

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15523

研究課題名(和文)多層的プロテオーム解析による小児先天性腎疾患尿中バイオマーカー開発

研究課題名(英文)Proteomic analysis of urinary exosome of pediatric kidney diseases

研究代表者

張田 豊 (Harita, Yutaka)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10451866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：先天性腎尿路異常やネフロン癆は腎不全に至る小児腎疾患としては稀ではない。しかしこれらの尿中バイオマーカーが存在せず、早期診断が困難である。本研究では患者の尿中に放出される微小分泌小胞「エクソソーム」を解析し、簡便かつ鋭敏な診断が可能となる疾患マーカーの同定を目指す。東京大学小児科ほか協力施設から小児腎疾患患者(ネフロン癆、先天性腎尿路異常など)の尿サンプルを収集し、尿中エクソソーム分画の精製ののちに質量解析により蛋白を網羅的に解析した。これらの結果は早期診断への道を開くのみならず、いまだ明らかになっていないCAKUTやネフロン癆の発症や進行における分子メカニズムの解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Because there is no urinary biomarker for congenital anomalies of kidney and urinary tract (CAKUT) or nephronophthisis, their diagnosis is often made after irreversible deterioration of renal function. In this study, we aimed at identification of biomarker for pediatric kidney diseases by analyzing urinary exosome by quantitative proteomics. We collected urine samples of patients with nephronophthisis, CAKUT or vesicoureteral reflux, and purified exosome fraction from urine for proteomic analysis. The results will reveal the diagnostic marker and may pave the way to unravel the mechanism by which pediatric kidney diseases develop and progress.

研究分野：小児科学

キーワード：エクソソーム ネフロン癆 先天性腎尿路異常

1. 研究開始当初の背景

小児慢性腎不全の三大原因は低形成腎や異形成腎のような先天性腎尿路異常 (congenital anomalies of kidney and urinary tract: CAKUT)(35%)、先天性ネフローゼ症候群や巣状分節性糸球体硬化症(19%)、そして若年性ネフロン癆(5%)である。このうち、先天性ネフローゼ症候群・巣状分節性糸球体硬化症は蛋白尿により比較的容易に発見されるが、CAKUTとネフロン癆は早期診断マーカーがないため、医学的な介入の機会を逸し末期腎不全となつてから発見される症例も多い。

尿中バイオマーカーの探索を目的とした研究はこれまでに数多く行われてきたにもかかわらず、CAKUTやネフロン癆の早期発見につながるマーカーは開発されていない。その原因はこれらの疾患では血尿蛋白尿を生じず、また希釈尿となることが多いため尿そのものの解析では尿中に極微量含まれる疾患特異的マーカー候補の検出が困難だったからである。諸外国においては本邦のような三歳児検尿や学校検尿システムが存在しないが、我が国では小児腎疾患の早期発見を目指した社会的体制(学校検尿等)が確立されており、現在診断が困難な疾患の診断マーカーを本邦で確立する意義は大きい。

2. 研究の目的

本研究では病因細胞の分子情報を保有しながら尿中に放出される微小分泌小胞「エクソソーム」に着目した。エクソソームは直径40~100 nmの脂質二重膜小胞であり、産生元細胞の蛋白質や核酸を他の組織に輸送する新たな細胞間コミュニケーション構造体として注目を集めている。特に、病因細胞において特異的に発現している分子群も体液中のエクソソームから検出可能であることより、革新的なバイオマーカーリソースと言える。

これまでに血中エクソソームを用いた癌診断開発研究が進んでいるが、尿中エクソソームを利用したCAKUTやネフロン癆の早期診断を検討した報告は未だない。従って、本研究開発を通して将来的にこれら小児腎疾患の非侵襲的診断が可能となれば、尿中のエクソソーム蛋白質を検出することによりあらゆる泌尿器系疾患の簡便かつ鋭敏な診断が可能であることを示すマイルストーン的な成果となり得る。

この解析によって尿中の超微量蛋白質から小児腎疾患バイオマーカーが同定されれば、市販妊娠検査薬同様のイムノクロマトグラフなどを利用した極めて簡便で安価な診断法の開発が可能となり、世界的な普及に繋がること期待される。

3. 研究の方法

(I)尿サンプル収集

先天性尿路奇形(CAKUT)および若年性ネ

フロン癆の尿サンプルの収集を行う。東京大学小児科、東京女子医大腎臓小児科のほか、協力医療機関である東京都立小児病院、東邦大学大森病院腎センター、都立墨東病院等から(1)CAKUT患者(低形成腎、水腎尿管症、膀胱尿管逆流症、多嚢胞性異形成腎)、(2)ネフロン癆患者サンプルと(3)正常コントロール(腎臓病以外の疾患で施行された検尿)サンプルのサンプルを収集する。

(II)尿中エクソソームの分画精製

多段階遠心分離を行い、このステップの上清を液性成分として回収する。さらに沈殿画分をPBSにて洗浄し、100,000×gの超遠心で再沈降させる。この洗浄工程をもう一度繰り返す。最終的に得られた沈殿画分を尿中エクソソームとする。

また超遠心法に加え、ホスファチジルセリン(PS)に結合する蛋白質と磁気ビーズを利用した新規アフィニティー法(PSアフィニティー法)(MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS)により、PSを膜表面に有するエクソソームを含む細胞外小胞を単離した。

(III)尿中エクソソームのLC/MS分析

分泌蛋白質や膜蛋白質を強力に変性させることが可能なように調製したデオキシコール酸とラウロイルサルコシン酸の混成界面活性剤溶媒でエクソソーム構成蛋白質を完全に溶解させ、還元アルキル化、トリプシン消化を行う。混成界面活性剤を酢酸エチル抽出で、無機塩を逆相抽出でそれぞれ除去し、高分解能質量分析装置LTQ-Orbitrap-Velos(Thermo Scientific社)にてLC/MS分析を行う。

4. 研究成果

研究協力施設を含めた各施設の倫理委員会での承認を経て小児腎臓病患者の尿サンプル合計48サンプルおよびコントロールサンプルを収集することができた。この中にはネフロン癆患者(および疑い例)7名、両側低形成腎患者14名、両側膀胱尿管逆流症7名を含んでいる。また腎機能低下例(eGFR<60)が20例あった。

超遠心機によるエクソソーム分画の精製の技術的安定性が問題となり、一部のサンプルのエクソソーム精製が不可能となった。厳密に統一した方法で全サンプルの処理を行うことがサンプル間の比較にとっては極めて重要であるため、新規アフィニティー法で新たに全サンプルのエクソソーム精製を行い、解析に供することとした。

成人および希釈尿を呈する小児においてもエクソソーム分画の精製に成功し、これは得られた蛋白分画の解析により既知のエクソソームマーカーが多数検出されることにより確認された。現在患者サンプルの質量分析を進めており、得られた結果についてIn-houseのプロテオーム解析サーバーモジュールを用いた蛋白質の同定、及び相対定量

化処理を行っている。定量情報を用い、各種腎疾患群と健常者群間で比較を行い、有意差をもって腎疾患群で特異的に発現上昇する尿中エクソソーム蛋白質を同定する。得られた結果について今後公表を予定している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 18 件)

Harita Y. Application of next-generation sequencing technology to diagnosis and treatment of focal segmental glomerulosclerosis. Clin Exp Nephrol. 22:491-500, 2018

Udagawa T, Harita Y., Miura K, Mitsui J, Ode KL, Morishita S, Urae S, Kanda S, Kajihyo Y, Tsurumi H, Ueda HR, Tsuji S, Saito A, Oka A. Amnionless-mediated glycosylation is crucial for cell surface targeting of cubilin in renal and intestinal cells. Sci Rep. 5:8(1):2351, 2018.

Harita Y., Kitanaka S, Isojima T, Ashida A, Hattori M. Spectrum of LMX1B mutations: from nail-patella syndrome to isolated nephropathy. Pediatr Nephrol. 32(10):1845-1850, 2017

Komabayashi Y, Kishibe K, Nagato T, Ueda S., Takahara M, Harabuchi Y. Circulating Epstein-Barr virus-encoded micro-RNAs as potential biomarkers for nasal natural killer/T-cell lymphoma. Hematol Oncol. 35(4):655-663, 2017

Kanda S., Horita S, Yanagihara T, Shimizu A, Hattori M. M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) glomerular staining in pediatric idiopathic membranous nephropathy. Pediatr Nephrol. 32(4):713-717, 2017

Sakha S, Muramatsu T, Ueda K., Inazawa J. Exosomal microRNA miR-1246 induces cell motility and invasion through the regulation of DENND2D in oral squamous cell carcinoma. Sci Rep. 6:38750, 2016

Konomoto T, Imamura H, Orita M, Tanaka E, Moritake H, Sato Y, Fujimoto S, Harita Y., Hisano S, Yoshiura K, Nunoi H: Clinical and histological findings of autosomal dominant renal-limited disease with LMX1B mutation. Nephrology. 21(9):765-73. 2016

Tsurumi H, Kurihara H, Miura K, Tanego A, Ohta Y, Igarashi T, Oka A, Horita S, Hattori M, Harita Y.: Afadin is localized at cell-cell contact sites in mesangial cells and regulates migratory polarity. Lab Invest. 96:49-59, 2016

神田 祥一郎, 服部 元史 先天性腎尿路生殖器症候群 発達腎研究会誌 25 巻 1 号 Page21-25, 2017

張田豊: ネイルパテラ症候群(爪膝蓋骨症候群)/LMX1B 関連腎症の特徴と治療の実際 新薬と臨床 66 巻 12 号 Page1592-1596, 2017

張田豊: ネフローゼの病因論 小児内科 49 巻 4 号 Page479-483, 2017

張田豊: Fetomaternal Alloimmunity 腎臓内科・泌尿器科 5 巻 4 号 Page408-412, 2017

張田豊: 【小児臨床検査のポイント 2017】尿一般検査 尿量、尿 pH、尿比重、尿浸透圧、尿潜血、尿蛋白、尿沈渣 小児内科 49 巻増刊 Page13-17, 2017

張田豊: Developmental Origin of Health and Disease(DOHaD)学説と腎臓 日本腎臓学会誌 59 巻 8 号 Page1240-1243, 2017

張田豊: ネフローゼ症候群の発症機序 日本小児科学会雑誌 120 巻 1186-1194, 2016

張田豊: 微小変化型ネフローゼ症候群 腎と透析 81:67-71, 2016

浦江聖也, 張田豊: ネフローゼの病態解明 腎臓内科・泌尿器科 4:371-375, 2016

張田豊: 遺伝的腎疾患 爪膝蓋骨症候群および LMX1B 関連腎症 腎と透析 80 巻増刊: 277-280, 2016

北中幸子, 張田豊: nail-patella 症候群(爪膝蓋骨症候群) 小児科診療 79 巻増刊: 203, 2016

[学会発表](計 22 件)

張田豊: 遺伝子から見た嚢胞性腎疾患(講演) 神奈川県予防医学協会、横浜、2017 年 9 月 30 日

張田豊: 小児腎不全医療の新たな診断・取り組み(シンポジウム) 腎疾患における遺伝子解析の実際 第 39 回日本小児腎不全学会学術集会、淡路、2017 年 9 月 22 日

神田祥一郎、堀田茂、金子直人、菅原典子、張田豊、三浦健一郎、岡明、大村谷昌樹、古川徹、服部元史: CAKUT の新規原因遺伝子の同定・遺伝子 X の同定とマウスを用いた解析- 第 26 回発達腎研究会、福岡、2018 年 8 月 27 日

張田豊: ゲノム情報を臨床へ～遺伝性腎疾患へのアプローチ～ 変異の病原性判断と家族への説明(シンポジウム) 第 52 回日本小児腎臓病学会学術集会、東京、2017 年 6 月 1 日

Tomohiro Udagawa, Kenichiro Miura, Shoichiro Kanda, Akihiko Saito, Yutaka Harita: Mutations of Amnionless gene cause tubular proteinuria through defect in complex formation with cubilin 第 52 回日本小児腎臓病学会学術集会、東京、2017 年 6 月 1-3 日

張田豊: 早産・低出生体重の腎臓に及ぼす影響 「DOHaD と腎疾患」(シンポジウム) 第 39 回腎臓セミナー Nexus Japan、東京、2017 年 8 月 26 日

張田豊: 特発性ネフローゼ症候群の成因と治療 臨床から見たネフローゼ 液性因子を中心に 日本小児腎臓病学会学術集会 2016 年

7月7日～9日

張田豊：LMX1B 関連腎症：実態調査による新たな疾患概念の確立 日本腎臓学会学術集会 横浜 2016年6月17日～19日

張田豊：妊娠と新生児糸球体疾患（シンポジウム）第60回日本腎臓学会学術総会 仙台、2017年5月27日

滝澤慶一、富井裕治、宮部瑠美、笹田洋平、金子直人、藪内智朗、佐藤泰征、石塚喜世伸、近元祐子、堀田茂、張田豊、三浦健一郎、服部元史 低形成腎に合併した膜性腎症の検討 第52回日本小児腎臓病学会学術集会、東京、2017年6月1～3日

橋本多恵子、張田豊、三浦健一郎、秋岡祐子、久野正貴、堀江弘、荻野大助、三井哲夫、田宮元、山口裕、早坂清、服部元史 孤発性ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群として発症したLAMB2 遺伝子変異例 第52回日本小児腎臓病学会学術集会、東京、2017年6月1～3日

金子直人、三浦健一郎、富井裕治、柏木保代、神田祥一郎、張田豊、橋本多恵子、藪内智朗、石塚喜世伸、近本裕子、秋岡祐子、田邊一成、服部元史 WT1 変異には非典型的な多発腎嚢胞を認めた先天性ネフローゼ症候群の1女兒例、第60回日本腎臓学会学術集会 仙台、2017年5月26～28日

Udagawa T, Miura K, Saito A, Harita Y: Defects in N-Glycosylation of Cubilin Result in Tubular Proteinuria, ASN Renal Week 2016, Chicago, November 15-20, 2016

Udagawa T, Miura K, Saito A, Harita Y: Glycosylation defects of Cubilin cause Imerslund-Gräsbeck syndrome, China-Japan-Korea Pediatric Nephrology Seminar, Beijing, May 7, 2016

Harita Y, Kitanaka S, Isojima T, Ashida A, Hattori M: Clinicopathological analysis of nephronopathy caused by LMX1B abnormalities. Asian Society of Pediatric Research, Bangkok, November 10-11, 2016

張田豊、小林里実：難治性ネフローゼ症候群に続発した好酸球性膿疱性毛包炎日本腎臓学会東部学術集会 東京 2016年10月7日～8日

宇田川智宏、徐東博、柳原剛、清水章、張田豊：ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の原因としてのCRB2変異 日本腎臓学会東部学術集会 東京 2016年10月7日～8日

徐東博、楊井瑛美、吉崎薫、柳原剛、五十嵐徹、伊藤保彦、宇田川智宏、張田豊：肺炎球菌性髄膜炎を伴った、新規CRB2変異によるステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の一例 東京腎炎ネフローゼ研究会 東京 2016年7月23日

三浦健一郎、張田豊、鶴見晴子、安戸裕貴、磯島豪、滝澤慶一、豊福悦史、西本創、高見澤勝、須川正啓、柳澤敦広、稲富

淳、野木森宜嗣、絹巻暁子、生井良幸、岡明：川崎病における低Na血症の発症機序の検討 日本小児腎臓病学会学術集会 名古屋 2016年7月7日～9日

張田豊、三浦健一郎、小林里実 リツキスマブを用いた難治性ネフローゼの治療中に好酸球性膿疱性毛包炎を発症した一例 日本小児腎臓病学会学術集会 名古屋 2016年7月7日～9日

宇田川智宏、三浦健一郎、斎藤亮彦、張田豊：Cubilin 糖鎖修飾異常は近位尿細管再吸収機能障害を起こし蛋白尿の原因となる日本小児腎臓病学会学術集会 名古屋 2016年7月7日～9日^^

宇田川智宏、三浦健一郎、斎藤亮彦、張田豊：Cubilin 依存的近位尿細管再吸収の分子機構 日本腎臓学会学術集会 横浜 2016年6月17日～19日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

張田豊 (HARITA, Yutaka)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10451866

(2)研究分担者

神田祥一郎 (KANDA, Shoichiro)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60632651

(3)連携研究者

上田幸嗣 (UEDA, Koji)
がん研究会ゲノムセンター・ゲノムセンター・プロジェクトリーダー
研究者番号：10509110

(4)連携研究者

服部元史 (HATTORI, Motoshi)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：50192274

(5)連携研究者

三浦健一郎 (MIURA, Kenichiro)
東京女子医科大学・医学部・準教授
研究者番号：70408483

(6)連携研究者

濱田陸 (HAMADA, Riku)
東京都立小児総合医療センター・体の専門

診療部・医員

研究者番号：40608783

(7)連携研究者

濱崎祐子 (HAMASAKI, Yuko)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：50317799