

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K09190

研究課題名(和文)尿エクソソームを利用した尿路感染症診断法の開発と感染メカニズムの解明

研究課題名(英文) Development of biomarkers for urinary tract infection and analysis of infection mechanisms using urinary exosome

研究代表者

水谷 晃輔 (Mizutani, Kosuke)

岐阜大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80397356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者は免疫能の低下等により感染症に罹患しやすい。膀胱炎や腎盂腎炎などの尿路感染症もその一つであるが、高齢者では自覚症状が明確でない場合があり確定診断に迷うこともある。さらに尿路感染症においては治療を要しない無症候性細菌尿の存在が尿路感染症の診断を困難にさせている。本研究では無症候性細菌尿と症候性の尿路感染症を区別する方法の確立を目指し尿中のエクソソームに着目し解析を行った。Tim4を用いたホスファチジルセリンに対するアフィニティー法で精製した尿中エクソソームのAktとCD9の発現量は無症候性細菌尿と比較して尿路感染症では有意に上昇しており、尿路感染症のバイオマーカーとなる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

無症候性細菌尿は一般に妊婦や経尿道的処置前の患者など、一部を除いて抗菌薬治療の適応とされず、発熱や排尿時痛などの急性増悪時にのみ治療を行うべきとされている。感染症であれば放置するとより重篤になる場合もあるが、一方で治療すべきでない無症候性細菌尿に対して安易に治療が繰り返されると耐性菌の原因となるため、尿路感染と無症候性細菌尿を適切に判断する方法が望まれている。本研究では尿中エクソソームが尿路感染症を判別するためのマーカーになり得る可能性を見出したため、今後の臨床応用への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Urinary tract infection (UTI) is diagnosed by urinalysis, clinical symptoms and the presence of bacteria in urine and treated with antibacterial agents, whereas asymptomatic bacteriuria (ABU) that is diagnosed by bacteriuria without any urinary tract symptoms should not be treated with some exceptions. However, there has been no clinically available biomarker to distinguish UTI from ABU. In addition, there has been no report describing diagnosis of UTI by exosomes to date. In this research, we found that the levels of intracellular signaling molecule Akt and an exosomal marker CD9 were decreased in urinary exosomes of UTI patients after treatment and were higher in those of UTI patients than in those of ABU patients. We identified novel objective markers for differential diagnosis of UTI and ABU, which will allow better diagnosis and treatment of patients.

研究分野：泌尿器科

キーワード：エクソソーム 尿路感染症 無症候性細菌尿 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢者は免疫能の低下により感染症に罹患しやすく、膀胱炎や腎盂腎炎などの尿路感染症もその一つである。尿路感染症は発熱や排尿時痛などの自覚症状及び画像検査や尿検査を含む諸検査によって診断されるが、高齢者では認知症や知覚低下により自覚症状が明確でない場合も多い。さらに尿路感染症においては治療を要しない無症候性細菌尿の存在が尿路感染症の診断を困難にさせている。現在無症候性細菌尿と治療を要する症候性尿路感染症を簡単に判別する方法はないため診断がつかない症例では、本来治療が必要でない無症候性細菌尿が抗菌薬によって過剰に治療されたりすることもある。無症候性細菌尿は治療する必要がないだけでなく、繰り返すことも多いため頻回の抗菌薬投与が多剤耐性菌出現や医療費高騰の原因となる。そのため本研究では症候性の尿路感染症と無症候性細菌尿の鑑別のためのバイオマーカー開発のため尿中エクソソームに着目した。エクソソームは直径約 40-150nm の膜小胞であり、タンパクや核酸を含み細胞外に分泌され、その表面や内部には元の細胞の表面タンパクや内容物を含んでいるため、分泌元の細胞の状態を反映していると考えられている。本研究ではこの点に注目して尿路感染症の尿中エクソソームを解析することによって、細菌感染により生じる細胞内因子の変化をとらえ、さらにそれが尿路感染症における診断のためのバイオマーカーとしての有用性を検討した。

2. 研究の目的

症候性の尿路感染症と無症候性細菌尿とを判別する方法の一つとして、尿中の炎症性サイトカイン(IL-6)が有用であるという報告があるが実臨床の使用には至っていない。エクソソームは分泌される元の細胞の情報を有しており、感染細胞から放出されるエクソソームは細菌感染によって生じる細胞内変化を反映している可能性がある。本研究の目的は、生体内の尿路における細菌感染によって生じた感染細胞内の変化をエクソソームを通じて解析し、尿路感染症の診断のためのバイオマーカーとしての有用性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

尿路感染症の尿中エクソソーム解析とバイオマーカーとしての検証のためのデータ収集を以下の順序行った。

培養細胞の尿路感染症モデルによるエクソソーム解析

尿路上皮のモデルとして不死化尿路上皮培養細胞である SV-HUC-1 を、感染尿(膿尿)中に出現する白血球のモデルとして急性単球性白血病細胞株である THP-1 を使用することとした。また細菌は尿路感染において最も検出頻度が高い細菌である大腸菌(*E. coli.*)と同じ細菌から抽出した細胞外毒である lipopolysaccharide(LPS)をモデルとして使用した。SV-HUC-1 と THP-1 のそれぞれに *E. coli.* または LPS を添加し、その細胞上清を感染尿のモデルとして培養上清中のエクソソームを超速心法で精製、western blot 法で発現タンパクを解析し候補タンパクを選定した。

尿路感染症患者の尿中エクソソーム解析

ヒト尿中では様々な微量タンパクや塩類が含まれるため、ターゲットとしたタンパクが実際にエクソソーム内に存在するかを確認する必要がある。そのため高精度なエクソソーム回収法である密度勾配遠心法によって精製したエクソソームを解析して、ターゲットタンパクの発現を確認する。また尿路感染症患者の尿中でターゲットとしたタンパクの発現が感染前後によってどのような変化を生じるかを確認し、バイオマーカーとしての候補の妥当性を検証する。

尿路感染症尿と無症候性細菌尿の尿中エクソソーム解析

尿路感染症患者の尿と無症候性細菌尿からエクソソームを精製し、尿中エクソソームのバイオマーカーとしての有用性を検討する。

4. 研究成果

培養細胞の尿路感染症モデルによるエクソソーム解析

尿路感染症のモデルとして、尿路上皮培養細胞である SV-HUC-1 と感染尿(膿尿)中に出現する白血球のモデルとして単球細胞株である THP-1 を使用することとし、それぞれの細胞に *E. coli.* または LPS を添加して、24-48 時間後に超速心法にてエクソソームを精製して western blot 法でタンパク発現を検討した。細菌及び LPS 刺激実験に先立って、2つの細胞に LPS のレセプターである TLR4 が発現していることを確認した(図1)。

THP-1 では、*E. coli.* 添加による細胞死のため細胞内シグナル因子(Akt、ERK)、転写因子(NF- κ B)およびエクソソームマーカー(CD9)の発現低下が認められたが、エクソソームでは LPS 刺激、*E. coli.* 刺激ともに CD9 以外の因子は増加していた(図1)。SV-HUC-1 では細胞内の変化は THP-1 と同様であったが、エクソソーム内の発現上昇は *E. coli.* 刺激の時にのみ認められた。エクソソームマーカーである CD9 の発現量に関する刺激による変化は THP-1、SV-HUC-1 とともに少なかった(図2)。

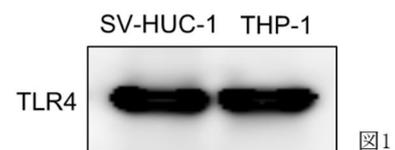


図1

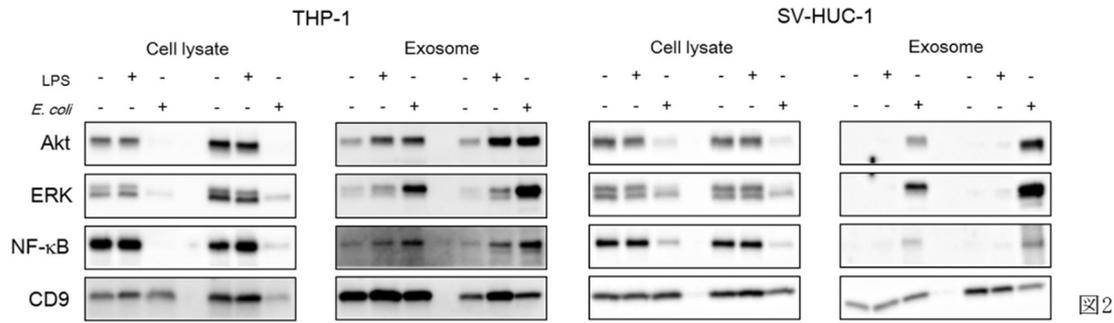


図2

尿路感染症患者の尿中エクソソーム解析

の結果より、エクソソーム内の Akt、ERK、NF-κB が尿路感染症のバイオマーカーの候補と考えたが、ヒト尿中にはそれぞれのタンパクが細胞崩壊などによって遊離タンパクとして存在し、超遠心法によるエクソソーム分画に混入している可能性もあるため、本当にエクソソーム分画に存在するかをもっとも精度が高いエクソソーム精製法である密度勾配遠心法によって確認した。尿路感染症患者の尿中から超遠心法でエクソソームを回収、次いで OptiPrep を使用した密度勾配遠心法によって 12 のフラクションに分画し、さらにその各分画を超遠心法で精製、タンパクを回収して western blot を行った。エクソソームマーカーである CD9 はフラクション 5-7 に認められ、そのフラクションに一致して、Akt、ERK 及び NF-κB の存在が確認でき、尿中エクソソーム内にそれらが含まれている事が確認できた(図3)。その中で Akt のシグナルが強くバイオマーカーとして適していると判断し、Akt で研究を進めることとした。

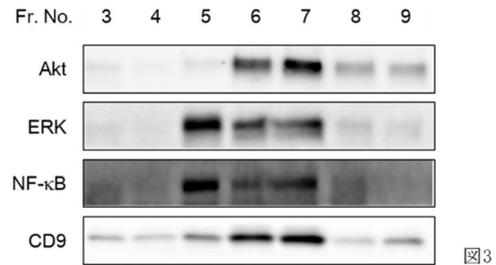


図3

尿路感染症患者の尿エクソソーム中 Akt の発現変化を調べてバイオマーカーとしての妥当性を検証した。5 人の症候性尿路感染症患者 (P1-P5) の感染症発症時と治療後の尿を採取して、超遠心法によりエクソソームを精製した。エクソソーム中の Akt と CD9 の発現を western blot 法にて確認、デンストメトリーで定量し治療前後でその発現変化を比較したところ治療後に Akt、CD9 の発現が低下しており、尿路感染症によってこれらが上昇する可能性が示唆された(図4)。

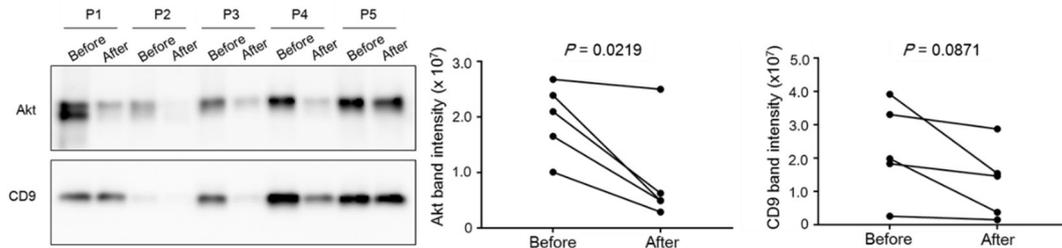


図4

尿路感染症尿と無症候性細菌尿の尿中エクソソーム解析

尿路感染症 (UTI) 患者の尿中エクソソームの Akt や CD9 の発現量が無症候性細菌尿 (ABU) との鑑別診断のバイオマーカーとなりうるかを検討した。多検体からのエクソソーム精製が必要なため、より簡便なポリマー沈殿法である Exoquick を使用し、尿路感染症患者の尿と無症候性細菌尿、それぞれ 10 人分の尿からエクソソームを精製して western blot 法にてその発現を比較したところ尿路感染症患者の尿中エクソソームでは Akt、CD9 の発現が有意に上昇していた(図5)。

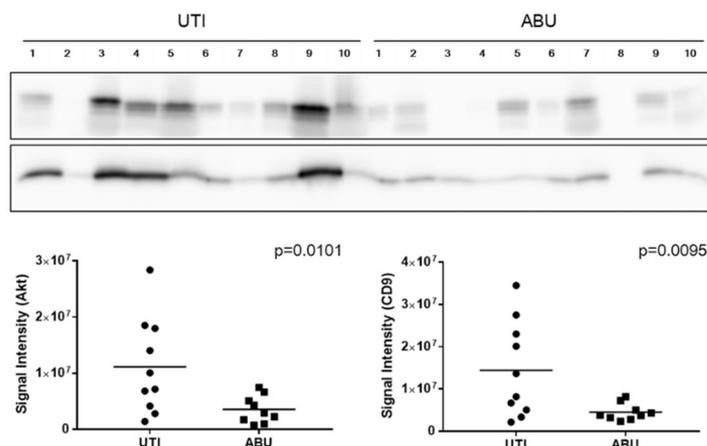
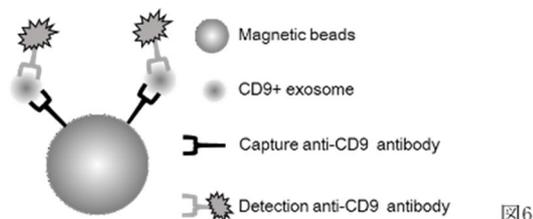


図5

ここまでで尿中エクソソームの Akt や CD9 の発現が尿路感染症と無症候性細菌尿の鑑別のためのバイオマーカーとしての可能性が明らかとなった。しかしポリマー沈殿法も比較的時間がかかるため、バイオマーカーとしての普及のためには更に簡便なエクソソーム精製法が必要であると考え、Tim4 を用いたホスファチジルセリンに対するアフィニティー法に着目した。Tim4 を付加した磁気ビーズで尿中エクソソームを補足、精製してエクソソームの Akt、CD9 を測定した。Akt の測定はエクソソームを融解して ELISA 法にて測定した。CD9 は磁気ビーズを用いた化学発光酵素免疫測定法を構築して (図 6) より高精度に測定することが可能であった。



ポリマー沈殿法と同様に Tim4 ビーズで精製した尿中エクソソームでも尿路感染症患者において Akt と CD9 が有意に上昇していた (図 7 上段)。このシステムの Akt 測定の AUC は 0.93 であり、カットポイントを 0.034 に設定すると感度 100%、特異度が 88.9% と良好な値を示した。さらに尿中 Cre 値で補正しても尿路感染症では Akt、CD9 とともに有意な上昇を示しており (図 7 下段) 尿中エクソソームの尿路感染症におけるバイオマーカーとしての有用性が示された。

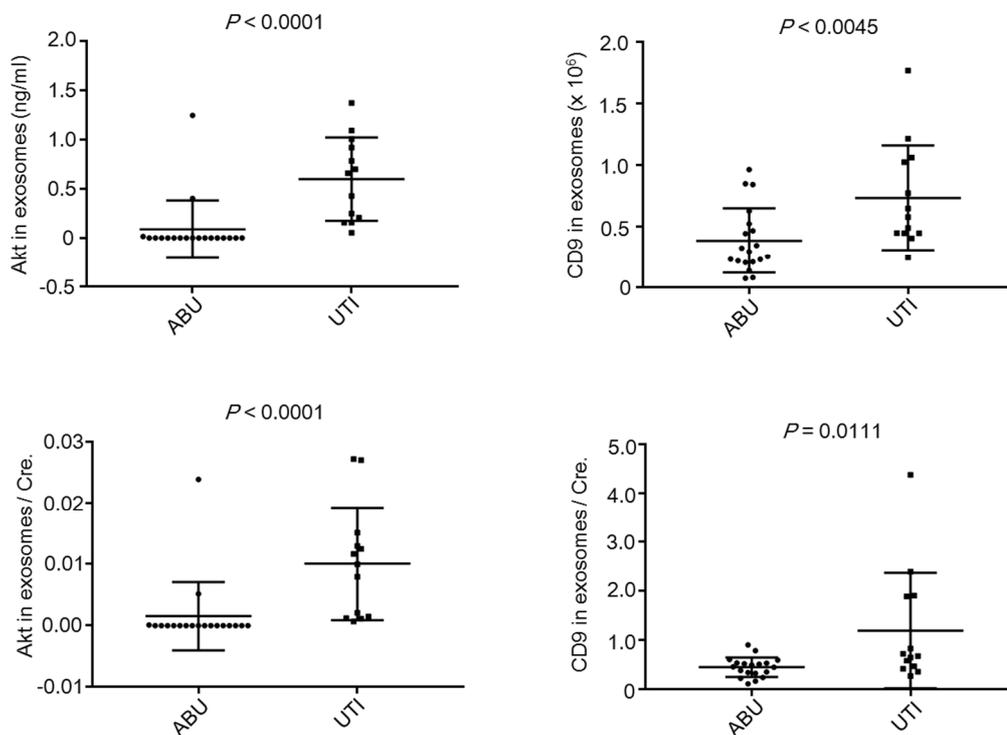


図 7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mizutani K, Kawakami K, Horie K, Fujita Y, Kameyama K, Kato T, Nakane K, Tsuchiya T, Yasuda M, Masunaga K, Kasuya Y, Masuda Y, Deguchi T, Koie T, Ito M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Urinary exosome as a potential biomarker for urinary tract infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular microbiology	6. 最初と最後の頁 e13020.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cmi.13020.	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kosuke Mizutani, Kyojiro Kawakami, Kengo Horie, Yasunori Fujita, Koji Kameyama, Taku Kato, Keita Nakane, Tomohiro Tsuchiya, Mitsuru Yasuda, Koichi Masunaga, Yutaka Kasuya, Yoshishige Masuda, Takashi Deguchi, Takuya Koie and Masafumi Ito
2. 発表標題 Akt and CD9 in urine exosomes as potential markers for urinary tract infection
3. 学会等名 Annual meeting international society for extracellular vesicles 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	藤田 泰典 (Fujita Yasunori) (30515888)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員 (82674)	
研究分担者	川上 恭司郎 (Kawakami Kyojiro) (90589227)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員 (82674)	
研究分担者	伊藤 雅史 (Ito Masafumi) (80393114)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長 (82674)	

6. 研究組織（つづき）

	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	堀江 憲吾 (Horie Kengo) (50509776)	岐阜大学・医学部附属病院・助教 (13701)	
研究分担者	仲野 正博 (Nakano Masahiro) (60334926)	岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授 (13701)	
研究協力者	長澤 綾子 (Nagasawa Ayako)	岐阜大学・医学系研究科泌尿器科学分野・研究協力員 (13701)	