

---

# プロテオミクス解析と質量分析を用いた IgA腎症の病因と病態の解明

佐藤晶子、宮川礼奈、林 英輝、橋間清香、松村洋寿、尾高雅文、

堂前 直\*、齋藤綾乃\*\*、小松田 敦\*\*、高橋直人\*\*、涌井秀樹

秋田大学大学院理工学研究科 生命科学専攻、

理化学研究所 生命分子解析ユニット\*

秋田大学大学院医学系研究科 血液・腎臓・膠原病内科\*\*

## Identification of IgA nephropathy-related proteins by proteomics analysis in an animal model

Akiko Sato, Rena Miyakawa, Hideki Hayashi, Sayaka Hashima,  
Hirotoshi Matsumura, Masafumi Odaka, Naoshi Dohmae\*, Ayano Saito\*\*,  
Atsushi Komatsuda\*\*, Naoto Takahashi\*\*, Hideki Wakui

Department of Life Science, Graduate School of Engineering Science,  
Akita University

Biomolecular Characterization Unit, RIKEN\*

Department of Hematology, Nephrology, and Rheumatology, Akita University  
Graduate School of Medicine\*\*

### <緒言>

IgA腎症は、最も患者数の多い慢性糸球体腎炎である。IgA腎症患者の約15-40%は、発症後20年で末期腎不全を呈する<sup>1)</sup>。IgA腎症の組織学的特徴は、免疫グロブリンの一種であるIgAが、糸球体に沈着することである。IgAを含む免疫複合体が、長期間にわたり糸球体に沈着し、炎症が惹起されることが、IgA腎症の発症機序の一因と考えられている<sup>2)</sup>。

しかしながら、IgA腎症の発症機序には不明な点が多く、根本的な治療法の開発のためにも、IgA腎症の発症や進行に関与する因子の同定が重要である。本研究では、IgA腎症の自然発症動物モデルを用い、腎症発症前後での腎タンパク質のプロテオミクス解析を試みた。

### <方法>

HIGAマウスは、高IgA血症ddYマウスとして樹立され、ヒトIgA腎症の自然発症モデルマウスとして、広く使用されている<sup>3)</sup>。約25週齢頃からIgA腎症の病態発現が明確となり、若週齢より血中IgA値が高いことが特徴である。本研究では、HIGAマウス5週齢を発症前、38週齢を発症後として用い、プロテオミクス解析と、免疫組織化学的解析を行った。

初めに、HIGAマウスから両側腎を摘出した。次に、左腎全体を破碎し、タンパク質抽出を行った。その後、理化学研究所にてLC-ESI-MS/MSという液体クロマトグラフィーと質量分析装置を組み合わせた装置を用いて、タンパク質の網羅的解析を行った。得られた質量から、MSCOTと呼ばれるプログラムを用いてタンパク質を一つ一つ同定し、IgA腎症発症前後における腎タンパク質のデータベースを構築した（図1）。

得られたデータベースを解析し、IgA腎症発症後に増加し、疾患と関連性があると考えられるタンパク質をリストアップした。以下に述べるタンパク質について、右腎組織での免疫染色を行い、発現パターンを観察した。

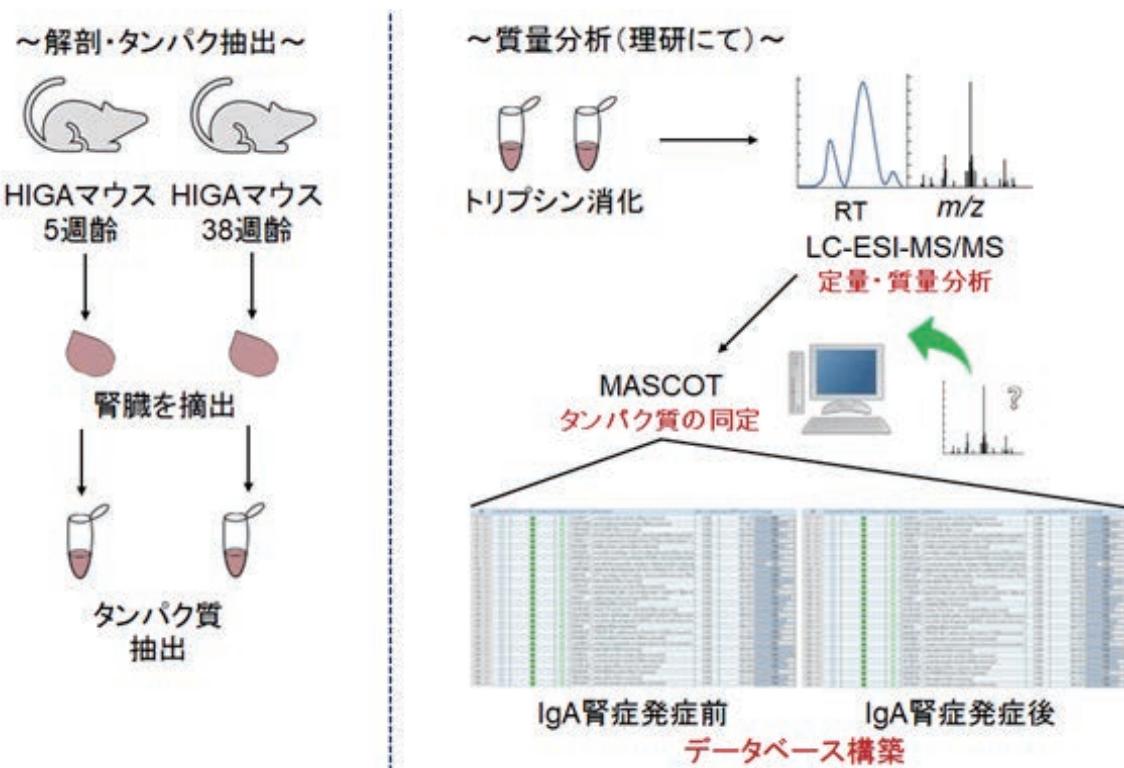


図1 実験手順

### <結果>

プロテオミクス解析の結果、全1,744種類のタンパク質が同定された。発症後に存在量が増加したタンパク質の上位には、抗酸化作用により腎保護に働くタンパク質（ferritin light/heavy chains<sup>4)</sup>など）がみられた。今回は、ferritin light/heavy chainsに注目し、IgA腎症発症前後の腎組織での免疫染色を行った。

Ferritin light chainの免疫染色像（図2）では、IgA腎症発症前後で、糸球体のポドサイトおよび近位尿細管細胞の細胞質（特に管腔側）での染色性が観察された。また、腎症発症後の腎組織での染色性が強かった。腎症発症前の腎組織では、主にポドサイトと近位尿細管細胞の管腔側の染色性が部分的にみられる一方で、腎症発症後ではそれに加え、近位尿細管細胞の細胞質全体での染色

性も観察された。以上の結果から、ferritin light chainは、腎症発症後の腎組織において、より広範に発現量が増加したことが示された。

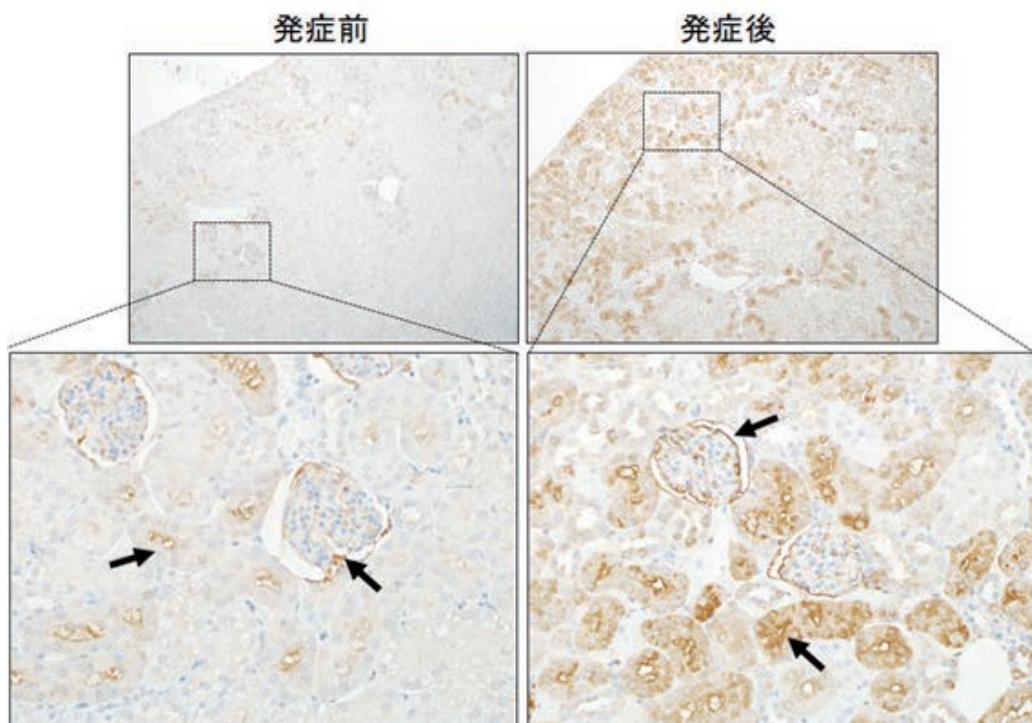


図2 Ferritin light chainの腎組織免疫染色像  
矢印は、糸球体ポドサイト、近位尿細管細胞での染色性を示す。

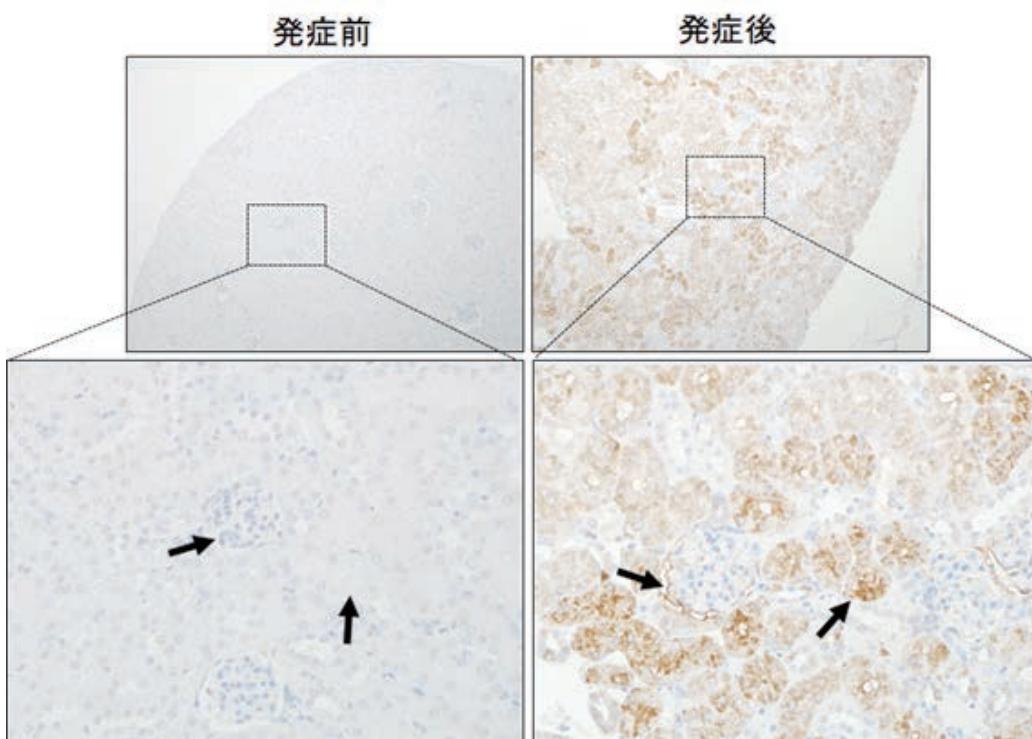


図3 Ferritin heavy chainの腎組織免疫染色像  
矢印は、糸球体ポドサイト、近位尿細管細胞での染色性を示す。

Ferritin heavy chainの免疫染色像（図3）では、IgA腎症発症前の腎組織には、染色性は観察されなかった。一方、腎症発症後の腎組織では、糸球体のポドサイトおよび近位尿細管細胞の細胞質（特に管腔側）に、強い染色性が観察された。以上の結果から、ferritin heavy chainは、light chainと比べてより特異的に、腎症発症後の発現量が増加することが示された。

#### ＜考察＞

IgA腎症発症後のHIGAマウス腎組織に発現増加が観察されたferritinは、全身の組織、マクロファージ、血中に広く分布するタンパク質である。図4に、ferritinの構造と機能<sup>5)</sup>を示す。Light chainとheavy chainから成る24の外郭サブユニットが組み合わさった、中空かご状のタンパク質である。内部に約4,500個の鉄原子を貯蔵する鉄貯蔵タンパク質として働き、ヘム代謝経路の一部を担っている。構成する2種類の鎖のうち、light chainはferritinのタンパク質構造の安定化と、鉄の取り込みに働く。一方で、heavy chainは、組織障害性のある遊離二価鉄を、安定な酸化鉄に変換するフェロキシダーゼ活性 ( $4\text{Fe}^{2+} + 4\text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 4\text{Fe}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O}$ ) を有している。二価鉄は反応性が高く、生体内において、過酸化水素との反応であるフェントン反応 ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} \cdot + \text{OH}^-$ ) を起こし、生体にとって有害な活性酸素種産生の原因となるヒドロキシラジカル ( $\text{OH} \cdot$ ) を生成する。したがって、heavy chainによる二価鉄の無毒化は、鉄による組織障害を防ぐためには必須であり、組織保護作用の中心的な役割を担っているといえる。

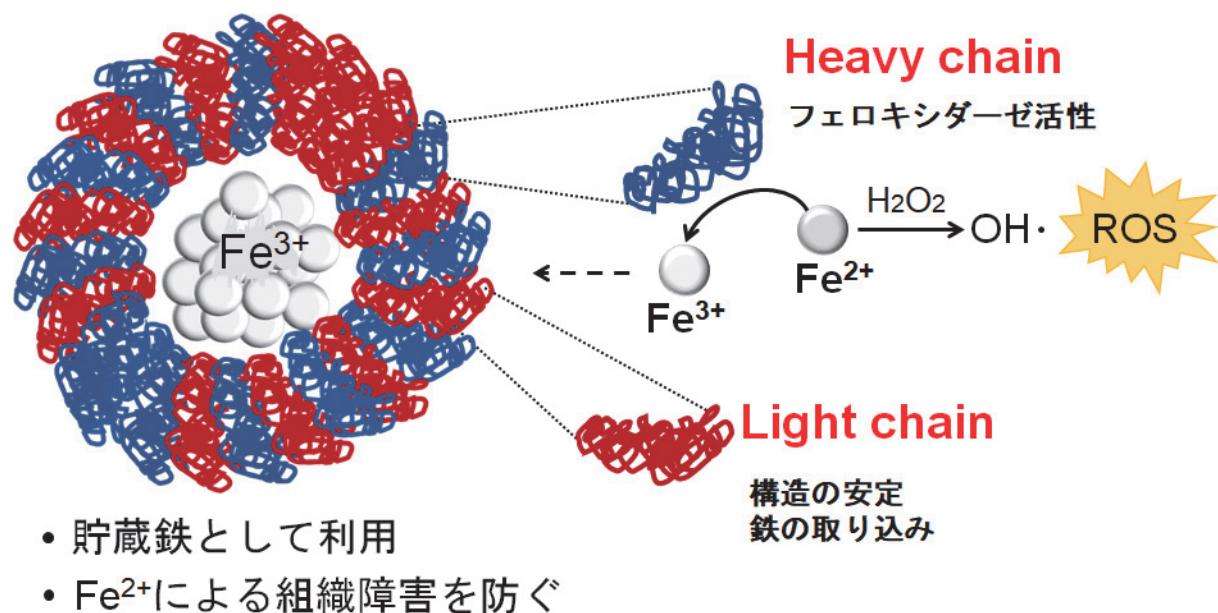


図4 Ferritinの構造と機能  
ROS: reactive oxygen species

Ferritin light chainとheavy chainは、異なるmRNAでコードされ、ferritinを構成する両鎖の割合も、組織の種類や生理条件によって異なる<sup>4)</sup>。また、炎症やウイルス感染など、生体にストレスがかかった場合、heavy chainの発現量が増加すると報告されている<sup>6)</sup>。Heavy chainは、light

chainと比べてより組織障害性との関連性が強く、heavy chainの発現とIgA腎症の発症との間に何らかの関係性があると考えられる。IgA腎症におけるferritinの腎保護作用を、図5のように考察した。①IgA腎症の発症に伴い、障害された糸球体濾過バリア（ポドサイトを含む）から、トランسفェリン、フリーへム、ヘムタンパク質といった鉄を含有する分子が尿中に漏出し、②近位尿細管で再吸収される。鉄含有分子の再吸収に伴い、尿細管細胞内での過剰鉄による活性酸素種の产生と、これによる尿細管細胞への障害を、③鉄貯蔵タンパク質であるferritinの発現が増加することで抑制し、④腎不全などの更なる病態の悪化を防ぐのではないかと考えられる。

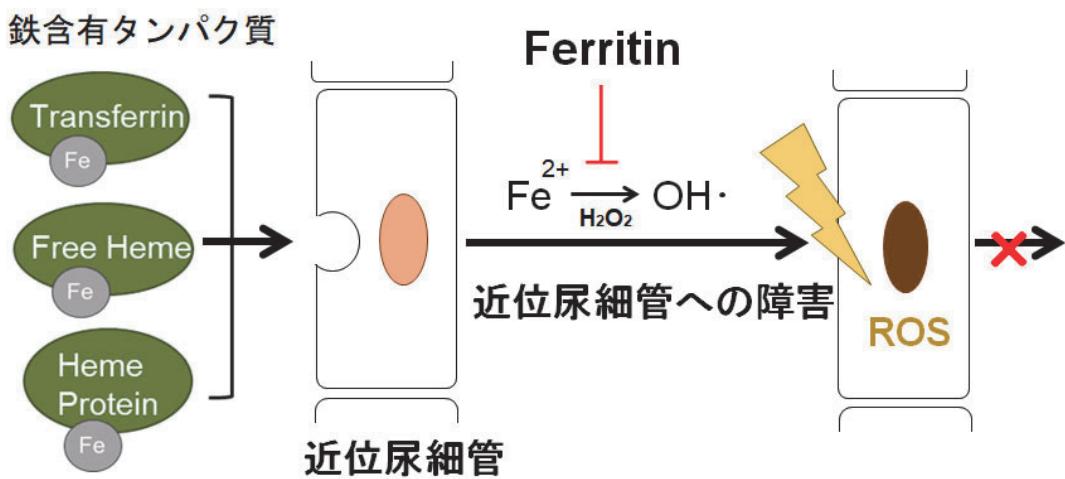


図5 HIGAマウスIgA腎症におけるferritinの腎保護作用（仮説）  
ROS: reactive oxygen species

### ＜結語＞

IgA腎症の自然発症モデルマウスで、腎タンパク質のプロテオミクス解析を行い、腎症発症後に増加した腎タンパク質を同定できた。また、免疫組織化学的解析でも同様に、腎症発症前後で発現パターンの相違を観察できることから、プロテオミクス解析が、IgA腎症の病因と病態の解明に有用であることを確認した。

しかしながら、IgA腎症の発症後に増加していたタンパク質の中には、加齢との関連性を否定できないタンパク質も含まれていたことから、現在、C57BL/6Nマウスをコントロールとしたプロテオミクス解析を進めている。

### ＜文献＞

- Berthoux FC, Mohey H, Afiani A: Natural history of primary IgA nephropathy. Semin Nephrol 28: 4–9, 2008.
- Wyatt RJ, Julian BA: IgA nephropathy. N Engl J Med 368: 2402–2414, 2013.
- Tomino Y: IgA nephropathy: lessons from an animal model, the ddY mouse. J Nephrol 21: 463–467, 2008.

- 
4. Hatcher HC, Tesfay L, Torti SV, et al.: Cytoprotective effect of ferritin H in renal ischemia reperfusion injury. PLoS One 10: e0138505, 2015.
  5. Harrison PM, Arosio P: The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochim Biophys Acta 1275: 161–203, 1996.
  6. Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, et al.: Ferritin heavy chain upregulation by NF- $\kappa$ B inhibits TNF  $\alpha$ -induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. Cell 119: 529–542, 2004.