

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670411

研究課題名(和文)コムギ胚芽無細胞蛋白質合成によるIgG4関連腎疾患の抗原同定と腎病理形態の解析

研究課題名(英文) Identification of antigens in IgG4-related kidney diseases by wheat germ-free protein synthesis system

研究代表者

増本 純也 (Masumoto, Junya)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：20334914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Helicobacter pylori株(SS1)、Porphyromonas gingivalis株(RDB6613)、ヒトB細胞白血病細胞株(Raji)からのコムギ胚芽無細胞蛋白質合成を行った。ビオチン化したこれらの蛋白質をプローブにして、生検組織中で膜性腎症、間質性腎炎、その他の症例の蛍光染色を行い、病理組織学的解析を行った。その結果、IgGの蛍光抗体法の結果と重複するいくつかの候補を得ることができた。現在この現象が他の症例でも共通にみられるか解析中である。また、その他のIgG4関連疾患との関係について研究を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：Biotinylated protein syntheses from Helicobacter pylori, Porphyromonas gingivalis, and human B-cell lymphoma cell line Raji cells were performed by wheat germ cell-free protein synthesis system. Using these proteins as probes, immunofluorescence staining was performed using biopsy specimens in cases of membranous glomerulonephropathy, interstitial nephritis, and normal control. The fluorescence signal was overlapped with IgG fluorescence signal in some cases. Now the study about that these observations can be seen in other cases is going on.

研究分野：病理学

キーワード：膜性腎症 腎生検 病理

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患は、血清中の IgG4 の高値と諸臓器への著明な IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とする疾患である。時間的・空間的な多発性により全身の臓器に多様な病変をきたす疾患と考えられている。腎においても、尿細管間質性腎炎や膜性腎症などの病変を IgG4 関連疾患というあらたな視点で見直してみると、IgG4 陽性形質細胞浸潤と線維化の著明な症例が存在し、間質のはなむしろ状の線維化などの病理組織学的な特徴を有していることが明らかになっている。しかし、この IgG4 関連疾患発症のメカニズムは未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究は、先行する感染症の細菌やウイルス成分が抗原となり、自己抗原と交差することが IgG4 関連疾患の本態であるという仮説を検証することを目的とする。腎生検による蛍光抗体などの知見の豊富な IgG4 関連腎病変に焦点を絞り、患者さんの血清中に含まれる IgG4 の抗原を、無細胞蛋白質合成による細菌蛋白質ライブラリーを網羅的にスクリーニングすることで同定する。同時に病理組織像と比較検討し、IgG4 関連腎病変の病態の解明を目指すと同時に、この成果を足がかりとして IgG4 関連疾患の全貌に迫る。

3. 研究の方法

plasminogen binding protein に対する抗体が報告されているピロリ菌株 (SS1) の他に、歯周病に関与するジンジバリス菌 (RDB12257)、ヒトへの持続感染が認められている EB ウィルス感染細胞などの mRNA を抽出し、polyT-primer で逆転写反応を行い、5' RACE により完全長 cDNA を合成し、コムギ無細胞蛋白質合成ベクタープラスミドに組み込んだのち、大腸菌にトランスフォームし、無細胞蛋白質合成による蛋白質ライブラリーを作成する。これらの蛋白質をビオチン化したのち、これをバイトにして、腎組織標本の免疫組織化学による蛍光抗体染色を行い、抗原蛋白質候補を選定する。候補蛋白質の鋳型 DNA の配列を決定し、候補となった抗原蛋白質を無細胞蛋白質合成技術により大量合成ビオチン化した後、これをプローブとして、他の腎生検組織中で IgG4 沈着の認められる症例と間質への IgG4 陽性形質細胞浸潤と線維化の認められる症例の蛍光染色などの、病理組織学的解析を行う。

4. 研究成果

いくつかの蛋白質を候補抗原として同定し、ビオチン化修飾して、膜性腎症疾患のパラフィンブロックを用いた蛍光染色の再現実験を行っている。現在 IgG 蛍光抗体法による染色の沈着部位に一致したシグナルを得るものについて、解析を進めている (図 1)。

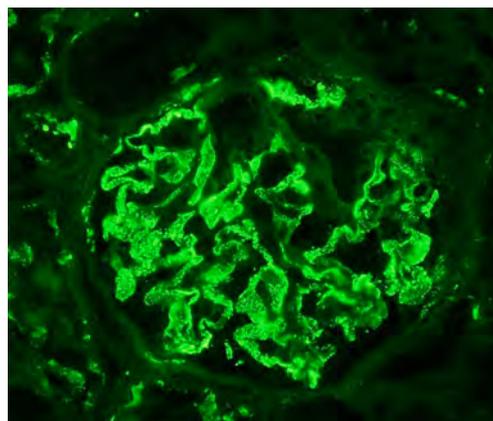


図 1. 膜性腎症の IgG 蛍光抗体法による染色

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 17 件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

- ① Ito Y, Kaneko N, Iwasaki T, Morikawa S, Masumoto J. IL-1 as a target in inflammation. *Endocr Metab Immune Disord Drug Target*: in press (2015) 査読あり
- ② Mokuda S, Miyazaki T, Ito Y, Yamasaki S, Inoue H, Guo Y, Kong WS, Kanno M, Takasugi K, Sugiyama E, Masumoto J. The proto-oncogene survivin splice variant 2B is induced by PDGF and leads to cell proliferation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Sci Rep* 5: 9795 (2015) doi: 10.1038/srep09795. 査読あり
- ③ Yasunami M, Nakamura H, Agematsu K, Nakamura A, Yazaki M, Kishida D, Yachie A, Toma T, Masumoto J, Ida H, Koga T, Kawakami A, Eguchi K, Furukawa H, Nakamura T, Nakamura M, Migita K. Identification of Disease-Promoting HLA Class I and Protective Class II Modifiers in Japanese Patients with Familial Mediterranean Fever. *PLoS One* 10: e0125938 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0125938. eCollection 2015. 査読あり
- ④ Migita K, Izumi Y, Fujikawa K, Agematsu K, Masumoto J, Jiuchi Y, Kozuru H, Nonaka F, Shimizu T, Nakamura T, Iwanaga N, Furukawa

- H, Yasunami M, Kawakami A, Eguchi K. Dysregulated mature IL-18 production in familial Mediterranean fever. *Rheumatology (Oxford)* 54: 660-665 (2015) doi: 10.1093/rheumatology/keu359. 査読あり
- ⑤ Yamazaki T, Shigemura T, Kobayashi N, Honda K, Yazaki M, Masumoto J, Migita K, Agematsu K. IL-18 serum concentration is markedly elevated in typical familial Mediterranean fever with M694I mutation and can distinguish it from atypical type. *Mod Rheumatol* 25: 166-168 (2015) 査読あり
- ⑥ Mokuda S, Kanno M, Takasugi K, Okumura C, Ito Y, Masumoto J. Tocilizumab improved clinical symptoms of a patient with systemic tophaceous gout who had symmetric polyarthritis and fever: An alternative treatment by blockade of interleukin-6 signaling. *SAGE Open Medical Case Reports* 2: 2050313X13519774 (2014) 査読あり
- ⑦ Sugiyama R, Agematsu K, Migita K, Nakayama J, Mokuda S, Ogura F, Haraikawa K, Okumura C, Suehiro S, Morikawa S, Ito Y, Masumoto J. Defect of suppression of inflammasome-independent interleukin-8 secretion from SW982 synovial sarcoma cells by familial Mediterranean fever-derived pyrin mutations. *Mol Biol Rep* 41: 545-553 (2014) 査読あり
- ⑧ Mokuda S, Miyazaki T, Saeki Y, Masumoto J, Kanno M, Takasugi K. Epstein-Barr virus-related MTX-LPD in rheumatoid arthritis patients exhibits a viral pattern of the CD64 and CD35 expression on neutrophils: Three case reports. *Mod Rheumatol* 25: 166-168 (2014) 査読あり
- ⑨ Kurata M, Nose M, Shimazu Y, Aoba T, Kohada Y, Yorioka S, Suehiro S, Fukuoka E, Matsumoto S, Watanabe H, Kumon Y, Okura T, Higaki J, Masumoto J. Microvasculature of carotid atheromatous plaques: hemorrhagic plaques have dense microvessels with fenestrations to the arterial lumen. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 23: 1440-1446 (2014) 査読あり
- ⑩ Migita K, Agematsu K, Yazaki M, Nonaka F, Nakamura A, Toma T, Kishida D, Uehara R, Nakamura Y, Jiuchi Y, Masumoto J, Furukawa H, Ida H, Terai C, Nakashima Y, Kawakami A, Nakamura T, Eguchi K, Yasunami M, Yachie A. Familial Mediterranean fever: genotype-phenotype correlations in Japanese patients. *Medicine (Baltimore)* 93: 158-164 (2014) 査読あり
- ⑪ Migita K, Izumi Y, Jiuchi Y, Kozuru H, Kawahara C, Nakamura M, Nakamura T, Agematsu K, Masumoto J, Yasunami M, Kawakami A, Eguchi K. Serum amyloid A induces NLRP-3-mediated IL-18 secretion in neutrophils. *PLoS One* 9: e96703 (2014) 査読あり
- ⑫ Okumura C, Haraikawa K, Suehiro S, Ito Y, Masumoto J. The inflammasome. *Nihon Rinsho* 71: 1497-1504 (2014) 査読あり
- ⑬ Watanabe T, Maruyama M, Ito T, Fujinaga Y, Ozaki Y, Maruyama M, Kodama R, Muraki T, Hamano H, Arakura N, Kadoya M, Suzuki S, Komatsu M, Shimojo H, Notohara K, Uchida M, Kawa S. Clinical features of a new disease concept, IgG4-related thyroiditis. *Scand J Rheumatol* 42: 325-330 (2014) 査読あり
- ⑭ Uehara T, Hamano H, Suga T, Kawa S, Yoshizawa A, Kobayashi Y, Murata K, Oki K, Sano K, Onodera R, Ota H. Inflammation of colon adenoma in the setting of type 1 autoimmune pancreatitis. *Pathol Int* 64: 67-74 (2014) doi: 10.1111/pin.12139. 査読あり
- ⑮ Uehara T, Masumoto J, Yoshizawa A, Kobayashi Y, Hamano H, Kawa S, Oki K, Oikawa N, Honda T, Ota H. IgG4-related disease-like fibrosis as an indicator of IgG4-related lymphadenopathy. *Ann Diagn Pathol* 17: 416-420 (2013) 査読あり
- ⑯ Migita K, Agematsu K, Masumoto J, Ida H, Honda S, Jiuchi Y, Izumi Y, Maeda Y, Uehara R, Nakamura Y, Koga T, Kawakami A, Nakashima M, Fujieda Y, Nonaka F, Eguchi K,

Furukawa H, Nakamura T, Nakamura M, Yasunami M. The contribution of SAA1 polymorphisms to Familial Mediterranean fever susceptibility in the Japanese population. PLoS One 8: e55227 (2013) 査読あり

- ⑦ Higa N, Toma C, Koizumi Y, Nakasone N, Nohara T, Masumoto J, Kodama T, Iida T, Suzuki T. Vibrio parahaemolyticus effector proteins suppress inflammasome activation by interfering with host autophagy signaling. PLoS Pathog 9: e1003142 (2013) 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

- ① Masumoto J. Defect of suppression of inflammasome-independent interleukin-8 secretion from sw982 synovial sarcoma cells by familial mediterranean fever-derived pyrin mutations, 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Plagh, October 2014
- ② 原井川果歩, 奥村力, 小倉史也, 岡本唯, 土居千晃, 久野優人, 村上圭樹, 伊藤有紀, 宮崎龍彦, 増本純也 全身性エリテマトーデス患者におけるカスパーゼ 1 の発現について 第 102 回日本病理学会総会、2013 年 6 月 6 日～2013 年 6 月 8 日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館 (北海道札幌市)
- ③ 森川紳之祐, 末広聡美, 原井川果歩, 大竹晶彦, 伊藤有紀, 宮崎 龍彦, 増本純也 全身性エリテマトーデス患者におけるインターロイキン 1 β の発現 第 102 回日本病理学会総会、2013 年 6 月 6 日～2013 年 6 月 8 日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館 (北海道札幌市)
- ④ 末広聡美, 原井川果歩, 森川紳之祐, 土居千晶, 伊藤有紀, 宮崎龍彦, 増本純也 全身性エリテマトーデスにおける ASC の発現 第 102 回日本病理学会総会、2013 年 6 月 6 日～2013 年 6 月 8 日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館 (北海道札幌市)
- ⑤ 増本純也 自己炎症疾患とインフラマソーム 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (招待講演)、2013 年 04 月 18 日～2013 年 04 月 20 日、京都国際会館 (京都府京都市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

①名称: クラスリン結合性ペプチド誘導体
発明者: 宮川眞一、清水明、北原弘恵、増本純也
権利者: 国立大学法人信州大学
種類: 特許
番号: 5493714
出願年月日: 2009 年 10 月 30 日
取得年月日: 2014 年 3 月 24 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増本 純也 (Matsumoto Junya)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・
教授
研究者番号: 20334914

(2) 研究分担者

上原 剛 (Uehara Takeshi)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号: 80402121

下条 久志 (Shimojo Hisashi)
信州大学・医学部・講師
研究者番号: 40324248