

---

# ヒト糸球体の病態マイクロトランスクリプトームとマイクロプロテオーム解析

---

(17390247)

平成 17 年度～平成 19 年度科学研究費補助金  
(基盤研究(B))  
研究成果報告書

新潟大学附属図書館



2080002919

平成 20 年 3 月

研究代表者 山本 格  
新潟大学 医歯学系 教授

## はしがき

進行して腎機能が喪失する末期慢性腎不全に至る疾患はこれまでIgA 腎症を主とする慢性(糸球体)腎炎、糖尿病性腎症、腎硬化症などであるとされてきた。これらの疾患の治療は早期に病気を発見し、その進行悪化要因である高血圧や生活習慣などを改善する対症療法といった治療法しかないのが現状である。そのため、これらの病気は進行し、最終的には透析療法か腎移植を余儀なくされている病気である。

現在、透析療法を受けている患者さんの数は26万人ほどで、この数は毎年約1万人ずつ増加している。この増加はこれらの疾患の進行を阻止する有効な治療法が無いことを示している。そのため、透析療法に使われる医療費も増加し、現在、国民総医療費の3～5%を占め、世界的にも同様で、医療社会問題ともなりつつある。

近年、蛋白尿など腎臓障害が明らかであるか、または、糸球体濾過値が  $60 \text{ ml/min/1.73 cm}^2$  以下が3ヶ月以上続いている病気を慢性腎臓病と定義することになった。このように定義することで、これまで、進行してから初めて診断されていたIgA 腎症を主とする慢性(糸球体)腎炎、糖尿病性腎症、腎硬化症などを早期に慢性腎臓病として発見、把握し、高血圧や生活習慣などを改善することにより、その進行を阻止しようとするのが開始されている。驚くことにこのように慢性腎臓病を定義すると日本では実に成人の約20%が該当し、糸球体濾過値を  $50 \text{ ml/min/1.73 cm}^2$  以下と定義しても、成人の約5%が該当すると予想されているのである(1)。こうして定義される慢性腎臓病は進行して透析療法は腎臓移植が必要となる危険性が高いこと、他の心臓・脳血管障害、高血圧症などを併発する危険性が高いことが示され、その進行阻止がこれからの高齢化社会の大きな医療医学研究の命題となっている。

慢性腎臓病はその定義からも明らかなように糸球体傷害(糸球体からのタンパク質の漏出と糸球体濾過の低下)で発症し、その初期病変は糸球体にある。そのため、この病気の予防法や根治的治療法を開発するためにはヒト慢性腎臓病の糸球体組織を解析し、病態形成に関わる分子やそれらの相互作用、さらには病因分子を解明することが必要である。これまで、多くの糸球体傷害の研究は動物実験モデルや培養糸球体細胞を用いた研究で行われ、膨大な成果が蓄積してきたが、残念ながら、それらの成果から慢性腎臓病の進行を阻止する有効な治療法の開発に結びついたものはまだない。このことは、動物実験モデルや培養糸球体細胞を用いた研究で明らかにされた糸球体傷害機序とヒト慢性腎臓病の糸球体で起きている病変形成機構に大きな乖離があると推定される。

本研究ではヒト疾患糸球体に発現しているタンパク質や遺伝子を網羅的に解析し、疾患糸球体で変異して発現している分子を探索し、それらの分子の相互作用と疾患の進展程度などの関与を総合的、統括的に把握し、病態形成に関与する分子反応系や病因を明らかにする研究基盤づくりを目指した。

これまで、ラットの糸球体に発現している遺伝子のトランスクリプトームプロファイリングを行ってきた。本研究では、この遺伝子発現解析をヒトに応用し、さらにヒト腎生検試料の糸球体を対象とした解析に進める研究基盤(マイクロトランスクリプトーム解析)の構築を行った。一方、ヒト糸球体に存在しているタンパク質を網羅的に同定するプロテオーム解析の研究基盤を構築し、その解析手法をヒト腎生検組織に応用するための基盤の構築(マイクロプロテオーム解析)が目指された。

## 研究組織

研究代表者：山本 格

(新潟大学 医歯学系 教授)

研究分担者：矢尾板 永信

(新潟大学 医歯学系 准教授)

研究分担者：吉田 豊

(新潟大学 医歯学系 講師)

研究分担者：田中憲一

(新潟大学 医歯学系 教授)

## 交付決定額（配分額）

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	5,700	0	5,700
平成 18 年度	5,700	0	5,700
平成 19 年度	3,700	1,110	4,810
総計	15,100	1,110	16,210

## 研究発表

### (1) 学会誌等

#### 2007

Miyamoto M, Yoshida Y, Taguchi I, Nagasaka Y, Tasaki M, Zhang Y, Xu B, Nameta M, Sezaki H, Cuellar LM, Osawa T, Morishita H, Sekiyama S, Yaoita E, Kimura K, Yamamoto T. In-depth proteomic profiling of the normal human kidney glomerulus using two-dimensional protein prefractionation in combination with liquid chromatography- tandem mass spectrometry. **J Proteome Res.** 2007 Sep;6(9):3680-90.

Nishimura H, Yang Y, Lau K, Kuykindoll RJ, Fan Z, Yamaguchi K, Yamamoto T. Aquaporin-2 water channel in developing quail kidney: possible role in programming adult fluid homeostasis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 2007 Nov;293(5):R2147-58.

Shono A, Tsukaguchi H, Yaoita E, Nameta M, Kurihara H, Qin XS, Yamamoto T, Doi T.

Podocin Participates in the Assembly of Tight Junctions between Foot Processes in Nephrotic Podocytes.

**J Am Soc Nephrol.** 2007 Sep;18(9):2525-33.

Fujinaka H, Yamamoto T, Feng L, Nameta M, Garcia G, Chen S, El-Shemi AA, Ohshiro K, Katsuyama K, Yoshida Y, Yaoita E, Wilson CB.

Anti-perforin antibody treatment ameliorates experimental crescentic glomerulonephritis in WKY rats

**Kidney Int.** 2007 Oct;72(7):823-30.

Fujinaka H, Nameta M, Kovalenko P, Matsuki A, Kato N, Nishimoto G, Yoshida Y, Yaoita E, Naito M, Kihara I, Tomizawa S, Yamamoto T.

Periglomerular accumulation of dendritic cells in rat crescentic glomerulonephritis.

**J Nephrol.** 2007 May-Jun;20(3):357-63.

Nishimoto G, Sasaki G, Yaoita E, Nameta M, Li H, Furuse K, Fujinaka H, Yoshida Y, Mitsudome A, Yamamoto T.

Molecular characterization of water-selective AQP (EbAQP4) in hagfish: insight into ancestral origin of AQP4.

**Am J Physiol** 2007 Jan; 292(1):R644-51.

Harald Mischak, Rolf Apweiler, Rosamonde E. Banks, Mark Conaway, Joshua Coon, Anna Dominiczak, Jochen H. H. Ehrich, Danilo Fliser, Mark Girolami, Henning Hermjakob, Denis Hochstrasser, Joachim Jankowski, Bruce A. Julian, Walter Kolch, Ziad A. Massy, Christian Neusuess, Jan Novak, Karlheinz Peter,

Kasper Rossing, Joost Schanstra, O. John Semmes, Dan Theodorescu, Visith Thongboonkerd, Eva M. Weissinger, Jennifer E. Van Eyk and Tadashi Yamamoto Clinical proteomics: A need to define the field and to begin to set adequate standards. **Proteomics Clin. Appl** 1(2):148–156, 2007.

Takata T, Yoita E, Kamiie J, Li H, Fujinaka H, Yoshida Y, Gejyo F, Yamamoto T Glomerular podocytes express protocadherin 17  
**Acta Medica et Biologica** 55: 9-15, 2007

Ying Zhang, Yoshida Y, Bo X, Nameta M, Miyamoto M, Yaoita E, Yamamoto T Localization of tyrosine-phosphorylated proteins in the normal rat kidney  
**Acta Medica et Biologica** 55:1-7, 2007

Gao S, Li C, Shimokawa T, Terashita T, Matsuda S, Yaoita E, Kobayashi N Rho-family small GTPases are involved in forskolin-induced cell-cell contact formation of renal glomerular podocytes in vitro  
**Cell Tissue Res** 328:391-400, 2007

## **2006**

Tsubata Y, Sakatsume M, Ogawa A, Alchi B, Kaneko Y, Kuroda T, Kawachi H, Narita I, Yamamoto T, Gejyo F.  
Expression of allograft inflammatory factor-1 in kidneys: A novel molecular component of podocyte.  
**Kidney Int.** 2006 Dec;70(11):1948-54.

Katsuya K, Yaoita E, Yoshida Y, Yamamoto Y, Yamamoto T. An improved method for primary culture of rat podocytes. **Kidney Int** 69:2101-6, 2006.

Zou J, Yaoita E, Watanabe Y, Yoshida Y, Nameta M, Li H, Qu Z, Yamamoto T. Upregulation of nestin, vimentin, and desmin in rat podocytes in response to injury.  
**Virchows Arch.** 448(4):485-92, 2006.

Watanabe H, Washizuka T, Komura S, Yoshida T, Hosaka Y, Hatada K, Aizawa Y, Chinushi M, Yamamoto T, Ma M, Watanabe K. Genomic and non-genomic regulation of L-type calcium channels in rat ventricle by thyroid hormone. **Endocr Res** 31:59-70, 2005.

Kado T, Kohda T, Okada S, Hayashi A, Utsunomiya Y, Kanzaki S, Sado Y, Yamamoto T. Immunohistochemical characterization of glomerular inflammatory cells and expression of adhesion molecules in anti-glomerular basement membrane (anti-GBM) glomerulonephritis induced in WKY rats with monoclonal anti-GBM antibodies of different subclasses. **Pathology Int** 56: 55-61, 2006.

## **2005**

Yoshida Y, Miyazaki K, Kamiie J, Sato M, Okuizumi S, Kenmochi A, Kamijo K, Nabetani T, Tsugita A, Xu B, Zhang Y, Yaoita E, Osawa T, Yamamoto T. Two dimensional electrophoretic profiling of normal human kidney glomerulus proteome and construction of an extensible markup language (XML)-based database. **Proteomics** 5: 1083-1096, 2005.

Narita I, Alchi B, Sato F, Saga D, Ogawa A, Tsubata Y, Kondo D, Sakatsume M, Yamamoto T, Gejyo F. Up-regulation in the kidney and its genetic polymorphism of MUC20, a regulator of Met signaling cascade, in patients with IgA nephropathy. **Kidney Int** 68: 1970-1971, 2005.

Oyama Y, Takeda T, Hama H, Tanuma A, Iino N, Sato K, Kaseda R, Ma M, Yamamoto T, Fujii H, Kazama J, Odani S, Terada Y, Mizuta K, Gejyo F, Saito A. Evidence for megalin-mediated proximal tubular uptake of L-FABP, a carrier of potentially nephrotoxic molecules. **Lab Invest**. 85:522-531, 2005.

Alchi B, Nishi S, Kondo D, Kaneko Y, Matsuki A, Imai N, Ueno M, Iguchi S, Sakatsume M, Narita I, Yamamoto T, Gejyo F. Osteopontin expression in acute renal allograft rejection. **Kidney Intl**, 67: 886-896, 2005.

Xu B, Yoshida Y, Zhang Y, Yaoita E, Osawa T, Yamamoto T. Two-dimensional electrophoretic profiling of normal human kidney differential protein expression in glomerulus, cortex and medulla. **J Electrophoresis** 49:5-13, 2005

Qu Z, Nishimoto G, Zou J, Li h, Yoshida Y, Yaoita E, Yamamoto T. Expression and localization of the water channel, aquaporin, in the rat urinary tract. **Acta Medica et Biologica** 53:13-19, 2005.

Yaoita E, Kurihara H, Yoshida Y, Inoue T, Matsuki A, Sakai T, Yamamoto T. Role of Fat1 in cell-cell contact formation of podocytes in puromycin aminonucleoside nephrosis and neonatal kidney. **Kidney Intl** 68: 542-55, 2005.

Li H, Kamiie J, Morishita Y, Yoshida Y, Yaoita E, Ishibashi K, Yamamoto T. Expression and localization of two isoforms of AQP10 in human small intestine. **Biol Cell** 97:823-829, 2005.

Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-chikuma M, Andoo A, Shimono M, Matski A, Kobayashi K, Ikeda M, Yamamoto T, Verkman A, Kusano E, Ookawara S, Takata K, Sasaki S, Ishibashi K. Disruption of aquaporin-11 produces polystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. **Mol Cell Biol** 7770-7779, 2005.

和文

2007年

山本 格 腎疾患の基礎研究  
日本腎臓学会誌 49 : 14-18、2007

山本 格 水チャネルの世界  
小児高血圧研究会誌 4 : 5-11、2007

宮本 雅仁、吉田 豊、山本 格  
腎のプロテオミクス 医学のあゆみ 221 : 1010-1011、2007

山本 格 腎臓病研究におけるプロテオミクスの現状  
AnnualReview 腎臓 2007 1-11 頁 中外医学社、2007

山本 格 腎の構造 (2-14 頁)  
看護のための最新医学講座 (第2版) 第6巻 腎疾患と高血圧  
日野原重明、井村裕夫監修、佐々木成編集 中山書店、2007

山本 格 Nephrin 特集：これだけは知っておきたい分子腎臓学 2007  
腎と透析 63 : 537-541、2007

2006年

矢尾板永信、山本格 集合管  
日本臨床 64 (増刊号) : 98-102、2006

山本 格 メサンギウム細胞  
日本臨床 64 (増刊号) : 65-69、2006

宮本 雅仁  
プロテオミクスによる糸球体硬化の診断と病態解析

吉田 豊、山本 格 飽和標識法を用いた蛍光デファレンシャル二次元電気泳動  
(2DDIGE) によるヒト腎糸球体のプロテオーム解析  
生物物理化学 50 : 211-215、2006

山本 格 糸球体疾患の成因と進展機序に関する最近の知見  
内科学 1841-1844 頁  
金澤一郎他編集 医学書院、2006

2005年

吉田 豊、山本 格 Vinculin  
腎と透析 58 : 518-519、2005

藤中秀彦、山本 格 Integrin

腎と透析 58 : 514-516、2005

吉田 豊、山本 格 Talin  
腎と透析 806-807、2005

西本 五郎、山本 格 Paxillin  
腎と透析 808-809、2005

矢尾板永信、山本 格 CD2 associated protein  
腎と透析 59 : 8—10、2005

勝矢 健、山本 格 Synaptopodin  
腎と透析 59 : 6—7、2005

佐藤暢夫 Puromycin aminonucleoside 腎症ラットに対する副腎皮質糖質ステロ  
イドとセファランチンの蛋白尿抑制効果  
新潟医学会雑誌 119 : 481-488、2005

吉田豊、山本 格 腎疾患のプロテオミクス  
疾患プロテオミクスの最前線 254-261 頁  
戸田年総ほか編集 メディカルドウ社、2005



## (2) 口頭発表

2007年

国際

Yoshida Y, Nagasaka Y, Taguchi I, Miyamoto M, Xu B, Zhang Y, Miyazaki K, Tsugita A, Yaoita E, Fujinaka H, Yamamoto T

Two-Dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis of normal human urine proteome: Optimization of urine sample handling and quantitative difference between healthy children and adults.

第6回 HUPO Annual world congress, ソウル、2007

Yoshida Y,

In-depth profiling of the normal human kidney glomerulus proteome by two-dimensional protein prefractionation coupled with nanoflow LC-MS/MS

第6回 HUPO Annual world congress, ソウル、2007

Yoshida Y

Handling and optimization of urinary protein preparation for 2-DE based proteomic analysis and 2D DIGE quantitative analysis of urine proteomes of healthy male children and adults

第6回 HUPO Annual world congress, ソウル、2007

Goto S, Narita I, Miura T, Yao FF, Nameta M, Imai N, Sakatsume M, Yoshida Y, Inoue I, Yamamoto T, Gejyo F

Podocyte specific overexpression of ADAMTS-8 induces proteinuria in transgenic rats.

第40回アメリカ腎臓学会学術総会、2007、サンフランシスコ

Fujinaka H, Katsuyama K, Yamamoto K, Yaoita E, Yoshida Y, Tomizawa S, Yamamoto T

Expression of the chemokine fractalkine in podocytes in normal and proteinuric glomeruli.

第40回アメリカ腎臓学会学術総会、2007、サンフランシスコ

Zhao L, Yaoita E, Yoshida Y, Yamamoto T

Claudin-6 is a component of tight junctions of rat podocytes.

第40回アメリカ腎臓学会学術総会、2007、サンフランシスコ

Yoshida Y, Nagasaka Y, Miyamoto M, Xu B, Zhang Y, Miyazaki K, Yaoita E, Fujinaka H, Yamamoto T

2-DE based analysis of normal human urine proteome: optimization of urine sample handling and quantitative difference in healthy male children and adults.

第40回アメリカ腎臓学会学術総会、2007、サンフランシスコ

Miyamoto M, Yoshida Y, Taguchi I, Tasaki M, Osawa T, Kimura K, Cuellar Lino M, Yaoita E, Yamamoto T

In-depth profiling of the normal human kidney glomerulus proteome by Two-dimensional protein prefractionation coupled with nanoflow LC-MS/MS.

第40回アメリカ腎臓学会学術総会、2007、サンフランシスコ

Miyazaki S, Yamamoto T, Yaoita E, Sakurabayashi T, Suzuki M, Hirasawa Y

High serum level of osteoprotegerin (OPG) in long-term dialysis patients may be a marker of suppression of osteoarticular destruction.

第40回アメリカ腎臓学会学術総会、2007、サンフランシスコ

Hyodo T, Kikuchi Y, Hyodo N, Yamada M, Imakiire T, Oda T, Suzuki S, Kumagai H, Fujinaka H, Yamamoto T, Miura S

Targeting effector memory T cells with a voltage-gated potassium channel Kv1.3 blocker for therapy of anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in rats.

第40回アメリカ腎臓学会学術総会、2007、サンフランシスコ

**2007年**

国内

宮本 雅仁、吉田豊、田口いづみ、長阪 佳美、田崎 正行、張 榮、許 波、  
行田 正晃、関山茂樹、瀬崎浩史、大沢 哲雄、森下 英夫、矢尾板永信、  
木村 健二郎、山本 格

ヒト正常腎糸球体プロテオーム：液相 IEF と SDA-PAGE によるタンパク質の  
2次元分離と LC-MS/MS を用いた網羅的解析

第13回分子腎臓研究会、2007、東京

趙 琳寧

腎糸球体上皮細胞のタイト結合には claudin-6 が含まれる

第14回 みかんの会、2007、新潟

**2006年**

A 国際学会

Yamamoto T

Project and organization

1<sup>st</sup> Workshop of Human Kidney and Urine Proteome Project, 2006, サンディエゴ

Yoshida Y, Miyamoto M, Yamamoto T

Profiling of glomerulus proteome of normal human kidney: Proteomic approach by 2D protein Prefractionation and LC-MS/MS

1<sup>st</sup> Workshop of Human Kidney and Urine Proteome Project, 2006, サンディエゴ

Goto S, Narita I, Zhang Y, Matsumoto M, Suzuki M, Yoshida Y, Yamamoto T,

Gejyo F, Inoue T

Glomerular podocytes express ADAMTS-8, a secreted protease with antiangiogenic properties.

第39回 アメリカ腎臓学会総会、2006、サンディゴ

Miyamoto M, Yoshida Y, Taguchi I, Tasaki M, Osawa T, Kimura K, Yaoita E, Yamamoto T

Comprehensive preteome analysis of normal human kidney glomerulus with two dimensional protein prefractionation in combination with nanoflow LC-MS/MS.

第39回 アメリカ腎臓学会総会、2006、サンディゴ

Xu B, Yoshida Y, Zhang Y, Fujinaka H, Miyamoto M, Yaoita E, Yamamoto T

Consstruction of integrated database for normal human kidney proteome applicable to clinical study.

第39回 アメリカ腎臓学会総会、2006、サンディゴ

Zhang Y, Yoshida Y, Xu B, Nameta M, Miyamoto M, Yaoita E, Yamamoto T

Phosphoproteome of normal rat glomerulus:Tyrosine-phosphorylated proteins.

第39回 アメリカ腎臓学会総会、2006、サンディゴ

Nagasaka Y, Yoshida Y, Taguchi I, Miyamoto M, Xu B, Zhang Y, Miyazaki K,

Kamijo K, Tsugita A, Yaoita E, Fujinaka H, Yamamoto T

2-DE based proteome analysis of normal human urinary proteins: Difference in healthy male children and adults.

第39回 アメリカ腎臓学会総会、2006、サンディゴ

Nishimura H, Yang Y, Lau K, Yamaguchi K, Yamamoto T

Does reduced nutrition supply during nephrogenesis program impaired water balance in adults?

第39回 アメリカ腎臓学会総会、2006、サンディゴ

Fujinaka H, Matsuki A, Yaoita E, Yoshida Y, Yamamoto K, Katsuyama K, Tomizawa S, Yamamoto T

Expression of growth factor binding proteins (IGFBPs) in podocytes at normal and disease conditions.

第39回 アメリカ腎臓学会総会、2006、サンディゴ

Takata T, Yaoita E, Yamamoto T

Protocadherin 17 expression in podocytes.

第39回 アメリカ腎臓学会総会、2006、サンディゴ

Miyazaki S, Yamamoto T, Yaoita E, Sakurabayashi T, Suzuki M, Hirasawa Y

High serum level of basic fibroblast growth factor (bFGF) may be a marker of osteo-articular destruction is long-term diallylsis patients with b2 microglobulin (b2m) amyloid deposite.

第39回 アメリカ腎臓学会総会、2006、サンディゴ

Ismail T, Nishimoto G, Li H, Itou T, Satokata I, Yokoyama M, Yoshida Y, Yaoita E, Yamamoto T

Analysis of renal AQPs expression in AQP8 Knockout mice

第39回 アメリカ腎臓学会総会、2006、サンディゴ

2006年

国内

矢尾板永信、勝矢 建、藤中秀彦、山本 格

初代培養からみたポドサイトの特性

第49回 日本腎臓学会学術総会、2006、東京

高田琢磨、矢尾板永信、上家潤一、藤中秀彦、吉田豊、下条文武、山本 格

ポドサイトにおける protocadherin17 (PCDH17)の発現

第49回 日本腎臓学会学術総会、2006、東京

後藤 眞、成田一衛、張 口、松本めぐみ、鈴木正嗣、吉田豊、山本格、下条文武、井ノ上逸郎

糸球体上皮細胞における ADAMTS-8 とスリット膜構成分子の相互作用

第49回 日本腎臓学会学術総会、2006、東京

許 波、吉田 豊、張 口、宮本雅仁、矢尾板永信、藤中秀彦、山本 格

正常ヒト腎臓プロテオーム統合型データベースの構築

第49回 日本腎臓学会学術総会、2006、東京

Zhang Y, Yoshida Y, Zu B, Nameta M, Yaoita E, Fujinaka H, Yamamoto T

Phosphoproteome of normal rat glomerulus ; tyrosine-phosphorylated proteins.

第49回 日本腎臓学会学術総会、2006、東京

2005年

国際学会

Li H, Kamiie J, Morishita Y, Yoshida Y, Yaoita E, Ishibashi K, Yamamoto T.

Expression and localization of two isoforms of AQP10 in human small intestine.

第38回 アメリカ腎臓学会総会、2005、フィラデルフィア

Nishimoto G, Li H, Yoshida Y, Yaoita E, Yamamoto T.

Gene diversity of aquaporin homologues in Eel, *Anguilla japonica*.

第38回 アメリカ腎臓学会総会、2005、フィラデルフィア

Yoshida Y, Miyazaki K, Xu B, Yaoita E, Yamamoto T.

Proteome of normal human kidney glomerulus: Database, differential expression and 2-DE profiling of glomeruli isolated from biopsy tissues.

第38回 アメリカ腎臓学会総会、2005、フィラデルフィア

Yanagita M, Okuda T, Endo S, Tanaka M, Yamamoto T, Fukatsu A, Sakurai T, Kita T.

USAG-1, a novel BMP antagonist abundantly expressed in the kidney, exacerbates renal injuries.

第38回 アメリカ腎臓学会総会、2005、フィラデルフィア

katsuya K, Yaoita E, Yoshida Y, Yamamoto Y, Yamamoto T.

An improved method for primary culture of rat podocytes.

第38回 アメリカ腎臓学会総会、2005、フィラデルフィア

Fujinaka H, Nameta M, Matsuki A, Yoshida Y, Yaoita E, Tomizawa S, Yamamoto T.

Periglomerular Accumulation of dendritic cells in experimental crescentic glomerulonephritis.

第38回 アメリカ腎臓学会総会、2005、フィラデルフィア

Zou J, Yaoita E, Watanabe Y, Yoshida Y, Nameta M, Li H, Yamamoto T.

Upregulation of nestin, vimentin and desmin in rat podocytes in response to injury.

第38回 アメリカ腎臓学会総会、2005、フィラデルフィア

Miyazaki S, Yamamoto T, Yaoita E, Sakurabayashi T, Suzuki M, Hirasawa Y.

Soluble Fas (sFas), a suppressive factor of apoptosis, is elevated in sera of hemodialysis patients with  $\beta_2$  microglobulin ( $\beta_2m$ ) amyloidosis and osteoarticular destruction.

第38回 アメリカ腎臓学会総会、2005、フィラデルフィア

## 2005年

国内

山本 格

ヒト糸球体のゲノミクスとプロテオミクス

第4回腎保護・再生研究会、2005、京都

Bassam K, Alchi, Nishi S, Kondo D, Kaneko Y, Mastuki A, Imai N, Ueno M, Iguchi S, Sakatsume M, Narita I, Yamamoto K, Gejyo F

Osteopontin expression in acute renal allograft rejection.

第48回日本腎臓学会学術総会、2005、横浜

Yaoita E, Kurihara H, Yoshida Y, Inoue T, Sakai T, Yamamoto T.

Fat1 localization at cell-cell contact sites of podocytes in puromycin aminonucleoside nephrosis, neonatal kidney and culture.

第48回日本腎臓学会学術総会、2005、横浜

吉田豊、宮崎賢司、許 波、張 瑩、上條憲一、次田皓、矢尾板永信、山本格.  
腎生検試料から単離した糸球体の二次元電気泳動によるプロテオーム解析の試み

第48回日本腎臓学会学術総会、2005、横浜

栗原秀剛、矢尾板永信、永坂恵子、山本格、坂井建雄

新規ラット不死化糸球体足細胞株の確立

第48回日本腎臓学会学術総会、2005、横浜

藤中秀彦、行田正晃、松木麻子、吉田豊、矢尾板永信、富沢修一、山本格

Periglomerular accumulation of dendritic cells in experimental crescentic glomerulonephritis.

第48回日本腎臓学会学術総会、2005、横浜

## 本研究の目的

平成 13～16 年度に行ってきた研究でヒト腎糸球体に発現、分布している遺伝子とタンパク質を網羅的に検出する手法とシステムを構築した：ヒト腎糸球体遺伝子とタンパク質のプロファイリング。本研究ではそこで培った摘出腎臓の糸球体試料の解析手法を腎生検試料の糸球体解析に応用する手法を確立し、研究期間中（平成 17～19 年度）に、ヒト IgA 腎症などの慢性腎臓病の糸球体病変の病態形成に関与する可能性のある遺伝子とタンパク質をマイクロアレー法と質量分析器を用いて網羅的に探索し（トランスクリプトミクスとプロテオミクス）、その病態形成に重要な役割を演じている分子（反応系）をしぼりみ、ヒト IgA 腎症などの慢性腎臓病の糸球体病変の病態形成に係る分子の探索と選択をするための基盤技術を構築するのを目標とした。

トランスクリプトミクス (transcriptomics) とは遺伝子の発現を示す mRNA (メッセンジャーRNA) を例えば DNA マイクロアレーの様に一度に全 mRNA (トランスクリプトーム) の量と種類を識別する技術で網羅的に解析する技術である。ヒトゲノムは 2001 年に一応の解読(ドラフト)が、2004 年に若干の修正がなされ、ほぼ完成した解読が学会誌に発表された<sup>1～3)</sup>。この解析により、ヒトには約 22,000 個の遺伝子が存在し、ある組織における全遺伝子の発現の種類と量が DNA マイクロアレー法で解析でき、また、それらの遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列の推定ができ、その構造、機能の推定も可能になりつつある。

1. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921, 2001.
2. Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., et al. The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304–1351, 2001.
3. International human genome sequencing consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931-945, 2004.

DNA マイクロアレーとはスライドガラス上に DNA の部分配列 (DNA プローブ) を高密度に、数万から数十万箇所固定したものである。例えば、ヒトの遺伝子が全て固定されている DNA マイクロアレーを用いることにより、それらのすべての遺伝子の発現 ( ) の強弱を同時に検出することが可能である。ヒトの細胞や組織から抽出した mRNA を逆転写酵素で cDNA に変換したもの (ターゲット) し、変換過程で蛍光物質を標識して、DNA マイクロアレーの DNA プローブと結合 (ハイブリダイゼーション) させることによって、mRNA として発現している遺伝子情報を網羅的に検出 (トランスクリプトームミクス) できるのである。

しかし、注意すべきは、遺伝子産物である mRNA の種類と量は、同じく遺伝子産物で、重要な機能分子であるタンパク質の種類と量とは必ずしも相関するわけではないことである。機能分子としてのタンパク質で構成されるシステムは、トランスクリプトームと同様な枠組みで理解され、プロテオームという概念で認識されている。

プロテオーム (Proteome) とは、ある生物個体、臓器、組織、細胞、細胞内器官、タンパク質複合体などの系において存在しているタンパク質の総体を示す言葉である。遺伝子 (gene) の総体を示すゲノム (genome) に対比できる概念である。プロテオームを扱う解析をプロテオミクスと言う。タンパク質を網羅的に解析することは、遺伝子 (核酸) やその発現である mRNA の解析よりもはるかに困難である。その理由は大きく分けて二つある。まず一つは、遺伝子や mRNA を検出するための合成した cDNA は PCR (polymerase chain reaction) によって増やすこと (増幅) ができるが、タンパク質では増幅できないということである。タンパク質は量を増やすには、試料を増やして精製するしかなく、微量のまま解析する技術の進歩が必要であった。もう一つは DNA は基本的に 4 種類の塩基から成り立つが、タンパク質を構成するアミノ酸は 20 種類あるため、核酸よりも同定が煩雑であることである。

このような背景から、疾患糸球体のプロテオミクス、トランスクリプトミクス解析は次のようなプロセスで実践が可能になり、それが目指された。

- 1) ヒト腎生検試料から糸球体を効率よく、正確に分離する技術を確立する。
- 2) 分離された糸球体に発現している遺伝子とタンパク質を網羅的に解析するために必要な微量解析の設備を整備する。
- 3) 慢性腎臓病の糸球体と正常糸球体の発現遺伝子の差異を DNA マイクロアレイ法で解析し、その差異を探索する (マイクロトランスクリプトーム解析)。
- 4) 慢性腎臓病の糸球体と正常糸球体のタンパク質を 2D-DIGE 法、saturation dye 法で比較し、その差異を探索する ((マイクロプロテオーム解析)。
- 5) 探索された候補分子の分子の機能や分子間相互作用を解析し (バイオインフォマティクス)、その制御、抑制法などを実験で証明し、疾患の予防法、治療法開発の道筋をつける。



## 本研究の学術的な特色、独創的な点及び予想される結果と意義

特色1：ヒト慢性腎臓病の糸球体を直接解析する研究なので、ヒトの慢性腎臓病の真の病態が把握できる。

特色2：ヒト慢性腎臓病の糸球体で発現している全遺伝子と全タンパク質を対象にしているので、病態形成に関与する全分子反応系が総合的、統合的に把握できる可能性が高い。

特色3：これまで有効な根治的治療法が無かったヒトIgA 腎症などの慢性腎臓病の病態形成の分子機構が理解されると、その治療法や予防法の開発につながる標的分子が絞り込まれ、治療法開発に結びつく可能性がある。

## 国内外の研究の中での位置づけ

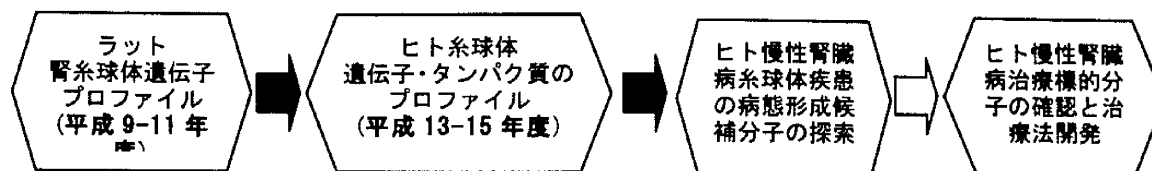
これまでのヒト慢性腎臓病の糸球体病変の病態は主に動物モデルや培養細胞を用いて研究されたり、他の臓器の炎症の研究から明らかになった成果を糸球体腎炎にも外挿し、その機序の関与の有無を解析するような手法で行われてきた。しかし、このような研究からは、その治療法や予防法の開発に結びついた成果はほとんど得られていないのが実情で、そのために毎年約1万人ずつ増加しているとうせきつ患者数は歯止めがかかっていないのである。

本研究はヒトIgA 腎症などの慢性腎臓病の糸球体に存在する全発現遺伝子、全タンパク質を対象として同定し（トランスクリプトミクスとプロテオミクス）、それらによる分子反応系を推定し、それにより形成される病態を総合的、統合的に把握しようとするものである。このような大規模研究は個人レベルでは出来ない研究で、国内外にこのような研究を行っている研究室はない。私どもの研究室は基礎研究部門であり、スタッフ3名の他、大学院生10名、研究生2名、非常勤研究員3名、技術補佐員2名がおり、これまでも糸球体トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析を行ってきた実績があり、このような大規模研究を遂行できる環境が整っている。

## 関連したこれまでの研究実績

### I. 従来受けた科学研究費補助金の研究種目、期間（年度）、研究課題名、研究経費

ヒト IgA 腎病態を解析し、その治療法の開発に結びつけたいと私どもはこれまで、次のフローチャートに示された計画で研究を進めてきた。以下に、その詳細を述べてみる。



#### 1) 文部省科学研究費補助金 基盤研究(B) (平成 9-11 年度)、

「腎糸球体の特性を規定する遺伝子群のクローニングと機能解析」、研究費 870 万円  
この研究はヒト IgA 腎症の病態解析のために正常及び腎炎モデルラットを用いた基礎研究であった。正常ラット及び腎炎モデルラットの糸球体で発現している遺伝子の違いを調べて、その手法を用いてヒト糸球体腎炎の病態形成に関連する遺伝子を把握し、治療法の開発のために分子標的を探索することが可能かどうかを検証した。ラット糸球体に発現している遺伝子 cDNA ライブラリー、腎髄質に発現している遺伝子 cDNA ライブラリーを作製し、両者を比較することでラット糸球体に特異的に発現している遺伝子を探索した。その結果、いくつかの既知の遺伝子と未知の遺伝子を確認することができた。その中で機能が不明な遺伝子として olfactomedin-related protein 遺伝子に注目し、その遺伝子が腎臓では糸球体に、全身臓器では神経細胞にも特異的に発現しており、その翻訳蛋白は糸球体上皮のゴルジ装置に局在していることを報告した (J Am Soc Nephrol 11:803-813, 2000)。

#### 2) 文部省科学研究費補助金 基盤研究(B) (平成 13-15 年度)、

「ヒト IgA 腎症の病因と病態のゲノミクスとプロテオミクス」、研究費 1320 万円

平成 9 年からラット糸球体を用いた基礎研究開始と同時にヒトの腎組織収集も開始し、腎腫瘍のために摘出された腎臓や IgA 腎症患者の剖検から腎臓の一部を提供者や家族のインフォームドコンセントを得て提供を受けてきた。腎摘の約 60 例の中には糸球体に IgA が沈着している例が 5 例、病理組織学的に IgA 腎症と診断されるものが 3 例あり、それぞれ糸球体を単離し、遺伝子採取用、蛋白分離用に保存してきた。これらの試料で正常ヒト糸球体 cDNA ライブラリーを作製し、その 6000 クローンの塩基配列を解読し、解読した遺伝子のさまざまな情報を付記したデータベースを作成している。また、通常のマイクロアレイによるヒト糸球体遺伝子の発現

プロファイルも平成 16 年度中には完了の予定である。これら遺伝子解析と同時にヒト糸球体のタンパク質を網羅的に解析する研究も行ない、2 次元電気泳動法と質量分析機を用いて、これまで、2 次元電気泳動法で確認される正常糸球体のタンパク質のプロファイリング（マスタープロファイル）を完成させ、そこで分離された約 1000 スポットの内、約 350 スポットのタンパク質を同定した。また、ヒトプロテオーム機構（Human Proteome Organization, HUP0）の日本支部（JHUP0）に属し、名称（Gene Ontology Consortium）、物理化学的性質、機能、局在、文献、アクセス番号などのアノテーションを追加した糸球体プロテオームデータベースを作り、平成 16 年度中に公開する(<http://www.sw.nec.co.jp/bio/rd/hgldb/index.html>)。

## II. I 以外で、この研究課題に密接に関連した研究課題で受けた研究費

1) 民間企業数社からの奨学寄付金（平成 11-15 年）、代表 山本格、研究費 800 万円：腎炎モデル糸球体で発現している遺伝子や分布しているタンパク質を同定する研究を行い、その手法はヒト IgA 腎症の糸球体で発現、存在する分子探索の戦略として実行可能であることを確認した。

2) 「ヒト遺伝子探索」 Japan Genome Solution, Inc との共同研究（平成 13-現在）代表 山本格、研究費 634 万円：ヒト糸球体発現遺伝子のデータベース化と糸球体疾患解析用マイクロアレーの開発を行っている。

3) 「ヒト糸球体のプロテオーム解析」 NEC プロテオミクス研究所との共同研究（平成 13-現在）代表 山本格、研究費 48 万円：ヒト糸球体試料の 2 次元電気泳動法と質量分析機による網羅的タンパク質解析と、そのデータベース化のソフトウェアの開発を行っている。

4) 「腎糸球体疾患の病態関連遺伝子・タンパク質解析から治療法開発へ向けた探索」平成 16 年度 新潟大学プロジェクト推進経費 代表 山本格 研究費 778 万円：ヒト糸球体の cDNA アレーによる解析をおこない、糸球体に特異的に発現している遺伝子を選択して、各種疾患で比較している。

## I. この研究課題の準備状況等について

1) ヒト正常糸球体に発現している遺伝子プロファイル（トランスクリプトーム）

① ヒト正常糸球体に発現している遺伝子の注釈付インハウスデータベースが完了している：ヒト正常糸球体の cDNA ライブラリーを作製し、その 6,000 クローンの塩基配列を読み、遺伝子を同定し、同一遺伝子の数や個々の遺伝子の GeneCard 情報などを加えたデータベースを作成している。

② マイクロアレーによる糸球体発現遺伝子の定量化が進んでいる：ヒト遺伝子 16,000 クローンが載っているマイクロアレー（タカラバイオ社製）を用いて、ヒト糸球体に特異的に高発現している遺伝子が選択され、データベース化されている。

現在、その個々の遺伝子の発現の定量を QRT-PCR 法で、発現細胞の同定を In situ hybridization 法で確認する作業が行われている。

## 2) ヒト正常糸球体に存在しているタンパク質プロファイル (プロテオーム)

①ヒト正常糸球体に存在しているタンパク質の網羅的同定とデータベース化を行っている：平成 14 年より、ヒト正常糸球体に存在しているタンパク質を網羅的に同定し、疾患糸球体に存在するタンパク質との異同により、病態形成に関与する候補分子を探索する研究を NEC プロテオミクス研究所との共同研究で開始した。そこでは正常ヒト糸球体タンパク質の約 250 スポットのタンパク質の同定が終了している。これらの内容については平成 15 年、世界ヒトプロテオーム機構 (HUP0) の日本支部会 (JHUP0)、平成 16 年、世界ヒトプロテオーム学会で発表され、新聞などにも紹介された (平成 14 年 10 月 18 日付け日本経済新聞、平成 14 年 11 月 29 日付け日本経済産業新聞など)。

②高分子タンパク質を同定する手法を現在検討している：通常の 2 次元電気泳動で分離されるタンパク質は分子量 100kDa 以下のものなので、それ以上の分子量のタンパク質を同定する必要がある。そのために、現在、LC MS/MS 質量分析器を用いた解析が試みられている。

## 3) トランスクリプトームとプロテオーム解析のマイクロ化の準備

マイクロダイセクション法で腎組織切片より糸球体部分だけを切り出し、RNA およびタンパク質を抽出し、total RNA で 5 ng でマイクロアレー解析、PCR 法で特定の遺伝子発現を検出できることを確認している。また、タンパク質は 20~5  $\mu$ g で 2D-DIGE 法、saturation dye 法で 2 サンプル間の定量的比較ができることを確認している。

## II. 研究を実施するために、使用する研究施設・設備等、現在の研究環境の状況

マイクロアレー関連機器と TOF-MS 質量分析機は新潟大学脳研究所附属生命科学リソース研究センター遺伝子実験部門に設置されている。また、LC-MS/MS 質量分析機については共同研究を行っている NEC プロテオミクス研究所のものが使用できる。DNA sequencer、全自動 in situ hybridization 機、2 次元電気泳動装置は当分野に既に設置されている。マイクロダイセクション機器も新潟大学医学部の共同機器として設置されている。

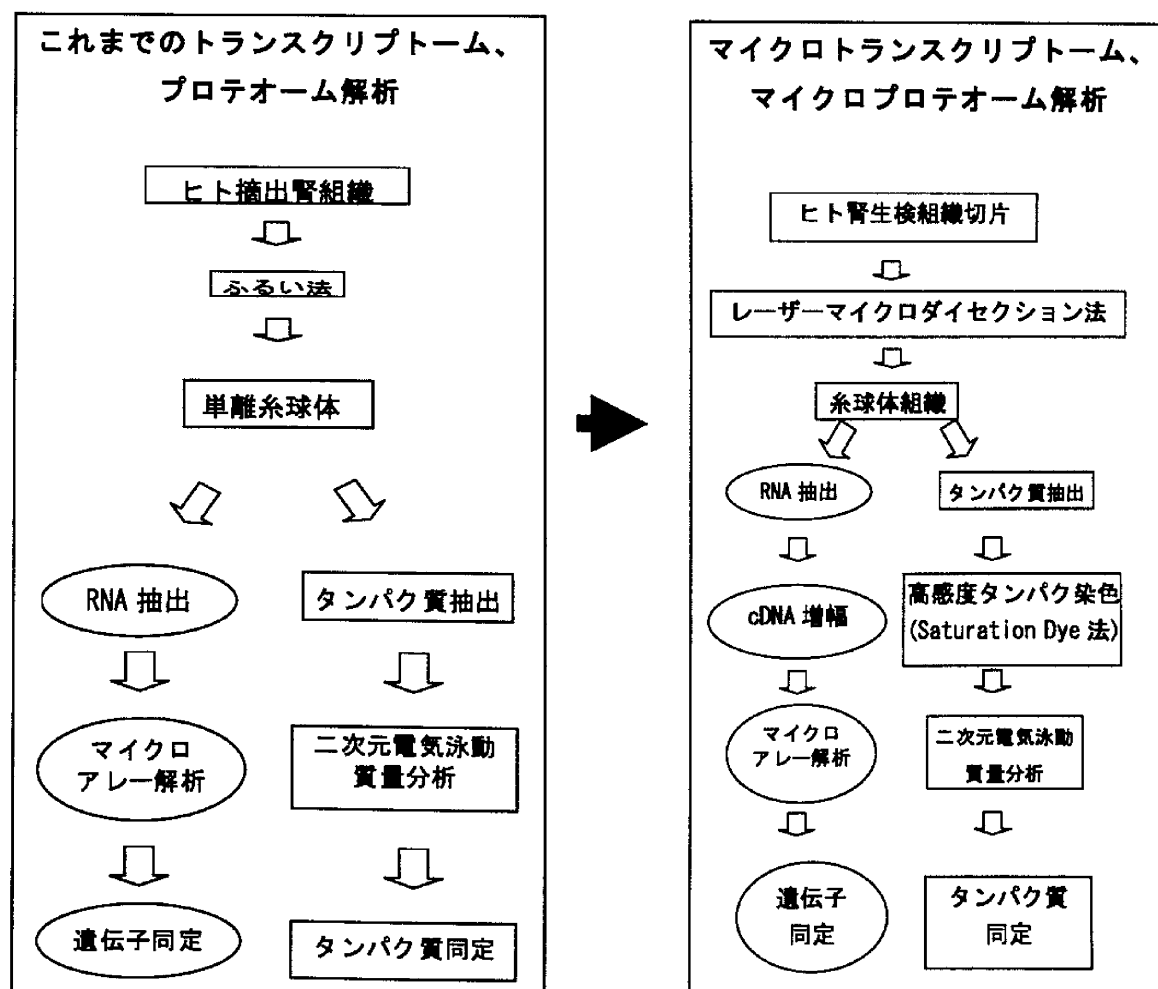
## 研究計画・方法（平成17年度）

### 「平成17年度」研究の戦略の概要

ヒト腎炎糸球体を対象とする遺伝子、タンパク質の解析はサンプルが腎生検で得られる微量のものであることから、微量で解析が行えるシステムを構築する必要がある。そこで、これまでのトランスクリプトーム、プロテオーム解析技術のマイクロ化を行う。

① レーザーマイクロダイセクション法で糸球体部分だけを切り出し、RNA を抽出し、微量サンプルのマイクロアレー解析技術を持つ Japan Gene Solution, Inc と共同して、マイクロダイセクション法で得られたヒト IgA 腎症などの糸球体から抽出した RNA 1～5 ng 程度でマイクロアレー解析を行う（マイクロトランスクリプトーム）。

② 通常の2次元電気泳動と質量分析機を用いたタンパク質の同定にはサンプルが 500  $\mu$ g 程度必要である。ここでも、マイクロダイセクション法で得られる糸球体からのタンパク質で解析できる技術が必要で、1  $\mu$ g 程度で分析できる saturation dye 法でマイクロプロテオーム解析を行う。



平成17年度は、ヒト腎生検組織標本からレーザーマイクロダイセクション法で糸球体部分を切り出し、そこから抽出した微量の遺伝子をマイクロアレー法で、抽出した微量のタンパク質を2次元電気泳動で解析する技術（マイクロゲノミクス及びマイクロプロテオミクス）を確立するのが主な計画である。

1) ヒト IgA 腎症の腎組織の入手の継続（研究代表者、山本と研究分担者、矢尾板、吉田）：

平成9年頃から腎腫瘍のために摘出された腎臓や IgA 腎症の患者の剖検の腎臓の一部を提供者や家族のインフォームドコンセントを得て、提供を受けている。その約80例を病理組織学的に検索すると、糸球体に IgA が沈着している例が5例、病理組織学的に IgA 腎症と診断されるものもが3例含まれていた。得られた腎組織から糸球体を単離し、遺伝子採取用、蛋白分離用にそれぞれ保存している。また、腎疾患診断のために行なわれた生検材料で IgA 腎症と診断された腎組織切片が30例以上収集されている。今後もこの収集を続けてゆく。

2) ヒト IgA 腎症の腎生検組織からの遺伝子抽出とその検出（研究代表者、山本と研究分担者、田中）：

これまで既製のヒト遺伝子 18,000 クローンが載っているマイクロアレー（University Net Work）を用いて、ヒト糸球体、腎皮質、腎髄質などに特異的に発現している遺伝子の探索を現在行ってきたが、この手法では組織由来の mRNA の量が大量（1~2  $\mu$ g 程度）必要なため、ヒト IgA 腎症腎生検試料から得られる糸球体に応用するためには微量の mRNA で解析する手法の確立が必要になる。そこで、ヒト組織の遺伝子発現を微量の mRNA でマイクロアレー検索する技術を持っている民間企業（Japan Genome Solution 社）との共同研究を行なっている。

ヒト IgA 腎症の腎生検組織をレーザーマイクロダイセクション法で糸球体部分だけを切り出し、RNA を抽出し、Japan Genome Solution, Inc が開発した PCR 法で全遺伝子を増幅した後、マイクロアレー（関連機器は遺伝子実験施設に現有）で発現プロファイルを検出できる技術を確立する。

3) ヒト IgA 腎症の腎生検組織からのタンパク質抽出とその検出（研究分担者、吉田）：

ヒト IgA 腎症の腎生検組織をレーザーマイクロダイセクション法で糸球体部分だけを切り出し、そこから抽出したタンパク質を近年開発された Saturation dye 法（Amersham Bioscience）でラベルし、2次元電気泳動（平成17年度申請の Invitrogen 社の2次元電気泳動システムを使用）することにより、従来の銀染色の約100倍の高感度検出（平成17年度申請の Amersham Bioscience 社のフラットベッ

ドスキャナーを使用)が可能となる。検出スポットをすでに完成している正常ヒト糸球体の2次元電気泳動プロファイルデータベース(平成17年度申請のサーバー用パーソナルコンピュータを使用)と比較することで、ヒトIgA腎症の腎生検組織の糸球体で増減するタンパク質を同定する。

4) 糸球体発現遺伝子の量と発現部位の検索(研究分担者、矢尾板):

ヒト糸球体、腎皮質、腎髄質、その他の臓器から抽出したRNAを用い、ribonuclease protection法でその発現量を定量し、上述のマイクロアレイ法と比較する。さらに、in situ hybridization法(現有の自動in situ hybridization用機器を使用)で注目する遺伝子の糸球体内発現細胞を明らかにする。

5) 高分子タンパク質の網羅的解析技術の確立(研究分担者、吉田):

通常の2次元電気泳動法では分子量が100kDa以上のタンパク質の分離は困難である。その理由は高分子タンパク質が1次元目の等電点電気泳動の担体(IPG gel)に入らないためである。高分子タンパク質を分離するために1次元目の等電点電気泳動をアガーロースの担体で行う技術が開発されている。この技術を使い正常ヒト糸球体の高分子タンパク質を網羅的に質量分析器(遺伝子実験施設に現有しているものと共同研究先のNECプロテオミクス研究所も機器を使用)で同定し、すでに作成してある100kDa以下のタンパク質のデータベースと統合し、真の糸球体タンパク質データベースを構築する。

「平成18年度」

1) 平成17年度に確立した腎生検試料からマイクロダイセクションして得られた糸球体に発現している遺伝子を検出する技術を用いて、収集してあるヒトIgA腎症糸球体サンプルを解析し、疾患糸球体で特異的に発現が変化している遺伝子を既に構築してある正常ヒト糸球体遺伝子データベースと正常ヒト糸球体タンパク質データベースで検索する(研究代表者、山本と研究分担者、矢尾板、吉田、田中)。

2) また、糸球体タンパク質の2次元電気泳動も行ない、平成15年度に構築した正常ヒト糸球体を二次元電気泳動スポットのデータベースと比較することで、病態形成に関与する分子を推定する(研究分担者、吉田)。

3) 得られた遺伝子やタンパク質がヒトIgA腎症の糸球体で特異的に発現、分布しているかどうかをヒト正常糸球体、腎皮質、腎髄質やヒトIgA腎症糸球体から抽出したRNAを用いたribonuclease protection法、及びマイクロダイセクション法で

得られた IgA 腎症の糸球体 RNA を用いた PCR 法で確認し、確認されたものは in situ hybridization 法で糸球体発現細胞を明らかにする（研究分担者、矢尾板）。

4）本研究成果をアメリカ腎臓学会で発表する予定（研究代表者、山本）。

「平成 19 年度」

ヒト IgA 腎症糸球体で発現が顕著に変化している遺伝子やタンパク質を病態形成候補分子として、それらの分布や機能を解析する。

1）腎炎モデル糸球体での候補遺伝子の発現の変化を ribonuclease protection 法や in situ hybridization 法で検索し、候補分子の重要性を検証する（研究代表者、山本）。

2）抗体を作成して免疫組織学的に対応分子の糸球体局在や培養糸球体細胞での局在を解明する（研究分担者、矢尾板）。

3）最終的にはこれらの遺伝子及び二次元電気泳動データベースを統合したバイオインフォマティクスを構築し、IgA 腎症進行の病態を分子レベルで把握できるようにし、IgA 腎症以外の糸球体傷害の解明に役立てる（研究代表者、山本、研究分担者、吉田）。

## Ⅱ. 生命倫理・安全対策等に関する留意事項

本研究はヒトの腎組織を用いてその遺伝子やタンパク質を解析する研究である。そのうち、腎腫瘍で摘出した腎組織については新潟市民病院の泌尿器科の先生方に協力していただき、提供者、その家族、血縁者、その他の関係者に本研究の主旨を説明し、個人識別ができないようにして遺伝子が解析され、解析結果は提供者、その家族、血縁者、その他の関係者にも知らせることはないこと、個人的な解析結果を公表することはないことでインフォームドコンセントを得て収集したものである。その実施は新潟市民病院の倫理委員会及び新潟大学遺伝子倫理委員会の承認を得て行われている。また、腎生検組織は以前から病理診断用に収集されていたもので、その遺伝子解析を開始する平成 17 年度以降には解析の対象者には腎腫瘍で摘出した腎組織については提供者などと同様にインフォームドコンセントを得て行う。

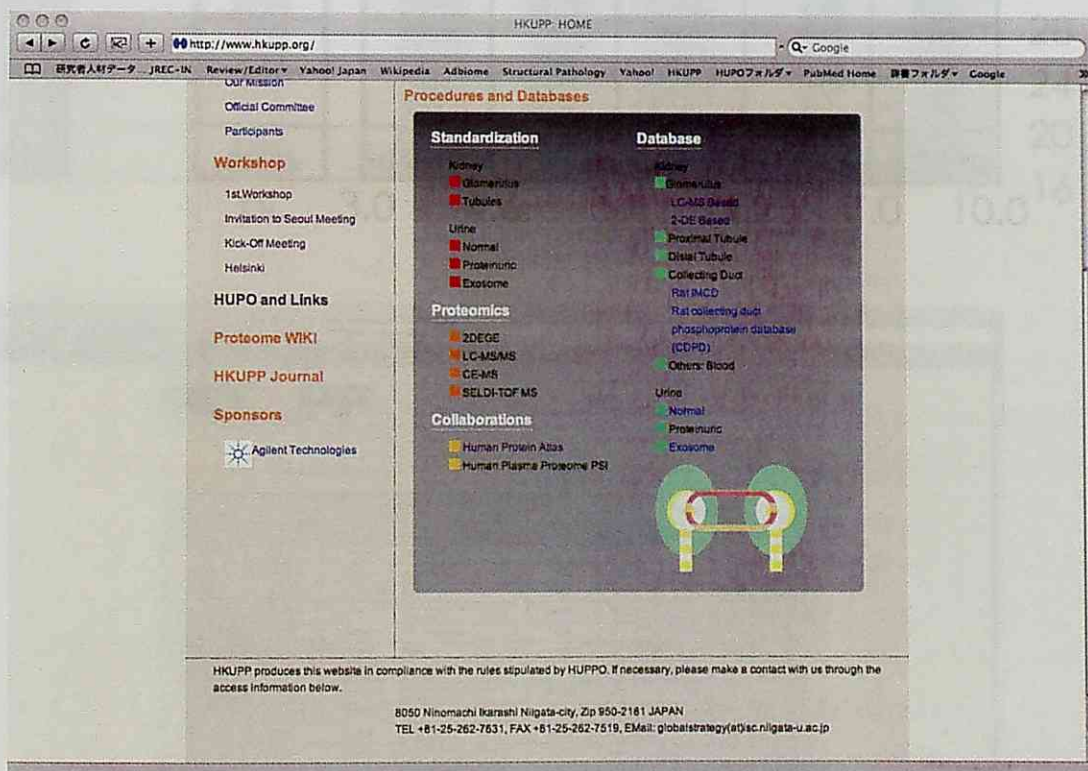


## 主な研究成果と問題点

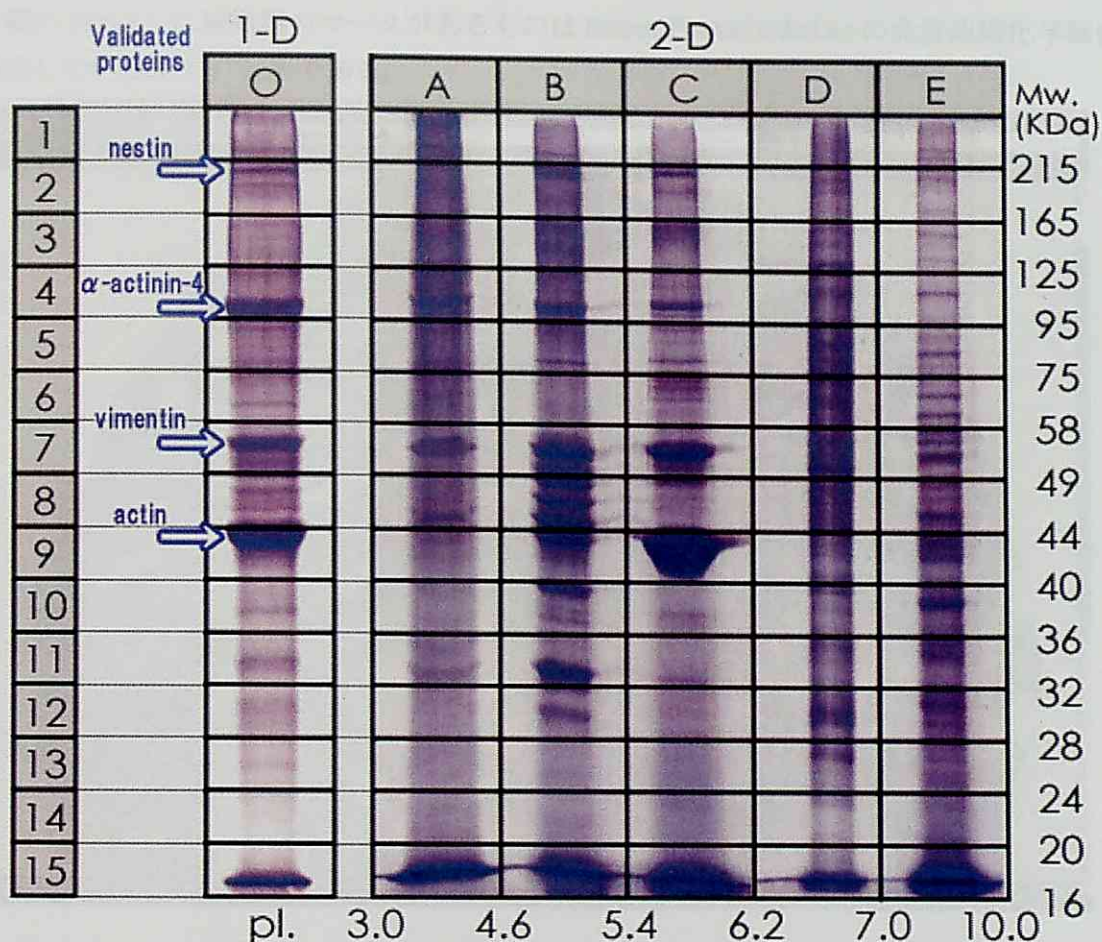
### 1. 正常ヒト腎系球体プロテオミクスデータベースの公開

これまで行ってきた正常ヒト腎系球体のプロテオーム解析の結果を腎臓病研究者が利用できるようなウェブ上に公開した (<http://www.hkupp.org>)。このデータベースには約 3000 種類の遺伝子に由来する約 7000 種類の糸球体タンパク質がその生化学的特徴などと共にリストされている。最も特徴的なのはそれらのタンパク質の局在を示す免疫組織化学染色画像を Human Proteome Organization (HUPRO) イニシアチブの Human Antibody Initiative が作製している Human Protein Atlas より提供を受け、添付していることである。

Human Kidney and Urine Proteome Project (HKUPP) のホームページ  
(<http://www.hkupp.org>)



LC-based Glomerulus をクリックすると次のゲル画像がでて、そのゲルの 1 区画をクリックするとそこに分布しているタンパク質がリストされる。



HKUPP Query by Sections

http://www.hkupp.org/records.php?fr=8046&w=8&c=00000222

HKUPP

Show the Records for 2D B-4

UniProt Accession	UniProt DB Name	Other DB Number	Protein Name	Gene Symbol	Peptides No. in this Fraction	Spots No. in this Fraction	Spots No. in this Database	Detail
IP00013808	Swiss-Prot	O43757	Alpha-actinin-4	ACTN4	47	62	161	Detail
IP00247063	Swiss-Prot	P08473	Nestin	NEB	30	42	140	Detail
IP00513769	REFSEQ	NP_000008	Nestin	NEB	37	62	82	Detail
IP00298261	Swiss-Prot	P11047	Lamin gamma-1 chain precursor	LAMC1	23	46	72	Detail
IP00472760	TrEMBL	Q05840	175 kDa protein	NEB	21	55	89	Detail
IP00108600	Swiss-Prot	P48881	Nestin	NEB	27	48	69	Detail
IP00445194	REFSEQ	NP_002202	Integrin beta-1 isoform 1A precursor	ITGB1	19	22	62	Detail
IP00119088	REFSEQ	NP_001839	Collagen type VI, alpha 1 precursor	COL6A1	16	23	49	Detail
IP00227505	Swiss-Prot	P08760	Integrin alpha-2 precursor	ITGA2	22	38	48	Detail
IP00555091	TrEMBL	Q52687	Integrin alpha-2 variant (fragment)	ITGA2	21	37	47	Detail
IP00217563	Swiss-Prot	P05565-1	Integrin beta-1A of Integrin beta-1 precursor	ITGB1	18	21	47	Detail
IP00291130	Swiss-Prot	P12109	Collagen alpha-1(VI) chain precursor	COL6A1	17	22	46	Detail
IP00217561	Swiss-Prot	P05565-3	Integrin beta-1C of Integrin beta-1 precursor	ITGB1	17	19	46	Detail
IP00217562	Swiss-Prot	P05565-4	Integrin beta-1D of Integrin beta-1 precursor	ITGB1	17	19	46	Detail
IP00293305	Swiss-Prot	P05565-2	Integrin beta-1B of Integrin beta-1 precursor	ITGB1	17	19	46	Detail
IP00549338	Swiss-Prot	P05565-5	Integrin beta-1E of Integrin beta-1 precursor	ITGB1	17	19	46	Detail
IP00112606	Swiss-Prot	P12814	Alpha-actinin-1	ACTN1	17	30	45	Detail
IP00750776	TrEMBL	O11625	Actinin alpha-1 isoform 1	ACTN1	17	40	45	Detail
IP00209922	Swiss-Prot	P52668	Lamin beta-2 chain precursor	LAMB2	21	38	45	Detail
IP00215935	Swiss-Prot	P28700-2	Integrin Alpha-3A of Integrin alpha-3 precursor	ITGA3	12	17	41	Detail
IP00290943	Swiss-Prot	P28006-1	Integrin Alpha-3B of Integrin alpha-3 precursor	ITGA3	12	17	41	Detail
IP00519502	Swiss-Prot	P35579	Myosin-9	MYH9	17	21	38	Detail
IP00550867	TrEMBL	O58701	Integrin alpha-3 isoform 5, partial (GenBank)	ITGA3	9	12	31	Detail



右欄の Detail に顕微鏡のマークがあるものは Human Protein Atlas の免疫組織化学画像も提供しているので、有用である。



## 2. Human Proteome Organization (HUP0)のイニシアチブとしての活動

慢性腎臓病（CKD）は病因や病態の進行機序が未だ不明のため、根治的治療法がなく、進行して末期慢性腎不全となり、血液透析や腎移植を余儀なくさせる危険性の高い疾患である。このような腎臓病の研究は半世紀にわたって行われてきたが、大きな成果が得られていない。これは慢性腎臓病の主たる初期病変部である糸球体でどのような異常が起こっているかを調べることができなかったためである。そのため、慢性腎臓病の糸球体でおこっている異常を把握することができなかったため、その異常を阻止することができなかったと考えられる。世界の多くの腎臓病研究者もそのように思っていたが、近年、ポストゲノム科学としてタンパク質を網羅的に同定するプロテオミクスや多くの遺伝子発現解析データやタンパク質解析データからそこで起きている分子反応など有意義な結論を導き出すためのコンピュータサイエンス、バイオインフォマティクス（生体情報学）が急速に発展し、これらの科学で病変糸球体を解析することで、それが解明されるのではとの期待がもたれた。

このような期待をもった世界の腎臓病研究者が 2005 年に集まり、ヒト腎臓・尿プロテオームプロジェクト（Human Kidney and Urine Proteome Project, HKUPP）を国際連携で開始することが同意された。このプロジェクトは同年、ヒトの全タンパク質の網羅的解析、プロテオミクスを主導するヒトプロテオーム機構（Human Proteome Organization, HUP0）

のプロジェクト（イニシアチブ）として認可され、HUPO の他の臓器関連イニシアチブ（ヒト脳、肝臓、血漿、心・血管、万能細胞など）や研究基盤イニシアチブ（標準化、抗体、バイオマーカーなど）との連携も図られるようになった。

疾患糸球体のプロテオームの異常を把握するには正常糸球体のプロテオームを知っている必要がある。そのため私どもの研究室では腎摘された皮質から正常ヒト糸球体を分離し、そのプロテオームを解析し、それをデータベース化してウェブ上で公開し、多くの研究者に利用してもらっている。現在、このデータベースは HUPO イニシアチブのヒト抗体イニシアチブと連携し、抗体による免疫組織化学法によるタンパク質の糸球体局在情報が付加されつつあり、この完成はさらに多くの情報の発信源となると期待される。

一方、慢性腎臓病の糸球体の解析は多くの場合、腎生検試料の糸球体を解析するしかなく、その量の少なさが問題である。腎生検試料から糸球体を切り出すにはレーザーマイクロダイセクション法が用いられ、顕微鏡下でコンピュータ制御のレーザーで腎生検の凍結切片の糸球体周囲を切りし、糸球体を回収することで行われる。これまでの私たちの検討から、糸球体切片 50 枚ほど（5～10 切片）で約 1～2  $\mu\text{g}$  のタンパク質が回収されることが分かっている。この場合、血漿タンパク質が多く入ってくるのが問題となっている。しかし、精度、感度の高い質量分析計を用いると糸球体タンパク質 0.2  $\mu\text{g}$  のタンパク質量があると数百種類のタンパク質が同定されることが分かっているので、その解析で大まかな異常が分かると考えられる。

HKUPP は尿のプロテオミクス解析を行い、疾患バイオマーカーを発見することを目指している。成功すれば尿の分析で腎臓病の診断や病勢の把握などが可能になると期待されている。しかし、上述のように尿はもともと不安定になる運命を担っているものであり、その解析から意味のあるものを発見するのは容易ではない。これまで、多くの研究者がそれぞれの手法で尿を採取、保存、タンパク質を分離して、そのプロテオームを解析しているのでそれぞれの研究結果を比較、検証することは容易ではない。そこで、HKUPP は尿の採取法、処理法、保存法、解凍法、タンパク質の分離法などに関するガイドラインを根拠をあげて行おうとしている。さらに、このガイドラインに沿った尿のプロテオームが正常の人でも年齢、性別、人種による差の有無の検証、腎臓病で血漿タンパク質が大量に尿中にもれているタンパク尿のプロテオーム解析するためのガイドラインを提案し、その後のバイオマーカー探索研究を推進することを目指している。

### 3. ヒト腎糸球体プロテオミクスの問題点とその対策

1) 微量のタンパク質を感度良く検出することを目指す、ケラチンなど空気中の浮遊物に由来する夾雑物が非常に解析の妨げになる。そのため、一般的にとる研究室の空気の清浄、クリーンベンチの使用などを行ったが、十分な夾雑物の除去はできなかった。どの過程で混入してくるかなどを詳細に検討した結果、夾雑物の混入は使用するマイクロチューブの静電気によ

ることが明らかになり、静電気が起き難いマイクロチューブを使用することでその混入は90%以上抑制できた。

2) 凍結腎組織より作製した腎臓切片から、マイクダイセクション法で糸球体を切り出し、プロテオーム解析をした結果、同定したタンパク質には血漿タンパク質が非常に多いことが分かった。それはメッシュ法で単離したヒト腎糸球体のプロテオームと比べても突出していた。その原因は糸球体毛細血管内に血漿タンパク質が多く残ったまま凍結されていたためと考えられ、それを除くために切片作製後に切片をPBSで洗浄し、それらを取り除くことで解決できた。

3) 質量分析計で網羅的にタンパク質を同定するには反復して同一試料を解析する必要があった。一般的な質量分析計はペプチドを捕まえて (MS)、それをさらに分解して (MS/MS 解析)、アミノ酸配列を決定することを行っているため、非連続的に解析しており、1回の測定では検出されうるタンパク質を全て検出することはできない。そのために、同じサンプルを数回解析することが必要であった。糸球体切片由来のタンパク質のような微量なサンプルでは少なくとも4回、理想的には8回ぐらい解析する必要があった。1回の解析に必要な糸球体タンパク質は 0.2  $\mu\text{g}$  でそれを5回ほど行くと約1  $\mu\text{g}$  のタンパク質が必要になる。この量はヒト糸球体切片150枚から抽出されるタンパク質量に相当した。