

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

小島 茂樹

専攻分野：内科学

コース：腎臓・高血圧内科

指導教授：木村 健二郎

主論文の題目：

Proteomic Analysis of Whole Glomeruli in Patients with IgA Nephropathy Using Microsieving

(マイクロシービング法を用いた IgA 腎症患者由来糸球体蛋白質のプロテオミクス解析)

共著者：

Kenichiro Koitabashi, Nobuko Iizuka, Kazuki Okamoto, Mitsumi Arito, Toshiyuki Sato, Manae S. Kurokawa, Naoya Suematsu, Yugo Shibagaki, Takashi Yasuda, Kenjiro Kimura, Tomohiro Kato

緒言

IgA 腎症 (IgAN) は本邦で最も多い慢性糸球体腎炎である。病理学的には、糸球体メサンギウム領域への IgA 沈着とメサンギウム細胞の増殖および基質の増大が特徴であるが、病因は未だ不明である。その解明の為、我々は、以前に確立した経皮的針腎生検検体から糸球体のみを単離しうるマイクロシービング法を用いて、IgAN における糸球体蛋白質プロファイルを検討した。

方法・対象

IgAN 患者 5 例、および対照群として微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) 患者 5 例の針腎生検検体より、それぞれマイクロシービング法にて糸球体を単離した。単離糸球体より蛋白質を抽出し、蛍光標識 2 次元ディファレンシャルゲル電気泳動解析システム (2D-DIGE) にて 2 次

元に展開し、比較した。2群間で発現量に有意差のある蛋白質スポットの中で、発現強度比が±1.5倍以上異なったものを選出し、質量分析器を用いて蛋白質を同定した。この際、統計学的有意差についてはスチューデントの t 検定を用い、 $p < 0.05$  で有意差ありと設定した。同定した蛋白質の一つについてウェスタンブロット、RT-PCR、免疫組織化学染色法による解析を行った。

本研究は、すべて聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会の承認第 542 号を得ている。

## 結果

2D-DIGE により計 1170 個の蛋白質スポットが得られ、そのうち IgAN 群で MCNS 群と比較して有意差をもって発現強度の異なるスポットは 72 個だった ( $p < 0.05$ )。さらに、IgAN 群で MCNS 群と比較して、発現強度が 1.5 倍以上に増加したスポットが 22 個、 $1/1.5$  倍以下に減少したスポットが 12 個検出された。これらのスポット (計 34 個) を質量分析し、16 スポットの蛋白質を同定しえた。同定した蛋白質には、糸球体上皮細胞骨格形成蛋白質やクレアチン代謝に関与する蛋白質、抗アポトーシス作用に関与する蛋白質などが含まれていたが、外来由来の蛋白質は含まれていなかった。その中で、IgAN 群で発現量が 2.5 倍以上に増加していた  $\alpha$  アクチニン 4 (ACTN4) に注目した。今回検出された ACTN4 の分子量は 77 kD (低分子 ACTN4) であり、理論値の 104.8 kD よりも小さかったことから、選択的スプライシングや蛋白質分解による低分子 ACTN4 生成の機序を検討した。ACTN4 の選択的スプライシングの有無を検証するため、ACTN4-mRNA を 5 領域に分け RT-PCR で増幅したが、選択的スプライシングを示唆する短い DNA は検出されなかった。次に、ACTN4 分解・切断による低分子化を検証するため、3 種の抗 ACTN4 抗体 (認識アミノ酸部位: 2~11AA、199~228AA、792~821AA) を用いてウェスタンブロットを行った結果、IgAN 由来低分子 ACTN4 は、N 末端 (2~11AA)

を認識する抗体に反応しなかった。以上より、IgAN で増加がみられた低分子 ACTN4 は N 末端部分が欠落していると結論された。

IgAN における ACTN4 の局在を確認するため、低分子 ACTN4 も認識する抗 ACTN4 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、MCNS や健常コントロールに比して IgAN 患者の検体では糸球体毛細血管壁に沿って染色性が増強していた。

## 考察

本研究で同定された蛋白質には IgAN で糸球体に沈着することが証明されている IgA や補体 C3 が含まれており、マイクロシービング法とプロテオミクスを組み合わせた実験方法の妥当性が証明された。一方、IgAN 発症に外来抗原が関与するとの報告もあるが、今回の結果ではウイルスや細菌などの外来タンパク質は同定されなかった。

IgAN で発現増加が認められた ACTN4 は細胞骨格蛋白質の一つである。ACTN4 は通常、腎臓では糸球体上皮細胞の足突起に多く発現している。その機能は細胞骨格形成のみならず、シグナル伝達にも関与しており、糸球体濾過機能の維持に重要な蛋白質である。家族性巣状分節性糸球体硬化症でのスプライシングバリエーションやループス腎炎における ACTN4 の抗原性などの報告がある。本研究で同定された ACTN4 は翻訳後に N 末端側の約 30 kDa が除去されたものと推測された。ニワトリでは、ACTN の N 末端側 31 kDa フラグメントが単球/マクロファージ成熟に関与するとの報告があり、今回同定された ACTN4 の N 末端側のフラグメントが生物学的活性を有している可能性も考えられ、今後の研究課題としたい。

## 結論

マイクロシービング法を用いて IgAN と MCNS 患者の経皮的針腎生検検体から糸球体を単離し、プロテオーム解析を行うことに成功した。特に、低分子 ACTN4 の増加が判明した。IgAN 解明の一助となると考えている。

