

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：13101
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22659165
 研究課題名（和文） On-site プロテオミクスによる IgA 腎症・膜性腎症の抗原同定と発症機序解明
 研究課題名（英文） Identification of antigen of IgA and Membranous Nephropathy by On-site proteomics
 研究代表者
 許 波 (XU BO)
 新潟大学・医歯学総合研究科・研究員
 研究者番号：70463982

研究成果の概要（和文）：IgA 腎症と膜性腎症は免疫複合体の形成などに深く関わっていると考えられているが、その抗原についてはまだ不明な点が多い状況である。本研究は IgA 腎症・膜性腎症の症例の 10 μ m 厚さの切片を特別な前処理を行った後、レーザーマイクロダイセクション（LMD）を用いて、切片から糸球体を切り出した。当研究室で開発した On-site プロテオミクス法で解析し、バイオインフォマテクス解析や疾患パスウェイ解析に介して、正常糸球体検体と発現差異のあるタンパク質群は IgA・膜性腎症の発症機序への関わりを探求することを試みした。

研究成果の概要（英文）：Formation of immune complexes were recognized as key rule involved with IgA nephropathy and membranous nephropathy deeply, but it is still unclear in many cases of antigen of these diseases. In this study, 10 μ m thickness sections of kidney biopsy samples were pretreated, and glomeruli were dissected by using laser micro dissection (LMD). Peptides were extracted from collected glomeruli followed by On-Site proteomics method followed LC-MS/MS analysis. Proteins with significant changes between the IgA・membranous nephropathy and normal glomerulus were analyzed by bioinformatics tool and pathway analysis of diseases to be explored their pathogenesis of IgA・membranous nephropathy

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	0	2,000,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	300,000	3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：IgA 腎症、膜性腎症、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症と膜性腎症は、いずれも免疫複合体が糸球体に沈着して発症してくる疾患

である。その発症機序に関して多くの研究がなされ、いくつかの仮説が提示されているが、免疫複合体に含まれるはずの抗原について

は、不明な点が多い。その抗原はヒト組織由来タンパク質のみならず、外部のタンパク質であることも考えられる。このような抗原物質を同定することは、IgA 腎症・膜性腎症の治療や予後の確定に重要な情報を与えることになり、網羅的に抗原物質を同定することによって IgA 腎症・膜性腎症の発症機序の解明に結びつくと考えている。我々は微量なヒト組織試料のプロテオミクス研究における実験者由来するケラチンをはじめ汚染物質の影響を最小限に出来る方法を開発し、更に上記の IgA 腎症・膜性腎症のホルマリン固定パラフィン封埋 (FFPE) 生検試料からペプチドを抽出することに試みした。質量分析計にて十分測定出来る量のペプチド試料が用意できるようになった。この方法を用いて、IgA 腎症と膜性腎症の腎生検試料からタンパク質情報をより多く取得するうえ、差異のあるペプチドを絞り出すことが可能であった。抗原候補は、病的組織に、正常組織の MS データに存在しない或いはあるタンパク質と質または量のうえで異なって存在していることを考えれば、上記の方法が IgA 腎症と膜性腎症に関わる原因抗原物質の確定には有利な方法であることは明らかであった。

2. 研究の目的

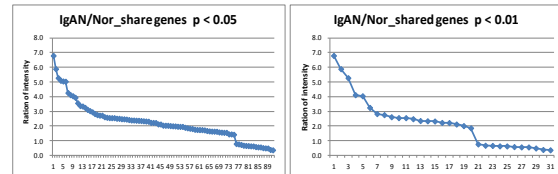
IgA 腎症と膜性腎症の発症には免疫複合体の形成が深く関わっているが、その抗原については未だ不明な点が多い。本研究は IgA 腎症と膜性腎症の原因抗原候補を同定し、発症機序を明らかにすることを目的とした。当研究室では、IgA 腎症と膜性腎症の病的組織と正常組織のペプチド質量情報の比較によって、異なるタンパク質成分を網羅的に見出す。それによって抗原の候補を絞り込み、さらに免疫学的手法を用いて抗原候補を決めると同時に IgA 腎症と膜性腎症の発症機序への関連性を明らかにする目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 正常組織、IgA 腎症、膜性腎症 3 群の腎生検標本からホルマリン固定パラフィン包埋切片 (FFED) を作製し、レーザーマイクロダイセクション (LMD) で切片から糸球体を切り出し、それぞれの検討群標本とする。標本を前処理した後、標本を直接一定の方法で活性化したトリプシン溶液で消化する。
- (2) その後、消化産物を回収し、C₁₈ StageTip®で精製し、Ion Trap、Orbi Trap LC/MS 式質量分析計によって分析し、消化産物にあるペプチドの MS スペクトル情報を収集する。
- (3) 次に LC-Progenesis やラベルフリー定量法などを利用して、MS スペクトル情報を解析、正常組織と比べ種類及び量的に

差異のある MS スペクトラ情報を絞り出す。差異のあるタンパク質を検出する。同定されたタンパク質が抗原候補リストに登録される。

- (4) さらに抗原候補タンパク質情報から選択した後、対応抗体を用いて IgA 腎症・膜性腎症の腎生検切片の検討を行い、抗原の同定を行う。



4. 研究成果

- (1) IgA 腎症生検試料のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFED) 切片を作製し、レーザーマイクロダイセクション (LMD) で切片から糸球体を切り出し、標本を前処理した後、標本を直接一定の方法で活性化したトリプシン溶液で消化する方法を確立した。この方法では効率よくかつ質の良いペプチドを微量の組織から抽出することが成功した。

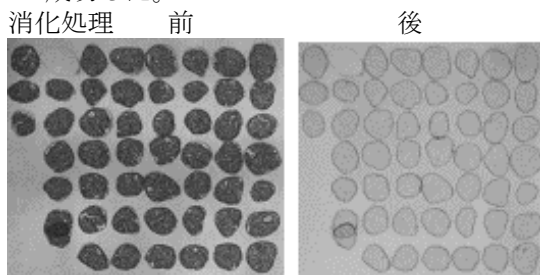
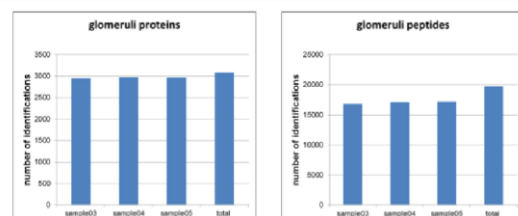


図 01. (エオシン染色)

上記の図に示したように、殆どの FFPE 組織が活性化したトリプシン酵素液を用いて短時間で消化された。

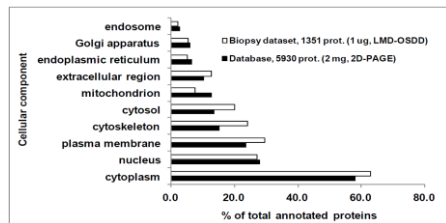
- (2) レーザーマイクロダイセクション (LMD) で取れた糸球体標本 (1 mm²) から大量タンパク質の同定が成功した。

Glomeruli single shot test runs



- (3) この方法で抽出されたタンパク質の情報は我々の研究室から既に報告した単糸球体の同定結果と比べてもバリエーションのない結果でした。
- (4) IgA 腎症と正常ヒト腎糸球体組織にて共通発現しているタンパク質のなか、IgA 腎症で優位的に発現しているタンパク質の

発現レベルと遺伝子リスト。

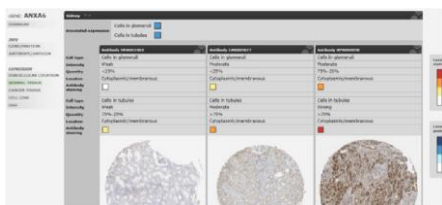


Share-genes p<0.05 IgAN/Nor>2 (50 genes)

```

CYB5R3 S100A9 CAT RPL13 C9 AMBP C3 RAB35
LCP1 FGG MDH2 IGHA1 PFN1 BLVRB CA1 TUBAL3
PRDX6;ARF1;ENO2;PRDX3;TXN;ANXA6 FSCN1 TKT
CBR1 PDIA6 HNRNPK HSPA12A ATP5B ATP1A1
EEF2 VCP CTSD GPI SERPINA1 PPIB PRDX1
ATP5A1 PKM2 CAPZA1 RAB1A
SNORA6;RPSAP15;SNORA62;RPSA LIMS1 GNAT1
P4HB PRDX2 TINAGL1 TLN2 RPS16 TGFB11
    
```

(5)上記の情報を基づく Protein Atlas での組織免疫染色結果情報の確認の一例。



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 9 件)

- (1) Tsuneki M, Maruyama S, Yamazaki M, Xu B, Essa Ah, Abe T, Babkair H, Cheng J, Yamamoto T, Saku T. Extracellular heat shock protein A9 is a novel interaction partner of podoplanin in oral squamous cell carcinoma cells. *BBRC* 2013, 434: 124-130. doi:10.1016/j.bbrc.2013.03.057 (査読有)
- (2) Liu Z, Xu B, Nameta M, Zhang Y, Magdeldin S, Yoshida Y, Yamamoto K, Fujinaka H, Yaoita E, Tasaki M, Nakagawa Y, Saito K, Takahashi K, Yamamoto T. Profiling of kidney vascular endothelial cell plasma membrane proteins by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Exp Nephrol* 2013 (掲載予定) doi:10.1007/s10157-012-0708-1 (査読有)
- (3) Magdeldin S, Yoshida Y, Li H, Maeda Y, Yokoyama M, Enany S, Zhang Y, Xu B, Fujinaka H, Yaoita E, Sasaki S, Yamamoto T. Murine colon proteome and characterization of the protein pathways. *BioData Min.* 2012, 5:11. doi:10.1186/1756-0381-5-11. (査読有)
- (4) Enany S, Yoshida Y, Magdeldin S, Zhang Y, Xu B, Yamamoto T. Extensive proteomic profiling of the secretome of European community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clone. *Peptides.* 2012, 37:128-37. doi:10.1016/j.peptides.2012.06.011. (査読有)
- (5) Yoshida Y, Nameta M, Kuwano M, Zhang Y, Xu B, Magdeldin S, Cui Z, Fujinaka H, Yaoita E, Tomonaga T, Yamamoto T. Proteomic approach to human kidney glomerulus prepared by laser microdissection from frozen biopsy specimens: exploration of proteome after removal of blood-derived proteins. *Proteomics Clin Appl.* 2012, 6:412-7. doi:10.1002/prca.201200016. (査読有)
- (6) Magdeldin S, Yoshida Y, Zhang Y, Xu B, Yaoita E, Yamamoto T: "All and None" Refining Strategy; Fishing Your Correct Protein from Proteomics Ocean. *J Proteomics Bioinform.* 2011, 4:123-124. (査読有)
- (7) Zhang Y, Yoshida Y, Xu B, Magdeldin S, Fujinaka H, Liu Z, Miyamoto M, Yaoita E, Yamamoto T. Comparison of human glomerulus proteomic profiles obtained from low quantities of samples by different mass spectrometry with the comprehensive database. *Proteome Sci.*

2011, 9:47. doi: 10.1186/1477-5956-9-47.
(査読有)

- (8) Xu B, Zhang Y, Zhao Z, Yoshida Y, Magdeldin S, Fujinaka H, Ismail TA, Yaoita E, Yamamoto T: Usage of electrostatic eliminator reduces human keratin contamination significantly in gel-based proteomics analysis. *J Proteomics* 2011, 74: 1022-9. doi: 10.1016/j.jprot.2011.03.001. (査読有)
- (9) Koda R, Zhao L, Yaoita E, Yoshida Y, Tsukita S, Tamura A, Nameta M, Zhang Y, Fujinaka H, Magdeldin S, Xu B, Narita I, Yamamoto T: Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. *Cell Tissue Res.* 2011, 343:637-648. doi: 10.1007/s00441-010-1117-y (査読有)

[学会発表] (計 29 件)

- (1) Xu B, Shimada S, Zhang Y, Yoshida Y, Liu Z, Magdeldin S, Fujinaka H, Yaoita E, Yamamoto T. Proteomics analysis of laser microdissected FFPE glomerular sections from human IgA nephropathy biopsy specimens. 第 11 回国際ヒトプロテオーム機構学術集会, 2012 年 9 月 9 日-13 日、ボストン (アメリカ合衆国)
- (2) Xu B, Shimada S, Zhang Y, Magdeldin S, Fujinaka H, Yoshida Y, Yaoita Y, Yamamoto T: Comparison of on-site proteomics study on laser microdissected FFPE and frozen human glomerulus tissues. 第 10 回国際ヒトプロテオーム機構学術集会, 2011 年 9 月 4 日-7 日、ジュネーブ (スイス連邦)
- (3) Xu B, Zhang Y, Shimada S, Magdeldin S, Yoshida Y, Yaoita E, Yamamoto T. Proteomics results of small FFPE rat cortex tissues treated by 3 methods. 日本プロテオーム学

- 会 2011 年大会 (第 9 回日本ヒトプロテオーム機構)、2011 年 7 月 28 日-30 日、新潟
- (4) Xu B, Shimada S, Takamura M, Zhang Y, Azlina E, Magdeldin S, Yoshida Y, Yaoita E, Yamamoto T. Proteome research of murine liver tissues of NASH model mouse. 日本プロテオーム学会 2011 年大会 (第 9 回日本ヒトプロテオーム機構)、2011 年 7 月 28 日-30 日、新潟
- (5) Xu B, Yoshida Y, Yamamoto T: Preparation of sample for proteomics research. 日本プロテオーム学会 2011 年大会 (第 9 回日本ヒトプロテオーム機構)、2011 年 7 月 28 日-30 日、新潟
- (6) Xu B, Shimada S, Zhang Y, Yoshida Y, Yaoita E, Morita T, Yamamoto T. Proteomics analysis on formalin-fixed paraffin-embedded human glomeruli using laser microdissection and on-site direct trypsin digestion. 第 54 回日本腎臓学会学術総会、2011 年 6 月 15 日-17 日、横浜
- (7) Xu B, Shimada S, Zhang Y, Magdeldin S, Fujinaka H, Yoshida Y, Yaoita E, Yamamoto T: On-site proteomics study on laser microdissected rat renal cortex and human glomerulus tissues. 9th Annual World Congress of Human Proteome Organization (HUPO), 2010 年 9 月 19 日-23 日, シドニー (オーストラリア連邦)
- (8) Xu B, Shimada S, Zhang Y, Ikashima M, Yoshida Y, Yaoita E, Morita T, Yamamoto T. Proteomics analysis on formalin-fixed paraffin-embedded tissue using laser microdissection and on-site direct trypsin digestion. 第 8 回日本ヒトプロテオーム機構、2010 年 7 月 26 日-28 日、東京
- (9) Xu B, Shimada S, Zhang Y, Ikashima M, Yoshida Y, Yaoita E, Yamamoto T:

Proteomics study of formalin fixed
paraffin embedded rat kidney by laser
microdissection. 第53回日本腎臓学会学術
総会, 2010年6月16日-18日, 神戸

[その他]
ホームページ等
<http://hkupp.kir.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

許 波 (XU BO)
新潟大学・医歯学総合研究科・研究員
研究者番号：70463982

(2) 研究分担者

山本 格 (YAMAMOTO TADASHI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：30092737

張 エイ (ZHANG YING)
新潟大学・医歯学総合研究科・研究員
研究者番号：00529472