

メタボロームとプロテオームの融合解析による 糸球体硬化の病態解明と創薬化研究

楊 國昌¹ 秋 元 義 弘² 福 富 俊 之³ 西 堀 由 紀 野¹

¹杏林大学医学部小児科学

²杏林大学医学部解剖学

³杏林大学医学部薬理学

【目的】

糸球体硬化症は多彩な糸球体疾患の終末像であり、根治療法が無いまま末期腎不全に至る国民病である。本症の治療としての根治薬や増悪軽減薬の創薬は、医療経済に多大な貢献をする。しかし、抗糸球体硬化薬の創薬化の鍵となる硬化病変の形成過程そのものが、現在も未解明である。本研究の最終的な目的は、糸球体硬化に至るまでの経時的糸球体を材料に、定量的メタボロミクスとプロテオミクスの融合解析を網羅的に行うことにより、糸球体硬化の起点的な特異代謝経路とその産物群、障害タンパク分子群を同定することである。今回は、まずプロテオーム解析について、糸球体硬化腎症モデルマウスの糸球体を材料に質量解析を行うことで、材料採取法と試料量の整合性、質量解析の感度と精度を検定することとした。

【方法】

糸球体硬化症モデルとして、従来から頻用されているアドリアマイシン単回静注マウスを用いた。8週齢のC57/BL雄マウスに、アドリアマイシン(10mg/kg)を尾静脈から静注し、5日後、7日後および14日後のマウスの各群5匹から腎を摘出し、そのうち3匹の腎から磁気ビーズ法を用いて糸球体を単離した。3匹分の試料を一括して試料とした。これを材料に、高速液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析計を構成とした質量解析(LC-MS/MS解析)で、プロテオームによるタンパク分子群の定量化を行い、生理食塩水静注マウス群3匹分と比較した。各試料は、可溶化後トリプシンで消化させ、ナノ流量の高速液体クロマトグラフを用いて逆相系で分

離した。同定の高感度化のために、イオン化はナノスプレーを使用した。差異解析はアイソバリックタグを使用し、検索エンジンはMASCOT(Matrix Science社)とMaxQuant(Nature Biotechnology 26, 1367, 2008)を使用した。また、尿蛋白の推移については、アドリアマイシン静注直前から静注14日後まで経時的に測定した。腎組織障害の程度については、各病期の腎切片を用いたPAS染色で検討した。プロテオーム解析で得られた代表的分子について、蛍光抗体法による免疫組織化学で、腎組織内での発現変化と局在を確認した。

【結果】

尿を材料とした試験紙法とタンパク電気泳動の結果から、アドリアマイシン静注4日後から有意なタンパク尿が出現することが判明した(図1)。また、PAS染色により、35日後の糸球体から明かな糸球体硬化病変が同定

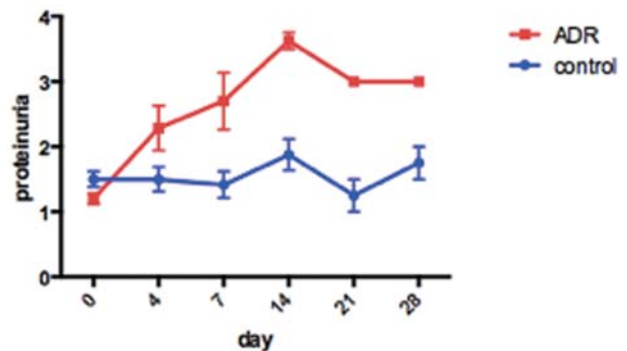


図1 アドリアマイシンによる尿蛋白の推移

表1 アドリアマイシン腎症で発現増加がみられた分子群

Accession	Increase	Day5	Day7	Day14
		ADR/生食	ADR/生食	ADR/生食
Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain OS=Mus musculus GN	4.005	6.898	2.218
Q8K0E8	Fibrinogen beta chain OS=Mus musculus GN	2.918	6.627	2.567
P02535	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Mus musculus GN	4.362	3.279	
P07759	Serine protease inhibitor A3K OS=Mus musculus GN	6.496	2.773	
P41317	Mannose-binding protein C OS=Mus musculus GN	3.764	2.377	
P07724	Serum albumin OS=Mus musculus GN	1.974	1.995	2.858
P01900	H-2 class I histocompatibility antigen, D-D alpha chain OS=Mus musculus GN	1.782	1.825	2.478
P01902	H-2 class I histocompatibility antigen, K-D alpha chain OS=Mus musculus GN	2.182	1.723	1.573
P37804	Transgelin OS=Mus musculus GN	2.027	1.676	1.429

表2 アドリアマイシン腎症で発現減少がみられた分子群

Accession	Decrease	Day5	Day7	Day14
		ADR/生食	ADR/生食	ADR/生食
Q8CGP6	Histone H2A type 1-H OS=Mus musculus GN	0.548	0.305	1.024
Q4LFA9	Semaphorin-3G OS=Mus musculus GN	0.566	0.329	0.706
Q9CWG9	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 2 OS=Mus musculus	0.691	0.502	0.921
P52795	Ephrin-B1 OS=Mus musculus GN	0.664	0.528	0.642
P59808	SAM and SH3 domain-containing protein 1 OS=Mus musculus GN	0.737	0.553	
Q9D735	Uncharacterized protein C19orf43 homolog OS=Mus musculus PE	0.747	0.564	0.946
Q80W68	Kin of IRRE-like protein 1 OS=Mus musculus GN	0.735	0.576	0.794
Q91W69	Epsin-3 OS=Mus musculus GN	0.657	0.603	0.825
Q61085	Rhophilin-1 OS=Mus musculus GN	0.661	0.605	0.630
Q08857	Platelet glycoprotein 4 OS=Mus musculus GN	0.701	0.609	0.858
Q9QZ57	Nephrin OS=Mus musculus GN	0.724	0.639	0.779
P54227	Stathmin OS=Mus musculus GN	0.724	0.651	0.918

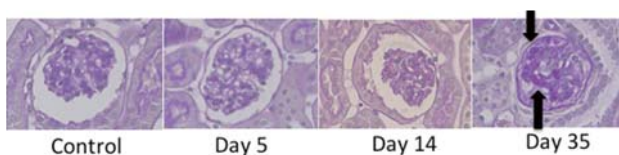


図2 糸球体硬化病変の推移

でき、その出現比率は、平均約10%であった(図2)。このことから、静注5日後、7日後、14日後の糸球体は、光顕上は微小変化ではあるが、確かに硬化病変への過程にあることが確認された。そこで、各病期の糸球体試料を用いた質量解析を行った。その結果、アドリアマイシン腎症群からの各糸球体(静注5日後、7日後および14日後)試料において、生食群に比して有意な発現の変動があった分子群をスクリーニングした。高発現がみられた分子群は、Fibrinogen gamma chain, Fibrinogen beta chain, Serine protease inhibitor, Mannose-binding protein C, Transgelinであった(表1)。一方、約50%以下の発現はSemaphorin-3G, Ephrin-B1, Epsin-3, Rhophilin-1などであった(表2)。この中で高発現がみられたTransgelinについて、免疫組織化学的に腎組織での発現を比較した。図3に示すように、Transgelinは尿蛋白出現翌日である静注5日後で、すでに糸球体上皮に強い発現が観察され、以後もその強発現は持続していた(図3)。

【考 察】

本研究において判明したことは以下である。1) 本プロテオーム解析には、マウス3匹からの計6個の腎を用いた磁気ビーズ法による単離糸球体が、タンパク試料として十分に解析可能である。2) 本系統マウスは、アド

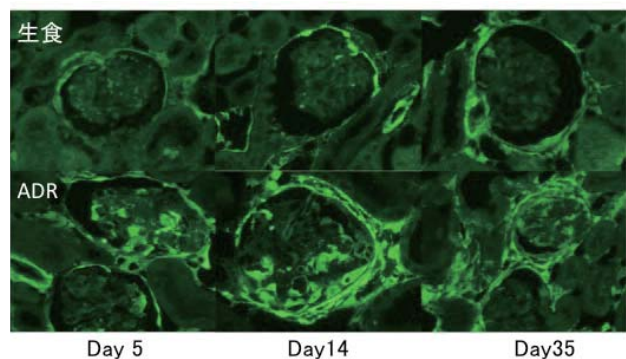


図3 Transgelinの発現の推移

リアマイシン静注4日後からタンパク尿が惹起され、35日後には、確かに糸球体硬化に移行した。したがって、今回の静注5日後、7日後、14日後の糸球体は明らかに糸球体硬化病変への移行過程にあり、これらをプロテオーム解析の試料として使用することは整合性のある方法である。3) 質量解析で高発現がみられたTransgelinは、確かに免疫組織化学的解析でも確認されたことから、本メタボローム解析の手法における正確性が証明された。

今回、腎症モデルにおいて高発現が観察されたTransgelinは、22-kDaのアクチン結合タンパクであるが、その分子機能は未だ不明である。そのタンパク発現は、線維芽細胞や平滑筋細胞で高いことが報告されている。一方、その発現低下は、細胞の形質転換に先立って起きる sensitive marker として推測されている。糸球体硬化病変の成り立ちは未だ不明であるが、糸球体上皮における上皮間葉転換/移行(Epithelial-Mesenchymal Transition/Transition: EMT)が主病態であることは明らかに

されつつある。したがって、Transgelinは硬化病変の病態に深く関与する分子の可能性が高い。今後は、同モデルの糸球体を用いたメタボローム解析を行い、今回のプロテオーム解析の結果と照合することで、糸球体硬化の起点的な特異代謝経路を同定する予定である。

口演

- 1) 西堀由紀野, 高橋昌兵, 秋元義弘, 福富俊之, 楊 國昌。
プロテオーム解析による糸球体硬化の病態解明。第50回
日本小児腎臓病学会, 神戸, 平成27年6月19日。