

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791191

研究課題名(和文) プロテオミクス分析による小児特発性微小変化型ネフローゼ症候群発症原因蛋白質の同定

研究課題名(英文) Identification of the causative antigens of idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome in childhood by proteome analysis

研究代表者

小高 淳 (Jun, Odaka)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70382885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群(ISSNS)では大量の蛋白漏出の原因となる何らかの液性因子の存在が疑われており、今回その同定を試みた。液性因子の主体は蛋白質である。今回の研究ではプロテオーム解析という大量の蛋白解析法のうち、SELDI TOF-MS法を用いてISSNS患者血清中に特異的に高発現している蛋白質を同定した。寛解期および二次性ネフローゼ患者と比較して、ネフローゼ期に特異的に高発現していた蛋白質として、アポリポプロテインC1を同定した。ISSNSとの関連を述べた報告はこれまでなく、その病態形成にどのように関連しているか、今後の検討課題である。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that some humoral factors are the causative agents of idiopathic nephrotic steroid-sensitive nephrotic syndrome (ISSNS) in childhood. This study aimed to identify this humoral factors. Since a humoral factor component mainly of a protein, in this study, we used a proteomic analysis called surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry to identify serum proteins which is highly expressed in ISSNS patients. Apolipoprotein C1 was detected at significant elevation during the acute phase compared with the remission phase and pediatric patients with secondary nephrotic syndrome. This is the first report that shows a relationship between an elevation of apolipoprotein C1 and the pathophysiology of ISSNS, and this findings present an interesting starting point for further investigation into the pathophysiology of ISSNS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児特発性ネフローゼ症候群 プロテオミクス 蛋白透過性因子

1. 研究開始当初の背景

小児慢性腎疾患において重要な位置を占める特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群 (ISSNS) の原因はいまだ不明であり、特異的治療法や根本的治療法はない。長期間のステロイド治療は様々な続発症を起し、小児の健やかな成長・発達が妨げられている。本研究により、本症の病態解明に寄与する知見を得て、その発症予防および新たな治療薬の開発が必要とされる。

本症の原因として患者血清中に存在する、糸球体に対する透過性因子 (病因蛋白質) の存在が推測されており、実際、(1) 本症罹患者の腎臓を移植されたレシピエントは本症を呈さないこと (2) 本症罹患者の末梢血リンパ球の培養上清をラットの腹腔内へ投与することにより蛋白尿が誘導されること、等の報告からも支持されている。

我々は先の研究で、新しいプロテオミクス解析法である、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、小児 ISSNS 患児の血清中全蛋白質の分解産物 (一次質量ペプチドイオン) 濃度変化を網羅的に解析し、ネフローゼ期 (治療前) に特異的 ($P < 0.01$) に発現量が増加・減少し、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。これらは小児 ISSNS 病因蛋白質の重要な候補ペプチドイオンである。

2. 研究の目的

今回の研究では、これまでの研究で明らかにした病因候補となる 4 個の一次質量ペプチドイオンからペプチドシークエンスタグ法により、透過性因子候補蛋白質を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

我々が先の研究で、SELDI-TOF MS 法により同定した 4 個の一次質量ペプチドイオンから、病因候補蛋白質を同定する。今回の研究では、4 個の一次質量ペプチドイオンのう

ち、M/Z 6626 の同定を行った。

ヒト血清サンプルから、目的とする M/Z を有する分画を、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製した。各精製段階で、SELDI-TOF MS 法により、目的とする M/Z のピークが検出されていることを確認した。最終的に単一成分として分離精製した分画を、タンデムマス分析に供し、目的の蛋白を同定した。

【精製の手順】

陰イオン交換カラムによる分画

陽イオン交換カラムによる分画

逆相 HPLC による分画

順相 HPLC による分画

SELDI-TOF MS による目的とする M/Z の単一ピークの確認

タンデムマス分析による蛋白の同定

4. 研究成果

(結果)

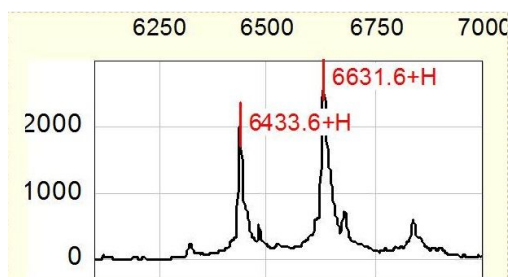
蛋白の同定

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 4 溶出画分に目的ピーク (M/Z 6626) 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。

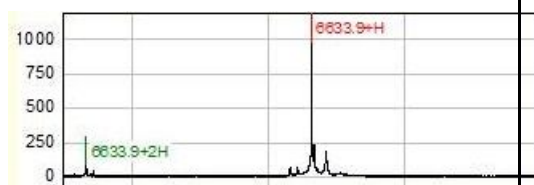
この pH 4 溶出画分を陽イオン交換カラムに添加し、NaCl 濃度を上げて溶出したところ、主に 0.5-1M NaCl 溶出画分に目的ピークを確認した。

陽イオン交換カラム 0.5-1M NaCl 溶出画分のうち、アルブミン含量の低い 0.5M NaCl 画分を逆相 HPLC (2mm column) に供した。各フラクションを SELDI-TOF MS にて分析したところ、目的ピーク m/z

6626 を主にフラクション 32 に確認することができた。同フラクションには m/z 6426 のピークも含まれていたことから、次に逆相 HPLC にてさらなる精製を行った。



逆相 HPLC フラクション 32 を順相 HPLC に供した結果、フラクション 32-32.5 に目的ピークを確認することができた。本条件にて大部分の m/z 6426 ピークを分離することができたが、フラクション 32 に同ピークが含まれていたことから、同フラクションのリクロマトを実施した。その結果、フラクション 31.5 に目的ピークのみを分離分取することができた。



順相 HPLC における 1 回目のフラクション 32.5 とリクロマトのフラクション 31.5 を合わせて精製品とし、SELDI にて純度を確認したところ m/z 2,000 ~ 100,000 の範囲で単一ピークを示した。この結果より、目的ピークを単一成分として分離精製することができたと判断し、同フラクションをタンデムマス 同定用サンプルとした。

タンデムマス分析の結果、同フラクションに含まれるポリペプチドイオンはヒト Apolipoprotein C-1 に由来するものであることが同定された。

Apolipoprotein C1 の実測

ISSNS 患者の血清（ステロイド治療開始前の急性期血清）を用いて、Apolipoprotein

C1 の定量を行った。比較対照として、二次性ネフローゼ症候群を有した患者群を採用した。ISSNS 患者 11 名、二次性ネフローゼ患者 7 名。両群間で年齢、性別、血清アルブミン値、血清総コレステロール値、尿蛋白/Cr 値に有意差はなかった。両群患者の血清を、ELISA kit (Human Apolipoprotein C-1 ELISA Kit, ASSAYPRO) を用いて定量測定した。それぞれ平均値は、 $87.2 \mu\text{g/ml}$ 、 $64.2 \mu\text{g/ml}$ (血清基準値 $40\text{--}70 \mu\text{g/ml}$) であり、ISSNS 群で有意に高値であった ($P < 0.05$)。

(考察)

これまで、Apolipoprotein C1 と ISSNS の病態形成との関連性を示唆した報告はなく、ISSNS 患者で他の Apolipoprotein C 群と同様に上昇するという報告が一つあるのみである (Ohta T, et al. Clin Chim Acta. 1981; 117: 133-43)。今回の我々の研究は、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、Apolipoprotein C1 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い。つまり、ISSNS の病態形成において、腎から大量の蛋白漏出が起こる過程のどこかに Apolipoprotein C1 が何らかの関わりをもつことを示唆しているものと考えられる。

Apolipoprotein C1 は、脂質代謝における重要な調節因子で、コレステロールをエステル化して HDL の合成を促進したり、コレステリルエステル転送蛋白を阻害し組織内への脂肪酸吸収を阻害する。脂質代謝以外の作用として、リポポリサッカライドへの炎症反応を促進し感染防御にもあたっているという報告もある。このように既報では、糸球体の蛋白透過性に影響を及ぼすような作用の報告はないが、今回の研究で得られた知見が Apolipoprotein C1 の新たな働きを示すものかもしれない。いまだ不明である ISSNS の病

態の解明を進めていく上で、この新しい知見が新たな研究の起点となる可能性がある。

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)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

小高 淳、金井孝裕、伊東岳峰、青柳 順、齋藤貴志、中島尚美、山形崇倫、桃井真里子。SELDI-TOF MS 法による、小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群における特異的因子の解析。第115回日本小児科学会学術集会 2012年4月20日 福岡

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

6．研究組織

(1)研究代表者

小高 淳 (Odaka, Jun)

自治医科大学小児科学・講師

研究者番号：70382885

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし