

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790852

研究課題名(和文) 抗糸球体上皮細胞抗体の同定とその障害機序の解明

研究課題名(英文) Anti-podocyte antibodies determination and its mechanisms of podocyte injury

研究代表者

長濱 清隆 (NAGAHAMA, Kiyotaka)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00336538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：MACSを用いて単離した細胞から糸球体上皮細胞の膜蛋白を精製し、SLEモデルマウスおよび対照群のIgGを用いてwestern blottingを行った。結果、100kDa付近にSLEモデルマウスIgGと反応する蛋白があることに注目し、mass spectrometryを施行したところintegrin beta1が自己抗原として同定された。無細胞系蛋白合成システムを利用してマウスintegrin beta1の組換え蛋白を作製し、western blottingにて血中自己抗体の存在を確認し、ELISAにて一過性ながらintegrin beta1に対する自己抗体が上昇していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Surface protein of mouse podocytes was purified and subjected to immunoblotting. The nitrocellulose membranes were incubated with IgG purified from SLE model mice or its control mice. IgG from the model mice, not the control mice, reacted with 110-kD molecule of podocyte surface proteins, then the band was excised to mass spectrometry analysis. Based on molecules revealed by MASS spectrometry and the molecular size, we identified that integrin beta 1 would be a candidate molecule for an autoantigen on podocytes of SLE model mice. Recombinant mouse integrin beta 1 was then generated. Immunoblotting using this recombinant ITGB1 revealed anti-ITGB1 antibody specifically in the SLE model mice. ELISA was also performed to reveal that the antibody started to elevate at two weeks after spleen cell transfer then peaked at 4 weeks. These data strongly suggest that anti-integrin beta 1 antibodies are generated and deposited on the podocytes in the SLE model mice.

研究分野：腎臓内科

科研費の分科・細目：腎臓学

キーワード：糸球体上皮細胞 ループス腎炎 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

SLE は代表的な自己免疫疾患で、抗 dsDNA 抗体をはじめ各種自己抗体が産生され約半数の患者に何らかの腎障害(ループス腎炎)が発症する。ループス腎炎は 2003 年に改訂された ISN/RPS classification[13]に基づいて治療がなされるがこの分類は純形態学的分類であるためより客観的でより正確な予後因子の確立が求められている。

我々は糸球体上皮細胞特異的蛋白質であるネフリンに対する抗体を利用して magnetic activated cell sorting (以下、MACS) を用いて糸球体上皮細胞のみを単離することに成功した。そこで SLE モデルマウス血清より IgG を精製し MACS にて単離した糸球体上皮細胞と反応させ FACS にて解析したところ、モデルマウス血中には抗糸球体上皮細胞抗体が存在することが明らかとなった。さらに、マウス糸球体上皮細胞より膜蛋白を精製し、western blotting にてモデルマウス血中 IgG と反応する蛋白の有無を確認したところ、モデルマウス IgG と反応する複数のバンドを認めた。このうち 110kD 前後の領域を MASS spectrometry にて解析したところ integrin 1 鎖を含む複数の膜蛋白が検出された。

Integrin は細胞接着分子の 1 つで、鎖および鎖からなる heterodimer を形成する膜貫通型蛋白質であり糸球体上皮細胞には 3 1 integrin が発現し係蹄基底膜の laminin-10 および-11 と結合している[10]。このことから糸球体上皮細胞障害の機序としては、抗体による integrin 1 が障害されることによる糸球体上皮細胞の接着能障害に由来するスリット膜の障害が最も考えやすい。一方、原発性膜性腎症における自己抗体のターゲットである M-type PLA2R に関しては Augert らが活性酸素、活性酸素や DNA 障害、p53 を介した senescence の誘導を報告している点が興味深く、自己抗体の agonistic な作用による細胞内シグナル伝達経路活性化の存在が推察される。PLA2R と同様に Integrin 鎖シグナル伝達分子としての性格も有していることから、自己抗体による接着能障害に加えて何らかの細胞内シグナル経路活性化が糸球体上皮細胞の機能障害に関与している可能性を考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究計画では SLE モデルマウスを用いて、まず蛋白尿発症に関与する抗糸球体上皮細胞抗体を明らかにし、続いてその抗体による糸球体上皮細胞障害の機序を明らかにする。

3. 研究の方法

A. 抗 Integrin 1 鎖抗体に対する ELISA 法の確立と抗体価の測定

HEK293 等の哺乳類由来培養細胞、あるいは

は大腸菌等を用い Integrin 1 鎖の細胞外ドメインのリコンビナント蛋白を作製し 96 穴プレートを用いた sandwich ELISA 法を確立する。経時的に採取したモデルマウス血清を用いて抗 Integrin 1 鎖抗体価を測定し抗体価の推移とマウス腎組織との間の相関性について検討する。また、モデルマウス腎臓から凍結切片を作製し、市販の抗 Integrin 1 鎖抗体を用いて糸球体上に沈着する抗原抗体複合体の有無を検討する。

B. 糸球体上皮細胞培養細胞を用いた検討

SV40 を導入した Immortomouse から MACS を用いて糸球体上皮細胞を単離し、コーゲンコート済みディッシュ上で培養することで不死化型糸球体上皮細胞の培養株を作製する。MACS による単離は従来法と異なり、数時間という短時間でできるため in vivo の状態に近い糸球体上皮細胞を得られるのが特徴で、Integrin 1 鎖を含め蛋白質の発現もよく保たれているものと考えられる。この培養細胞に抗 Integrin 1 鎖抗体がどのような作用を示すのか、分子生物学的に検討する。

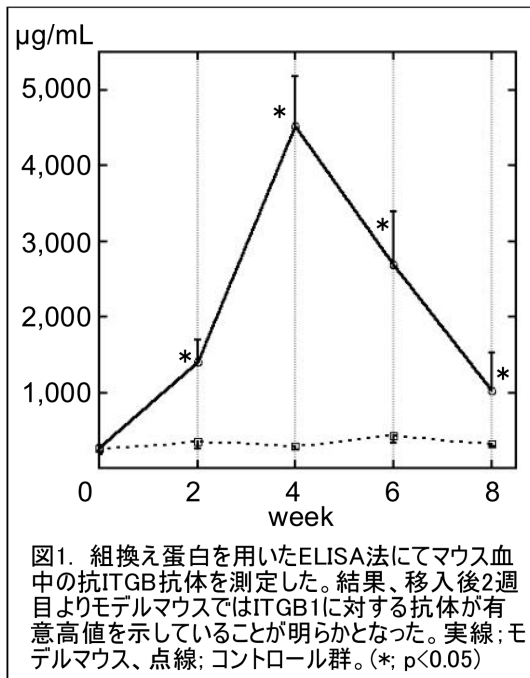
4. 研究成果

(1) 小麦胚芽を用いた無細胞タンパク質合成技術を用いてマウス integrin 1 の組換えタンパク質の作製に成功し、ELISA による自己抗体価の測定系を確立した。

(2) ループス腎炎モデルマウスの血清を用いた western blot および ELISA を施行したところ、脾細胞移入後 2 週目から integrin 1 に対する自己抗体が出現し、4 週目を peak として以降漸減傾向を示した。

(3) 病理組織学的にはループス腎炎モデルマウスにおいて、糸球体上皮細胞上の integrin 1 に IgG が沈着しているのを確認した。(図 1)

(4) Immortomouse から糸球体上皮細胞を単離し、不死化型糸球体上皮細胞株の樹立に成功した。今後、この細胞株に対して抗 integrin 1 抗体がどのような作用を及ぼすのか検討を行う予定である。



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 11 件)

Ishiguro H, Hashimoto T, Akata M, Suzuki S, Azushima K, Kobayashi Y, Kanaoka T, Yoshida S, Wakui H, Oshikawa J, Nagahama K, Inayama Y, Tamura K, Toya Y, Umemura S. Rituximab treatment for adult purpura nephritis with nephrotic syndrome. Intern Med 2013;52(10):1079-83. 査読有

https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/52/10/52_52.9325/article

Nagahama K, Yamanaka S, Nakayama T, Tokinaga A, Asai-Sato M, Miyagi E, Tanaka R, Furuya M. A case of synchronous mucinous metaplasia and neoplasia of the female genital tract without an STK11 or KRAS mutation. Gynecol Oncol Case Rep 2013;5:4-5. 査読有

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3862322/>

Oshio M, Fujii T, Kusaura T, Nagahama K. Relapsing proliferative glomerulonephritis with monoclonal IgG deposits showing circumferential crescentic glomerulonephritis. Clinical Kidney Journal 2013;6(6):635-8. 査読有

<http://ckj.oxfordjournals.org/content/6/6/635.full?sid=3808ae2b-ee19-4a7e-a783-3d971c41f495>

Wakui H, Tamura K, Masuda S, Tsurumi-Ikeya Y, Fujita M, Maeda A,

Ohsawa M, Azushima K, Uneda K, Matsuda M, Kitamura K, Uchida S, Toya Y, Kobori H, Nagahama K, Yamashita A, Umemura S. Enhanced angiotensin receptor-associated protein in renal tubule suppresses angiotensin-dependent hypertension. Hypertension 2013;61(6):1203-10. 査読有

doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00572.

Yoshioka W, Mori T, Nagahama K, Tamura T. Biopsy-proven drug-induced tubulointerstitial nephritis in a patient with acute kidney injury and alcoholic severe acute pancreatitis. BMJ Case Rep 2013;3:1-4. 査読有

doi: 10.1136/bcr-2013-008557.

Furuya M, Tanaka R, Koga S, Yatabe Y, Gotoda H, Takagi S, Hsu YH, Fujii T, Okada A, Kuroda N, Moritani S, Mizuno H, Nagashima Y, Nagahama K, Hiroshima K, Yoshino I, Nomura F, Aoki I, Nakatani Y. Pulmonary cysts of Birt-Hogg-Dubé syndrome: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 9 families. Am J Surg Pathol 2012;36(4):589-600. 査読有

doi: 10.1097/PAS.0b013e3182475240.

Furuya M, Tanaka R, Miyagi E, Kami D, Nagahama K, Miyagi Y, Nagashima Y, Hirahara F, Inayama Y, Aoki I. Impaired CXCL4 expression in tumor-associated macrophages (TAMs) of ovarian cancers arising in endometriosis. Cancer Biol Ther 2012;13(8):671-80. 査読有

DOI: 10.4161/cbt.20084.

Iwai T, Baba J, Murata S, Mitsudo K, Maegawa J, Nagahama K, Tohnai I. Warthin tumor arising from the minor salivary gland. J Craniofac Surg 2012;23(5):e374-6. 査読有

DOI: 10.1097/SCS.0b013e318254359f.

Kobayashi N, Uemura H, Nagahama K, Okudela K, Furuya M, Ino Y, Ito Y, Hirano H, Inayama Y, Aoki I, Nagashima Y, Kubota Y, Ishiguro H. Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer. Oncotarget 2012;3(11):1455-71. 査読有

DOI: 10.1097/PAS.0b013e3182475240.

Nishida A, Nagahama K, Imaeda H, Ogawa A, Lau CW, Kobayashi T, Hisamatsu T, Preffer FI, Mizoguchi E, Ikeuchi H, Hibi T, Fukuda M, Andoh A, Blumberg RS, Mizoguchi A. Inducible

colitis-associated glycome capable of stimulating the proliferation of memory CD4+ T cells. J Exp Med 2012;209(13):2383-94. 査読有
DOI: doi: 10.1084/jem.20112631.
Takahashi D, Nagahama K, Tsuura Y, Tanaka H, Tamura T. Sunitinib-induced nephrotic syndrome and irreversible renal dysfunction. Clin Exp Nephrol 2012;16(2):310-5. 査読有
DOI: 10.1007/s10157-011-0543-9.

〔学会発表〕(計 4 件)

長瀆清隆, 古屋充子, 山中正二, 長嶋洋治, 青木一郎. SLE モデルマウスには integrin 1 に対する自己抗体が存在する. 第 56 回日本腎臓学会総会 2013.5.12 (日) 東京国際フォーラム、東京.

長瀆清隆, 中山崇, 山中正二, 古屋充子. Synchronous and multifocal mucinous lesions involving the female genital tract の一例. 第 101 回日本病理学会総会 2012.4.28(土)京王プラザ、東京.

長瀆清隆. 全身性エリテマトーデスの経過中に急性腎不全を発症し HUS/TTP か CNI 腎症の鑑別が困難であった 1 例. 第 55 回日本腎臓学会総会 2012.6.2 (土) パシフィコ横浜、横浜.

萬代新太郎, 安藝昇太, 稲葉直人, 青柳誠, 田中啓之, 長瀆清隆, 津浦幸夫, 田村禎一. MRSA 感染を契機に発症しネフローゼを呈した Henoch-Schonlein 紫斑病に対しシクロスポリンが奏功した 1 例. 第 42 回日本腎臓学会東部学術集会 2012.10.14(日) 朱鷺メッセ、新潟.

〔図書〕(計 1 件)

長瀆清隆 他 南山堂、臨床腎臓内科学、2013 p.356-365

〔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〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長瀆清隆 (NAGAHAMA Kiyotaka)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：

00336538

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：