

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09654

研究課題名(和文) RAS系による腎臓での造血制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the regulation system of erythropoiesis in the kidney by renin-angiotensin-aldosterone system

研究代表者

野々口 博史 (Nooguchi, Hiroshi)

北里大学・北里大学メディカルセンター・医員(医師)

研究者番号：30218341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：エリスロポエチン(Epo)のウェスタンブロット(WB)での検出法を検討した。尿、臓器のEpoは34-43kDaのバンドとして検出されたが、血漿をそのままではバンドは検出できなかった。血漿を脱糖鎖バッファー(PNGaseなし)とインキュベートすると、34-43kDaにEpoのバンドが出現した。そのバンドは脱糖鎖で22kDaにシフトした。22kDaのバンド切り出して、LC/MS解析を行い、ヒトEpoと証明した。低酸素ラットの腎皮質では、34-43kDaのEpo発現は10-20倍の増加にとどまったが、22kDaのEpo発現は、腎で400倍増加した。

脱糖鎖でWBでのEpo検出が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エリスロポエチンの検出は、ドーピングも行われており、私たちの方法を用いることで、簡単に血液や尿中のエリスロポエチンの検出ができるようになり、種々のスポーツ競技の公正な実施に役立てることが可能であり、社会的な意義は極めて高いと思われる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the detection of erythropoietin protein by Western blot analysis. Epo protein was detected at 34-43 kDa, which was shifted to 22 kDa by deglycosylation. Using this new method, we found that erythropoietin production by the kidney is increased by 600-fold in response to severe hypoxia. The Epo production by the liver was not stimulated by severe hypoxia. We further succeeded in detecting Epo in urine and blood by Western blotting. Urinary Epo was detected by direct application of urine sample to SDS-PAGE. In contrast, Epo band was not seen by direct application of blood to SDS-PAGE. Incubation of blood sample with deglycosylation buffer without PNGase showed Epo band at 34-43 kDa. The band at 34-43 kDa shifted to 22 kDa by deglycosylation by PNGase.

Using our new Western blotting, the detection of Epo protein in tissue, blood and urine has become possible.

研究分野：腎臓内科

キーワード：エリスロポエチン 低酸素 貧血 ウェスタンブロット 脱糖鎖

1. 研究開始当初の背景

エリスロポエチンの産生制御機構の研究は、主に、血中エポ濃度と遺伝子発現で検討されていた。それは、Western blot 法などによる蛋白発現の検出が出来なかったことが大きな理由である。Western blot でエポ蛋白の検出が出来ないことから、多くの研究者は、エポは腎臓での産生後、すぐに血中や尿中に分泌されるため Western blot での検出は出来ないと考えようになっていた。Epo のドーピングにおいても、サンプルの Epo を精製後に、isoelectrical focusing (IEF)や SAR-PAGE を行うことを世界アンチドーピング機構 (World Anti-Doping Agency, WADA) は推奨している、直接 Western blot を行うことはできないとしていた。

2. 研究の目的

Western blot 法では、検出できないとこれまで 30 年間考えられていたエポ蛋白を Western blot 法と免疫染色法で検出し、その産生制御機構を明らかにすることが、本研究の目的であった。

3. 研究の方法

エポ蛋白の検出は、Western blot 法と免疫染色法の二つを用いた。Western blot 法は、当然ながら、決まった方法はなく、抗体選びから開始した。合成エポが入手できるようになり、参考にはなったが、腎で産生されたエポ蛋白が、本当にエポを認識しているのかを確認する必要があった。そこで、抗原ペプチドによる抗体吸収試験を用いることにした。組織としては、正常ラットの腎皮質を用いた。抗体溶液に、前もって、合成エポを入れてインキュベートしておくことで、抗体がペプチドに吸収され、抗体の力価が低下するため、Western blot でのバンドが薄くなることが期待された。さらには、エポは糖蛋白であり、糖鎖がたくさんついていることで分子量が大きくなっており、脱糖鎖でそれらの糖鎖をとる脱糖鎖も用いることにした。ESA 製剤は、糖鎖が付加されており、脱糖鎖は、それらの鑑別にも有用と考えられた。

4. 研究成果

まずは、数種類の市販の抗エポ抗体を用いて、腎組織での Western blot で検討した。普通の Western blot では、どの抗体を用いても、複数のバンドが出てははっきりしなかった。そこで、合成エポを用いたペプチド抗原を用いた吸収試験を行った。その結果、sc-7956 で、エポのバンドが正常ラット腎皮質 37kDa に出現し、合成エポで吸収されることが明らかとなった。そのバンドは、外因性アルドステロンであるフロリネフ投与で増強し、吸収試験で薄くなることから、エポのバンドであることが確認された。しかし、フロリネフ投与では、血中エポ濃度は正常の 2 倍程度にしか上昇せず、腎でのエポ産生が大きくないことが分かった。さらに、sc-7956 と同じ抗原でもモノクローナル抗体である sc-5920 がよりよくエポ蛋白を認識することが明らかとなった。

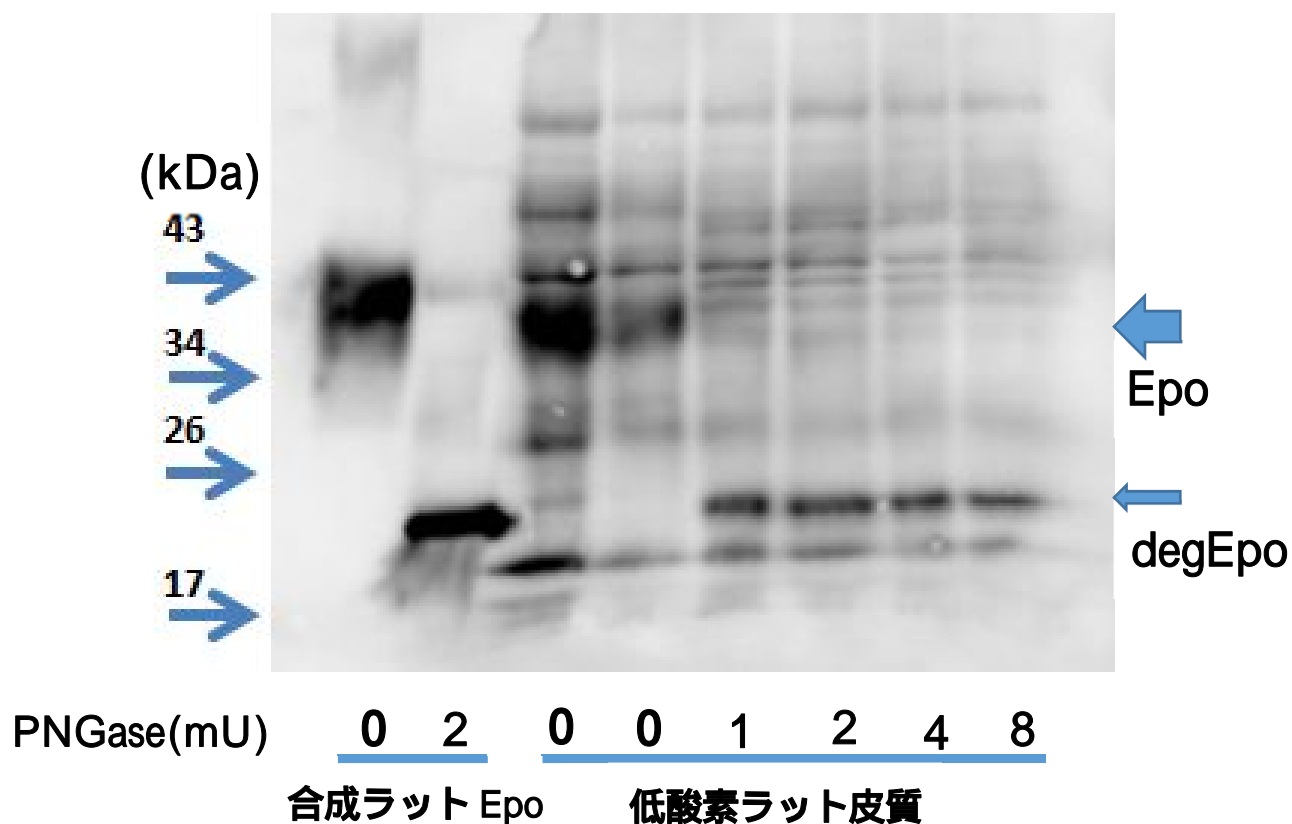
次に、エポ産生刺激でよく知られている低酸素を用いた。この実験は、共同研究者の安岡先生が行った。普通 21%ある酸素濃度を 7%にすることで、腎でのエポ産生が大きく刺激された。7%酸素は、エベレスト頂上と同程度の酸素濃度であるが、その環境にラットを 4 時間置くことで、血漿エポ濃度は 500 倍にも上昇した。そのラットの腎皮質を用いた Western blot では、37-42 kDa の幅広いバンドを認めた (図のレーン 3, 4)。次に、ペプチド抗原による吸収試験を用いずに、脱糖鎖を行った。その結果、37-42 kDa の幅広いバンドは、PNGase により 22 kDa にシフトすることが分かった (図のレーン 5-8)。この脱糖鎖を用いたことで、エポのバンドは、産生量により 34-43 kDa に細いものから幅広いものまで出現し、脱糖鎖で 22 kDa の細いバンドにシフトすることが明らかとなった。

そこで、7%酸素 4 時間の低酸素ラットを用いて、血漿エポ濃度の 500 倍の上昇が、腎によるものか、肝によるものかを検討した。腎でのエポ産生は、普通の Western blot では、10 倍程度しか増加していなかった。サンプルを脱糖鎖試薬と 15-20 時間インキュベートし脱糖鎖を行うが、脱糖鎖の酵素である PNGase なしでのインキュベーションでも、エポのバンドはわかりやすくなり、低酸素で 20 倍程度上昇することが分かった。さらに、PNGase を用いた 22 kDa の脱糖鎖エポバンドは、血漿エポ濃度と同程度の 600 倍程度も上昇することが明らかとなった。エポは、糖鎖が付いているため幅広バンドであるが、脱糖鎖でバンドが細く集約されて、検出感度が最低でも 10 倍以上良くなることも判明した。この脱糖鎖エポを測定することで、肝でのエポ産生は低酸素では全く刺激されないことも明らかとなった。

次に、臓器でなく、血中、尿中エポの検出法の開発に移った。私たちが開発した Western blot 法を用いると、尿、臓器の Epo は 34-43kDa の幅広バンドとして検出され、PNGase による脱糖鎖で 22kDa に細いバンドとしてシフトした。一方、血漿をそのままウェスタンブロットに用いて

も、バンドは検出できなかった。血漿を脱糖鎖バッファー（PNGaseなし）と20時間インキュベートすると、34-43kDaにEpoのバンドが出現し、脱糖鎖で22kDaにシフトした。ESA製剤であるエスポー、ネスプは、ラットの大量に投与すれば、血中、尿中ともに検出出来、脱糖鎖で22kDaに移動した。半減期が一番長いESA製剤であるミルセラは、PEGが付いているため脱糖鎖で95-125kDaから80-95kDaにシフトし、ラットのみならず、CKD患者でも血中で検出出来た。脱糖鎖後の22kDaのバンドがEpoであることを証明するために、重度の貧血患者さんの尿を濃縮し、ウェスタンブロットを行い、ゲルからバンドを切り出して、Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MS)解析を行ったところ、ヒトEpoであることが証明された。同時に、脱糖鎖を行うことで、Epoの検出感度が10-100倍増加することも明らかとなった。

以上より、脱糖鎖を組み合わせたウェスタンブロットを用いることで、エリスロポエチン蛋白を血液、尿、臓器で検出できることが明らかとなった。また、低酸素でのEpo産生増加は、腎臓が行っており、肝臓での産生はないことが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yasuoka Y, Izumi Y, Nagai T, Fukuyama T, Nonoguchi H, et al.	4. 巻 503
2. 論文標題 Fludrocortisone stimulates erythropoietin production in the intercalated cells of the collecting ducts.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 3121-3127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.08.102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Eguchi K, Izumi Y, Nakayama Y, Inoue H, Nonoguchi H, et al.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Insufficiency of urinary acid excretion of overweight or obese patients with chronic kidney disease and its involvement with renal tubular injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nephrology (Carlton)	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nep.13553.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuyama T	4. 巻 31
2. 論文標題 Correlation between expression of the cancer/testis antigen	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 403-407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） unknown	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shimada Y	4. 巻 56
2. 論文標題 Edoxaban was Effective for Treating Renal Vein Thrombosis in a Patient with Nephrotic Syndrome.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 2307-2310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.8742-16.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Izumi Y	4. 巻 12
2. 論文標題 TSS-Seq analysis of low pH-induced gene expression in intercalated cells of the renal collecting duct	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLos One	6. 最初と最後の頁 e0184185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0184185.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukuyama T, Nonoguchi H, et al.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Correlation between expression of the cancer/testis antigen	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.6b01621	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Yasuoka Y, Nonoguchi H, et al.
2. 発表標題 Fludrocortisone stimulates erythropoietin (Epo) protein expression in the distal tubules.
3. 学会等名 Annual Meeting of the American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Izumi Y, Nonoguchi H, et al.
2. 発表標題 Effects of TGF- 1 on the Activity of NFAT5, an Osmoprotective Transcription Factor
3. 学会等名 Annual Meeting of the American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安岡有紀子, 野々口博史ら
2. 発表標題 酸負荷マウスにおけるアンモニア輸送関連遺伝子の発現量解析
3. 学会等名 日本腎臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nonoguchi H, et al.
2. 発表標題 Fludrocortisone time-dependently up-regulates erythropoietin (Epo) mRNA Expression via HIF2 pathway in Rat Kidney.
3. 学会等名 Annual Meeting of the American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasuoka Y, et al.
2. 発表標題 Fludrocortisone-regulated production of erythropoietin (Epo) in mouse kidney nephron.
3. 学会等名 Annual Meeting of the American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Izumi Y, et al.
2. 発表標題 Urinary acid excretion in overweight chronic kidney patients
3. 学会等名 Annual Meeting of the American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 泉裕一郎ら
2. 発表標題 NFAT5とEGR1を介した浸透圧変化とpH変化の相互作用の検討
3. 学会等名 日本腎臓学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安岡有紀子ら
2. 発表標題 NH4Cl負荷マウスの尿酸性化にTALのアンモニア(NH3/NH4)輸送は必須である
3. 学会等名 日本腎臓学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nonoguchi H, et al.
2. 発表標題 Aldosterone and vasopressin are erythropoietic hormones
3. 学会等名 Annual Meeting of the American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yasuoka Y, et al.
2. 発表標題 Decreased renal threshold for urinary excretion of ammonia underlies proximal renal tubular acidosis in TASK2 K+ channel-deficient mice
3. 学会等名 Annual Meeting of the American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 河原克雅ら
2. 発表標題 部分腎摘マウスのNestin誘導
3. 学会等名 日本腎臓学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 泉裕一郎ら
2. 発表標題 低pH刺激による間在細胞内遺伝子発現変動のTSS-Seqを用いた網羅的解析
3. 学会等名 日本腎臓学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 安岡有紀子ら
2. 発表標題 低Pi食飼育マウスの代謝性アシドーシス-アルカリ尿の病態生理機序
3. 学会等名 日本腎臓学会総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 エリスロポエチンを検出する方法及びキット	発明者 野々口博史	権利者 北里研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-061592	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	泉 裕一郎 (Izumi Yuichiro) (20736243)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教 (17401)	
研究分担者	安岡 有紀子 (Yasuoka Yukiko) (50348504)	北里大学・医学部・講師 (32607)	
研究分担者	河原 克雅 (Kawahara Katsumasa) (70134525)	北里大学・医学部・教授 (32607)	