

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15431

研究課題名（和文）ヒト血中プロレニン濃度測定系開発ならびに病態生理学的役割の解析

研究課題名（英文）Establishment of sandwich ELISA for human prorenin and prorenin levels in normal plasma

研究代表者

藤本 和実 (Fujimoto, Kazumi)

北里大学・理学部・特任助教

研究者番号：50769297

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：昇圧物質であるレニンの前駆体プロレニンについて新規疾患バイオマーカーとなり得るかについて基礎的研究を進めてきた。申請者が所属する研究チームが作製したプロレニンアミノ酸配列N端領域の11アミノ酸を特異的に認識する抗体と、市販されているプロレニンプロセグメント領域（30-43）を認識する抗体を用いて新規サンドイッチELISA系の構築に成功した。本測定系でヒト血漿中プロレニンを測定したところ、プロレニンはレニンのように体位変動による影響を受けないことが明らかとなった。ELISA、ウエスタンブロットの結果から血漿中プロレニンは従来信じられてきた濃度よりも高濃度の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来考えられてきた濃度より高濃度にプロレニンは血中に存在する可能性が示唆された本研究成果はプロレニン研究に新たな問いを投げかけたことになる。プロレニンだけでなく、レニン、（プロ）レニン受容体が生体内で担っている役割には未解明な部分が多く残されている。プロレニン研究者が増え、生体内でのプロレニンの役割に関する知見が増えることで従来のレニン・プロレニンへの概念が新たなものになる可能性がある。プロレニンの動態を解明していくことが二次性高血圧症の新規疾患バイオマーカー開発につながり、二次性高血圧症であるにもかかわらず、本態性高血圧症と診断され適切な治療を受けられていない患者を減らすことができる。

研究成果の概要（英文）：We successfully established sandwich ELISA for prorenin with our original polyclonal antibody prorenin prosegment region N-term(1-11) and commercial monoclonal antibody prorenin prosegment region C-term(30-43). This ELISA can detect full-length prorenin without activation.

Our results suggest human plasma prorenin levels are far higher than currently reported.

研究分野：臨床検査学

キーワード：ELISA

1. 研究開始当初の背景

プロレニンとは血圧調節の中心的な役割を担うレニン・アンジオテンシン系(RAS系)の律速酵素であるレニンの前駆体である。レニン、プロレニンの両者と結合する(プロ)レニン受容体がヒト腎臓から同定されて以降(Nguyen G, J Clin Invest, 2002)(プロ)レニン受容体研究は国内外で盛んに行われてきたが、プロレニン自体の研究はまだ少ない。プロレニンは(プロ)レニン受容体は腎以外にも脳・心・脾など全身臓器に分布するため、組織レニン・アンジオテンシン系においても重要な役割を果たしているものと期待されている。内分泌代謝、循環器、腎疾患の診断や病態把握のためにレニン産生分泌能を評価することは非常に重要であり、日常の臨床検査におけるレニン分泌指標として血漿レニン活性(PRA)が用いられている。PRAは体位変動や日内変動があるため早朝空腹時安静臥位採血が必要とされ、測定値の解釈の困難さも加わって測定すら行わない医療機関も数多い。PRAは生成されたアンジオテンシンIを定量して算出するが、血中アンジオテンシノーゲン濃度が測定値に大きく影響するため、PRAがレニン分泌量を反映するとは限らない。臨床検査会社によるRIA法や市販キットによるレニン直接定量も可能であるが高価で測定に時間を要する上に各方法で定量結果は1000倍も異なるため有用な検査とは言い難い。このように数多くの臨床的に重要な内因性因子や診断バイオマーカーの中で正確な血中濃度測定系が確立されているものは非常に少なく、報告毎に血中濃度が大幅に異なることは通常現象で、定量の不確実さは国際的な問題である(Rehfeld, J. F, Clin Chem, 2012, Rifai, N, Clin Chem 2012)。

2. 研究の目的

国民の3分の1が高血圧症であるといわれている日本において、本態性高血圧症と二次性高血圧症の鑑別は必須である。しかしながら、有効なバイオマーカーがないために、高血圧症をきたす原因となる疾患がありながらも、見逃されてしまい、二次性高血圧症の治療が必要でありながらも本態性高血圧症の治療を受けている患者も多い現実がある。

日常の臨床検査ではPRAがレニン分泌の評価に用いられているが、PRAはレニンを直接評価したものではないため、年齢や食塩摂取量、体位変動(立位、臥位)、薬剤など種々の条件による変動が大きく特異性は必ずしも高くない。PRAは採血実施までに計画的な投薬調整や、早朝安静臥位採血が求められ、患者負担が大きい。

今回我々はレニンよりも安定した存在が知られているレニン前駆体であるプロレニンに着目し、PRAに代わるレニンを評価できる測定系構築を計画した。独自に作製した高感度特異的抗体を用いて新規プロレニンヒト血中濃度測定系を確立し、生体内での動態を探り、現在臨床で使用されているレニン活性および濃度と比較・相関解析し、新規疾患バイオマーカーとしての有用性を示すための基礎的検討を目的とする。

3. 研究の方法

【新規プロレニン測定系の開発】

新たに作製したプロレニンアミノ酸配列(1-11)を認識する、家兔由来血清から、IgGを精製した。本抗体と市販のプロレニン抗体を組み合わせ、新規サンドイッチELISA系の構築に成功した。

【Western blot】

新規ELISA系で測定したヒト血漿中プロレニン濃度の確からしさについてWestern blotにおいて半定量的に評価した。

【質量分析計による血中プロレニンの同定】

現在までの報告では血中プロレニンについて質量分析計による検出は成功されていない。申請者の所属する研究グループが開発した独自の血漿中からのタンパク抽出技術を駆使し、質量分析計によるプロレニン検出を試みた。

4. 研究成果

プロレニンリコンビナント 0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を標準曲線とし、ヒト血漿希釈系列(1/10~1/40)を測定したところ、標準曲線と平行性をたどり、この測定系で血漿測定が可能であることを確認し、新規プロレニン濃度測定系の確立に成功した(図1)。

本測定系でプロレニンがレニンのように体位変動を受けるかについて検討したところ、プロレニンは座位、臥位、立位による体位変動の影響は受けていないことが明らかとなった。(図2)

また、本測定系で求めた血中濃度はこれまでに報告されてきたプロレニン濃度よりも 1000~10000 倍高濃度であった。この結果について検証するためにプロレニンリコンビナント、ヒト血漿について Western blot を行った(図3)。検出したバンドから血漿中プロレニン濃度を求めたところ、ELISA の結果と一致する結果となり、プロレニンはこれまでに考えられてきた濃度よりも高濃度で体内に存在する可能性が示唆された。アルブミン除去処理血漿について Western blot を実施したところ、アルブミン除去処理をしなかった血漿と比較すると 60~70kDa 付近のバンドが消失した。この結果から、プロレニンは血中でアルブミンと結合している可能性を考え、ヒト血漿についてゲルろ過クロマトグラフィーを実施し、各フラクションについてドットプロットを行い、免疫活性を検出した。アルブミンとプロレニンリコンビナント混合物ではプロレニン単独でのフラクションよりも早い溶出時間にプロレニン様免疫活性が検出され、血漿中ではアルブミンに結合しているプロレニンの存在も示唆された。また、プロレニンは N 型糖鎖修飾を受けていることも明らかとなった。

本研究により、プロレニン、レニンは従来想信じられてきた濃度よりも高濃度に存在する可能性が明らかとなった。また質量分析による血漿中プロレニンの検出には成功していない。翻訳後修飾を多数受けている可能性があり、血漿からのタンパク抽出操作中に失われているか、トリプシン切断の効果を受けにくい可能性が考えられる。

プロレニンの病態生理学的意義についてはまだまだ不明な点が多いが、本研究結果からプロレニンについて新たな知見が得られ、プロレニン研究の新たな切り口を見つけることができたといえる。

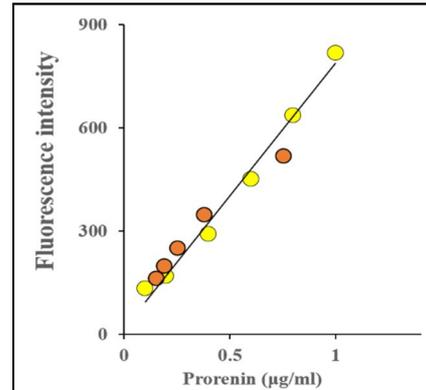


図1.標準曲線と血漿希釈系列の平行性の確認(●:標準品、●:ヒト血漿希釈系列)

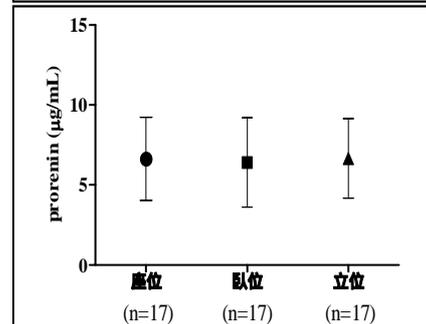


図2.体位による血漿中プロレニンの変動

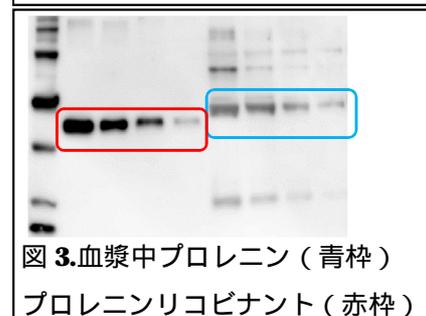


図3.血漿中プロレニン(青枠)プロレニンリコンビナント(赤枠)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤本和実, 川村沙友希, 吉野苑美, 坂東 慧, 鎌田裕二, 小寺義男, 七里真義
2. 発表標題 ヒト循環血漿中プロレニンの分子存在様式とその濃度
3. 学会等名 第28回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----