科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２６　年　　５　月　３１　日現在

機関番号：　１３１０１
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2011～2013
課題番号：　２３７９０９３３

研究課題名（和文）ＡＬＬーａｎｄーＮｏｎｅ法を用いた網羅的プロテオミクスによる膜性腎症抗原の同定

研究課題名（英文）Exploring the pathogenic antigens implicated in membranous glomerulonephritis by proteomics and bioinformatics using "All and None" approach strategy

研究代表者
アブデルガワッド　サマー（Abdelgawwad, Sameh）

新潟大学・医歯（薬）学総合研究科・研究員

研究者番号：５０５２９４６９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円、（間接経費）　　870,000円

研究成果の概要（和文）：膜性腎症抗原同定を目的として、腎生検試料（30例）をショットガン質量分析解析と新たに開発した「All and None」ソフトウエアにより糸球体プロテオーム解析を行った。病変の認められた腎生検試料切片からLaser microdissectionにより50個の糸球体を回収し質量分析の試料とした。タンパク質の同定にはMascotとProluCIDを用いた。膜性腎症群と対照群プロテオームとの比較から、膜性腎症に特徴的に増加或は減少しているタンパク質をAll and None法で特定し、Gene Ontology解析で関連するBiological Processを見出した（HKUPPに公表予定）。

研究成果の概要（英文）：We aimed at disclosing the antigens implicated in membranous nephropathy. Using shotgun proteomics combined with laboratory-made software (All and None), we analyzed 30 membranous nephropathy kidney biopsy samples. We collected 50 glomeruli sections for analysis by LC-MS/MS. Mascot or ProluCID were used as search engines to discriminate protein differences in these samples compared to control groups. We depicted an initial proteome profile for the possible dysregulated proteins implicated in this disease, and analyzed these proteins by using gene ontology for identification of biological processes relevant to the disease. In addition, we generated a database for further use, which would be integrated in the Human Kidney Urine Proteome Project (HKUPP).

研究分野：　医歯学系

科研費の分科・細目：　内科系・腎臓学

キーワード：　腎臓　プロテオミクス　ラベルフリー定量　膜性腎症

１．研究開始当初の背景

膜性腎症（MN）は免疫複合体が関与する腎疾患であり、患者の 80%以上は原因不明であり特発性膜性腎症と呼ばれ、成人ではネフローゼを呈する主要な腎疾患である。2009 年に Beck らは対象とした 37 人の MN 患者の 26 人（70％）に、M-type phospholipase A2 に対する自己抗体が存在することを報告し※1、2010 年には aldose reductase と SOD に対する自己抗体が患者血漿中に見出されるとする報告がなされたが※2、基底膜の免疫沈着物を構成するタンパク質は確認されていない。ステロイドあるいは免疫抑制薬を用いた薬物療法が施行されるが、40%の膜性腎症患者は薬剤抵抗性であり、患者のおよそ 2/3 は末期腎不全に進行する。我々はこれまでに、凍結、フォルマリン固定腎生検試料から Laser-microdissection で回収した糸球体を用いた効率的な網羅的プロテオーム解析を開発してきた。この方法を膜性腎症の解析に用いれば、免疫複合体の抗原の同定に成功し、新たな治療法の開発の手掛かりが得られる可能性は高い。

※1. Beck LH, Bonggio RG, Lambeau G, Beck D, Powell D et al., (2009).M-type phosphlipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. New Engl J of Med 361: 11-21.
※2. Prunotto M, Carnevali LC, Candiano G, Murtas C et al., (2010). Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2, J Am Soc Nephrol, 21:507-509.

２．研究の目的

我々はこれまでにプロテオミクスで得られる大規模データを比較する手法として、All and None 法を開発し、Visual Basic 言語を用いた解析ソフトウェアを作製している。この方法は、2 つの群を比較して、明らかに発現量の異なるタンパク質を明確に知ることができる点で優れている※3。この All and None 法を用いて、対照群と膜性腎症群の糸球体プロテオームの比較を行う。

※3. Magdeldin, S., Huiping L., Yoshida, Y., Satokata I., Maeda Y., Yokoyama M., Enany S., Zhang Y., Xu B., Fujinaka H., Yaoita E., Yamamoto T. (2010). Differential proteomic shotgun analysis elucidates involvement of water channel aquaporin 8 in presence of alpha amylase in the colon. J Proteome Res, 39:6635-6646.

３．研究の方法

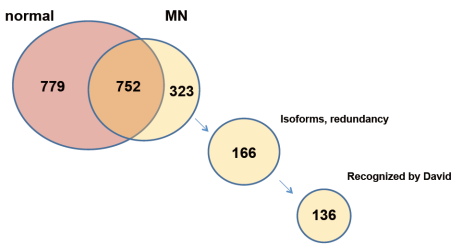
（１）試料は膜性腎症のフォルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）腎生検試料（30 例）を用いた。試料はすべて我々が開発した On Site Direct Digestion (OSDD)法により※4、同一の試料から Laser microdissection で糸球体（50 切片）を回収し、トリプシン消化後、生成したペプチドを C18 スピンカラムにより精製し、LC-MS/MS 解析に供した。組織学的に正常な組織から同様な方法で調製したペプチド試料を対照に用いた。

（２）LC-MS/MS 解析は、Orbitrap-Elite (Thermo Scientific)を使用し、0.1 × 500 mm の C18 カラムに direct injection 法で試料をロードし、4 時間の gradient time でペプチドを溶出した。タンパク質同定は、Mascot と ProluCID を用い、Significant threshold は 0.1% 以下に設定した。膜性腎症群と対照群の間で発現量が大きく異なるタンパク質を前述の All and None で特定し、さらに我々が公開している糸球体プロテオーム・データベース（http://www.hekupp.org/DB.html）との比較、Gene ontology 法を用いた Bioinformatics により、疾患関連タンパク質の絞り込みを行った。

※4. Xu B et al, submitted to J Proteome Res.

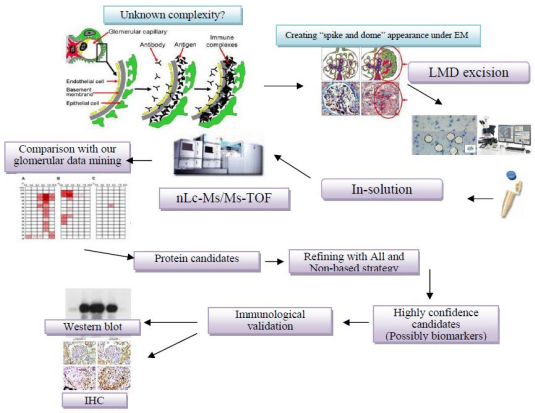
４．研究成果

(1) LC-MS/MS 解析により、正常対照群、膜性腎症群いずれも、一つの試料あたり 1000-1500 のタンパク質が同定された。但し、特に膜性腎症群における同定数の差異が大きく、ペプチドの回収率が膜性腎症群では試料ごとに差がある可能性を示唆した。
(2) All and None 法は、比較する 2 群の間で発現量に大きな差のあるタンパク質を確実に特定する点が優れている。本研究では、特に、膜性腎症(MN)群で発現量の高い 323 のタンパク質に着目した。



(3) 膜性腎症（MN）群で高発現している 323 のタンパク質から遺伝子名に基づいて冗長性を排除し（166）、さらに、David（Gene ontology 解析ソフトウエア）を用いて、疾患に関連すると考えられる Biological process にヒットする 136 のタンパク質を選び出した。
(4) 最終的に抗原あるいは疾患関連タンパク質を確定するには、ウエスタンブロッティン

グ、免疫組織化学などの抗体を用いた方法で確認する実験が必要であり、現在検討している段階である。また、プロテオーム解析の結果は、Human Kidney and Urine Proteome Project (HKUPP) のホームページ（http://www.hekupp.org/DB.html）に公開予定である。



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）

〔雑誌論文〕（計　6　件）

① Magdeldin S, Yamamoto K, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Fujinaka H, Yaoita E, Yates JR III, Yamamoto T, Deep proteome mapping of mouse kidney based on OFFGel prefractionation reveals remarkable protein post-translational modifications. J Proteome Res, 2014, 13:1636-1646
DOI: 10.1021/pr401122m　**（査読有）**

② Yaoita E, Yoshida Y, Nameta M, Zhang Y, Fujinaka H, Magdeldin S, Xu B, Yamamoto T, Heparin increasing podocyte-specific gene expressions. Nephrology, 2014, 19:195-201.
DOI: 10.1111/nep.12207**（査読有）**

③ Cui Z, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Nameta Mm Magdeldin S, Makiguchi T, Ikoma T, Fujinaka H, Yaoita E, Yamamoto T, Profiling and annotation of human kidney glomerulus proteome. Proteome Sci, 2013. 11:13
DOI: 10.1186/1477-5956-11-13**（査読有）**

④ Iida T, Fujinaka H, Xu B, Zhang Y, Magdeldin S, Nameta M, Liu Z, Yoshida Y, Yaoita E, Tomizawa S, Saito A, Yamamoto T, Decreased urinary calbindin 1 levels in proteinuric rats and humans with distal nephron segment injuries. Clin Exp Nephrol, 2013 Jul 18 [Epub ahead of print]
DOI: 10.1007/s10157-013-0835-3**（査読有）**

⑤ Magdeldin S, Yamamoto T, Toward deciphering proteomes of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. Proteomics, 2012, 12:1045-1058.
DOI: 10.1002/pmic.201100550**（査読有）**

⑥ 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. Proteom Sci, 2011, 9:47
DOI: 10.1186/1477-5956-9-47**（査読有）**

〔学会発表〕（計　3　件）

① Magdeldin S, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Yaoita E, Yamamoto T, Evaluation of OFFGel-based prefractionation approach in combination with in-solution or ultra-filtration protein digestion. HUPO 12th Annual World Congress 2013, Yokohama, Japan, 14-18 September 2013.

② Magdeldin S, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Yaoita E, Yamamoto T, Multi enzyme direct digestion and uHPLC-MS/MS analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded laser micro dissected specimens. HUPO 11th Annual World Congress 2012, Boston, MA, U.S.A., September 9-13 2012.

③ Magdeldin S, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Yaoita E, Yamamoto T, Characterization and building up a comprehensive murine colon proteome catalogue. HUPO 10th Annual World Congress 2011, Geneva, Switzerland, September 4-7, 2011

〔図書〕（計　1　件）

① Magdeldin S, Enany S, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Zureena Z, Lokamani I, Yaoita E, Yamamoto T, Clin Proteomics, BioMed Central, London, 2014, 11:16.

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　件）
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　0　件）
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
新潟大学医歯学総合研究科腎研究施設構造

病理学分野
http://www.kidney-niigata.org/strpath/ind_j.html
Human Kidney and Urine Proteome Project（HKUPP）
http://www.hekupp.org/DB.html

６．研究組織

(1)研究代表者
アブデルガワッド　サマー
（Abdelgawwad, Sameh）
新潟大学医歯学総合研究科研究員
研究者番号：50529469

(2)研究分担者
（　　）
研究者番号：

(3)連携研究者
（　　）
研究者番号：