濃度を網羅的に解析した。結果、 m/z 10000 以下を検索対象として、治療開始前ネフローゼ期に特異的 ($P < 0.01$) に発現量が増加し、かつ、尿蛋白量と相関を示した一次質量ペプチドイオンを 4 個検出した。このうちの 2 つを Apolipoprotein AII (Apo AII) および Apolipoprotein C (Apo C) と同定し、報告した^{1,2}。その後 Apo AII は小児 ISSNS のネフローゼ期に優位となる Th2 細胞を誘導する因子であることが報告された³)。これはネフローゼにおける脂質異常が高度蛋白尿に伴う二次的变化ではなく、脂質異常が小児 ISSNS の誘因となることを示した世界で初めての報告となった。

2. 研究の目的

小児慢性腎疾患において、特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群 (ISSNS) は重要な位置を占めており、同疾患の病態解明に寄与する知見を得て、発症予防、及び、治療薬の開発を促進させることを目的として本研究を開始した。この目的のために、ISSNS 関連因子を同定し、同時に、標的傷害組織部位を確認することを試みる。我々が先の研究で ISSNS の deep protein として同定した、ISSNS の病因候補一次質量ペプチドイオン 3 個に対し、ペプチドシーケンスタグ法を用い、病因候補蛋白質を同定する。また、同定した病因候補蛋白質を小児 ISSNS 患児の血清中に確認し、蛋白尿、低アルブミン血症そして全身性浮腫といったネフローゼの病勢に関与する因子との関連を調べる。

3. 研究の方法

表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析法 (SELDI-TOF MS 法) により、我々が同定した病因候補一次質量ペプチドイオン 4 個のうち、未同定の残り 2 個を、ペプチドシーケンスタグ法により、同定する。これは、小児 ISSNS に対する、病因因子候補蛋白質である。

対象：特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群の患児 33 名 (男児 21 名、女児 12 名)

年齢の中央値 7 歳 (1-15 歳)。患者のステロイド治療開始前の非寛解期の血清を用いた。

[1] 候補一次質量ペプチドイオンの精製

1) 血清から major protein (アルブミン・グロブリン) の除去

Serum fractionation Kit (Bio-Rad) を用いて、血清総蛋白の 75% を占める major protein を除去し、以下のクロマトグラフィー分離による目的ペプチドの精製をしやすいとする。

2) 一次質量ペプチドイオンの精製

候補一次質量ペプチドイオンは、これまでの申請者の研究結果から、すでに、等電点が判明しているため、初期精製には、イオン交換クロマトグラフィーを、中間精製には、イオン交換高速液体クロマトグラフィーを、また、質量も判明しているため、最終精製には、ゲルろ過高速液体クロマトグラフィーを行い、目的ペプチドイオンを精製する。

[2] 候補一次質量ペプチドイオンからの小児 ISSNS 病因候補蛋白質の同定

- ペプチドシーケンスタグ法による同定 -

精製したペプチドイオンをタンデム質量解析し、分解して得られた生成イオンのピーク間の質量差を測定し、各ペプチドイオンのアミノ酸配列情報を得る。これに、トリプシン処理した時の、ペプチド末端のアミノ酸の種類とその質量の情報から病因候補蛋白質を同定。

4. 研究成果

結果：

ヒト血清サンプル 100 μ L を陰イオン交換カラムで分画したところ、pH 3 溶出画分に目的ピーク(m/z 8915)を検出した。この画分を粗精製画分として、次のクロマト分画に供した。陰イオン交換カラム pH 3 画分を逆相高速液体クロマトグラフ (HPLC) に供し、アセトニトリル濃度勾配で溶出した。各フラクションを表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析法(SELDI-TOF MS 法)で分析したところ、目的ピーク m/z 8915 を、主にフラクション 33 に確認することができた。このフラクションには高分子たんぱく質も存在するので、次に順相 HPLC に供した (図 1)。

図1 SELDI-TOF MS法によるターゲットピーク確認

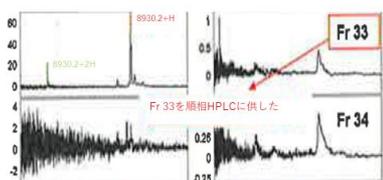
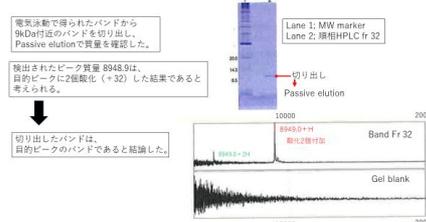


図2 電気泳動と passive elution の結果

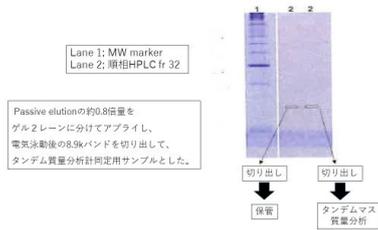


逆相 HPLC フラクション 33 を順相 HPLC に供し、フラクション 32 に目的ピークを確認。

この順相 HPLC フラクションを電気泳動で分画した。電気泳動で得られたバンドを切り出し、Passive elutionで質量を確認。検出されたピーク質量 8948.9 は、目的ピークよりも 33.9 増加した質量であった。この質量約 34 の増加は目的ピークが 2 個酸化 (+32) されて生じたと考えられ、切り出したバンドは目的ピークのバンドであると結論づけた (図 2)。

Passive elutionの結果から、順相 HPLC フラクションを電気泳動に供し、得られた 8.9k バンドを切り出して、タンデム質量分析計同定用サンプルとした (図 3)。

図3 タンデム質量分析用サンプルの電気泳動



タンデム質量解析し、分解して得られた生成イオンのピーク間の質量差を測定し、各ペプチドイオンのアミノ酸配列情報を得た。

これにトリプシン処理した時の、ペプチド末端のアミノ酸の種類とその質量のデータに対し、マスコットサーチを行い、同フラクションに含まれるポリペプチドイオンは、ヒト protein X に由来するものであることを同定した。

考察：これまでに我々は、Apolipoprotein A および Apolipoprotein C と ISSNS 発症との関連性を示唆する結果を報告した 1, 2)。また、我々は小児 ISSNS のネフローゼ期には、Th2 細胞が優位に誘導されていることを報告した 4)。近年になり、Apo A は、IFN- γ 産生を抑制することが報告された 3)。これは、ApoA が、間接的に、ナイーブ T 細胞を Th2 細胞に分化誘導する可能性を示唆する。このため、我々の一連の研究は、これまでの ISSNS における脂質異常がネフローゼに伴う二次的なものであるという考えを覆し、脂質異常は、ISSNS の誘因の一つであるという、新たな事実を明らかにした。また、我々の既報では、二次性ネフローゼ症候群や尿所見正常群との比較において ISSNS 群で有意に上昇していたポリペプチドを対象に検討しており、今回同定した protein X の上昇がネフローゼ症候群に続発する高脂血症に伴うものであるとは言い難かった。つまり、ISSNS の病態形成において、腎臓から大量の蛋白漏出が起こる過程のどこかに protein X の関連性を示唆するものと考えられた。

結論：Apolipoprotein A と Apolipoprotein C に加え、protein X を病因候補蛋白質として同定することができ、いまだ不明である ISSNS の病態の解明を進めていく新たな研究の起点となる可能性がある。

文献：

1. Kanai T, Yamagata T, Ito T, Odaka J, Saito T, Aoyagi J, Momoi MY. Apolipoprotein AII levels are associated with the UP/UCr levels in idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome. Clin Exp Nephrol. 2015; 19: 107-13.
2. Odaka J, Kanai T, Ito T, Saito T, Aoyagi J, Betsui H, Yamagata T. Apolipoprotein C-I Levels Are Associated with the Urinary Protein/Urinary Creatinine Ratio in Pediatric Idiopathic Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome: A Case Control Study. Int J Nephrol. 2017; 2017: 6392843.
3. Yamashita J, et al. Apolipoprotein A-II suppressed concanavalin A-induced hepatitis via the inhibition of CD4 T cell function. J Immunol. 2011;186(6):3410-20
4. Kanai T, Shiraishi H, Yamagata T, Ito T, Odaka J, Saito T, Aoyagi J, Momoi MY. Th2

cells predominate in idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome. Clin Exp Nephrol. 2010;14: 578-

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〕

2020年6月1日現在、投稿準備中である。

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
研究協力者	小高 淳 (Odaka Jun)		
研究協力者	伊東 岳峰 (Ito Takane)		
研究協力者	齋藤 貴志 (Saito Takashi)		
研究協力者	別井 広幸 (Betsui Hiroyuki)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	金井 孝裕 (Kanai Takahiro) (00398504)	自治医科大学・小児科学・准教授 (32202)	