

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20925

研究課題名（和文）尿中修飾ヌクレオシドの網羅的解析による新規腎疾患診断法の開発

研究課題名（英文）Development of a Novel Diagnostic Method for Renal Disease by Profilings of Modified Nucleosides in Urine

研究代表者

永芳 友（Nagayoshi, Yu）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特任助教

研究者番号：60908028

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：RNAは複雑で多彩な化学修飾を受けることでその機能を適切に果たす。先行研究で修飾RNAの転帰を検討したところ、修飾RNAはヌクレオシドまで分解された後、修飾ヌクレオシドは尿中に多く排泄されていることを明らかにした。しかしこの排泄現象の生理機構や腎疾患との関連は明らかになっていない。本研究では糸球体疾患や尿細管疾患を主とする腎臓への負荷が修飾ヌクレオシド排泄にどのような影響を与えるのか？をモデル動物および臨床検体を用いて解き明かすことを目的とした。本研究の結果、塩分負荷や糖尿病、尿細管障害のモデルマウスや臨床検体を用いて、修飾ヌクレオシドの排泄プロファイリングが変化していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに腎疾患における修飾ヌクレオシド排泄変化は、未開拓の研究領域であり、今回の結果は新しい腎生理機能を明らかにするきっかけとなることから学術的意義は高い。加えて現在の臨床現場では、腎疾患の確定診断には腎生検を行う。腎生検は侵襲度の高い検査であるため、患者負担のみならず医療者の負担も大きい。本研究において明らかとなった、腎疾患モデルで排泄変化を認めた修飾ヌクレオシドは新規バイオマーカーとなる可能性がある。この結果は迅速簡便な新規腎疾患診断法に寄与する可能性が高く社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：RNA has diverse chemical modifications over 100 types. We found that the modified RNA is degraded into single nucleosides and modified nucleosides are excreted into urine. However, the physiological mechanisms of this excretion and the relationships between renal diseases remain unclear. In this study, we investigated the effects of renal stress, mainly glomerular and tubular diseases, on the excretion of modified nucleosides using animal model and clinical specimens. The results of this study revealed that the excretion profiling of modified nucleosides is altered in mouse models of salt loading, diabetes, and tubular disorders, as well as in clinical samples.

研究分野：腎臓内科

キーワード：修飾ヌクレオシド バイオマーカー 腎疾患

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

RNA は複雑で多彩な化学修飾を受けることでその機能を適切に果たす。特にアミノ酸を運搬することが主たる役割である tRNA は多くの化学修飾を受けており、これらの化学修飾はタンパク質翻訳の効率や tRNA の構造維持に寄与する。加えてその修飾破綻はタンパク質翻訳時の誤翻訳や翻訳スピードの低下を引き起こし2型糖尿病や精神地帯など様々な疾患を引き起こす。これまでに RNA 修飾およびその修飾酵素は100種類以上同定されているのに対し、脱修飾酵素はほぼ同定されていない。先行研究で修飾 RNA の転機を検討したところ、修飾 RNA はヌクレオシドまで分解された後、修飾ヌクレオシドは細胞外、特に尿中に多く排泄されていることを明らかにした。しかしこの排泄現象が、どのような生理機構で行われているか？また腎疾患との関連があるか？は明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では「系球体疾患や尿細管疾患を主とする腎臓への負荷が修飾ヌクレオシド排泄にどのような影響を与えるのか？」をモデル動物および臨床検体を用いて解き明かすことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)各腎疾患モデルマウスにおける尿中修飾ヌクレオシド解析

まず一般的な腎負荷における修飾ヌクレオシド排泄への影響を評価するため、塩分負荷マウスおよび、糖尿病性腎症の表現型を示すレプチン受容体欠損マウス(db/db マウス)、間質性腎炎のモデルマウスとして使用されるシスプラチン腎症モデルマウスを用いて尿中修飾ヌクレオシド解析を行なった。具体的な内容を下記に記載する。塩分負荷マウスは25週齢のC57/BL6マウスに0.9%食塩水を6週間自由摂取させ、投与前、投与後で代謝ケージを使用し24時間採尿を行なった。db/dbマウスは12週齢のマウスを使用し、同様の手法で採尿を行なった。シスプラチン腎症モデルマウスは12週齢のマウスに20mg/kgのシスプラチンを投与し、投与5日後に代謝ケージで採尿を行なった。またdb/dbマウスに関しては一般的に腎保護作用を示すことが知られているロサルタンカリウム(50mg/mL)を蒸留水に溶解し自由摂取で2週間投与し、薬剤投与後に同様の手法で採尿を行なった。採取した尿は測定前処理としてNanosep 3K Omega (Pall Corporation)で除タンパクおよび脱塩を行った。前処理を行ったサンプルは高速液体クロマトグラフ質量分析計(LCMS-8050、島津製作所)で各修飾ヌクレオシドの測定を行なった。

#### (2) 腎疾患患者尿中の修飾ヌクレオシドの評価と病勢・病態との関連

熊本大学病院腎臓内科入院中で臨床研究に同意を得られた230名の患者血清および尿を用いた。尿は前述のマウス尿と同様に前処理を行なったのち、質量分析計で修飾ヌクレオシドの測定を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) 各腎疾患モデルマウスにおける尿中修飾ヌクレオシド排泄変化

塩分負荷マウスにおける尿中修飾ヌクレオシドの排泄変化を評価したところ、投与期間に応じて尿中の2'-O-Methylcytidine(Um)、2-methylthio-N6-methyladenosine(ms2m6A)、N6-methyl-N6-threonylcarbamoyladenine(m<sup>6</sup>t<sup>6</sup>A)が有意に上昇しており、N2,N2-dimethylguanosine(m<sup>2,2</sup>G)、2'-O-Methyladenosine(Am)が有意に低下していた(図1, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 Paired t-test)。このことから塩分負荷に伴い、複数の修飾ヌクレオシド排泄で影響を受けていることが示唆された。次にdb/dbマウスにおける尿中修飾ヌクレオシドを野生型マウス(C57/BL6)と比較解析した。その結果、多くの尿中ヌクレオシドの排泄が低下していた(図2上段)。本結果から一般的に腎負荷がかかっているdb/dbマウスでは全般的なヌクレオシドの排泄低下が引き起こされていることが示唆された。しかし、db/dbマウスは野生型マウスと比較して多尿であったため、希釈に伴う偽性低値の可能性も考えられた。またdb/dbマウスに対して2週間ロサルタンカリウム

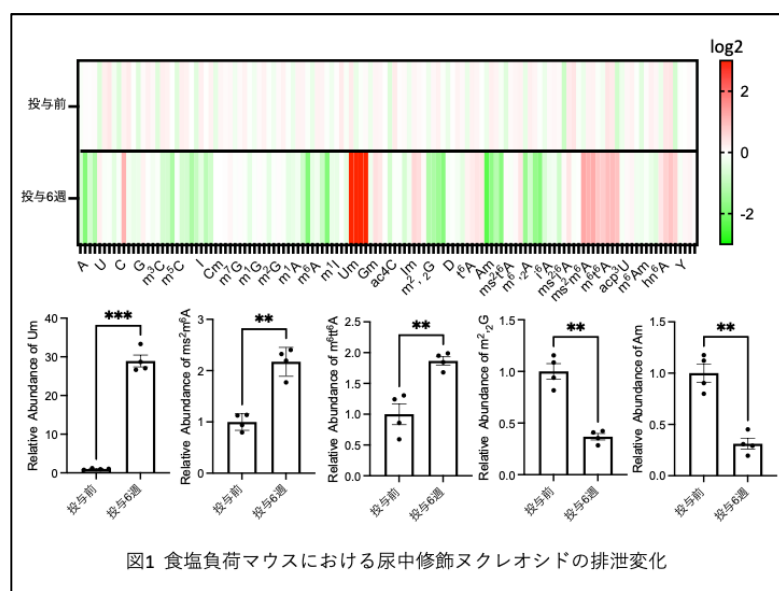


図1 食塩負荷マウスにおける尿中修飾ヌクレオシドの排泄変化

投与した。その結果、多くの尿中ヌクレオシドの排泄が低下していた(図2上段)。本結果から一般的に腎負荷がかかっているdb/dbマウスでは全般的なヌクレオシドの排泄低下が引き起こされていることが示唆された。しかし、db/dbマウスは野生型マウスと比較して多尿であったため、希釈に伴う偽性低値の可能性も考えられた。またdb/dbマウスに対して2週間ロサルタンカリウム

(50mg/mL)を自由摂取させ採尿を行なった。その結果無修飾のヌクレオシドを含めた複数のヌクレオシドで排泄上昇を認めた(図2下段)。一般的にロサルタンカリウムはアンジオテンシン II 受容体を阻害し、糸球体内圧を低下させ腎保護的に作用する。したがって本作用に伴い糸球体濾過量は低下するため、ロサルタンカリウム投与による排泄上昇を認めたヌクレオシドは糸球体濾過量との関連性は低いことが示唆された。

次に間質性腎炎のモデルマウスとして使用されるシスプラチン腎症モデルマウスを用いて尿中修飾ヌクレオシド解析を行なった。実施過程で、シスプラチン投与に伴う腎障害のため、修飾ヌクレオシドに必要な尿量を確保できなかった。そのため、血清中の修飾ヌクレオシドを測定し、排泄変化に伴う血中への影響を評価した。その結果、複数の修飾ヌクレオシドが血中で上昇していた(図3)。この結果から、シスプラチンによる腎間質障害に伴い、修飾ヌクレオシドの尿中排泄低下が引き起こされ、結果として血中で修飾ヌクレオシドが上昇したと考えられる。

(2) 腎疾患患者尿中の修飾ヌクレオシドの評価と病勢・病態との関連

熊本大学病院腎臓内科入院中で臨床研究に同意を得られた230名の患者血清および尿を用いて修飾にクレオシドプロファイリングを行なった。その結果、腎機能の指標として用いられるeGFRと有意に相関する2'-O-Methylinosine(lm)や有意に逆相関する1-methylinosine(m1l)を見出した(図4)。

以上より、さまざまな腎負荷に伴い、尿中の修飾ヌクレオシド排泄が有意に変化することを明らかにした。加えて排泄低下に伴う、血中への蓄積を見出した。しかしこれまでの検討は尿の生理的濃縮を勘案してないため、一般的に補正物質として用いられるクレアチニンなどで補正をした上で適切なバイオマーカーとしての機能を評価する必要がある。

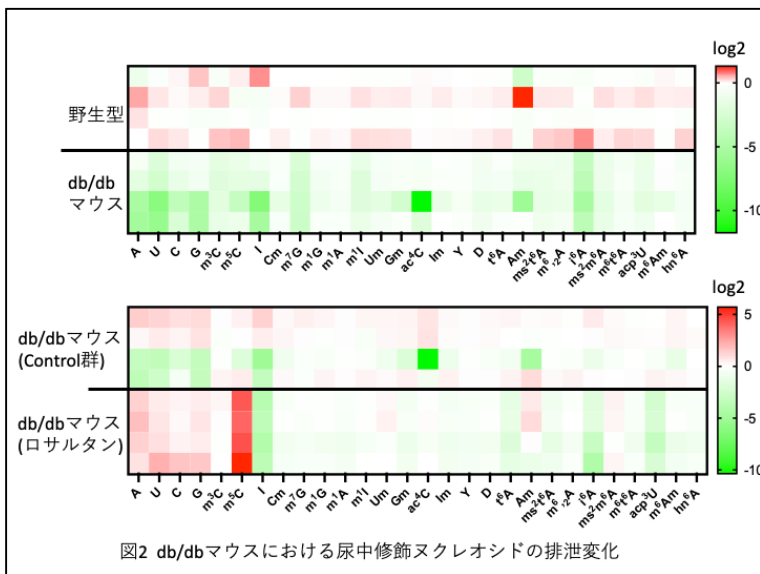


図2 db/dbマウスにおける尿中修飾ヌクレオシドの排泄変化

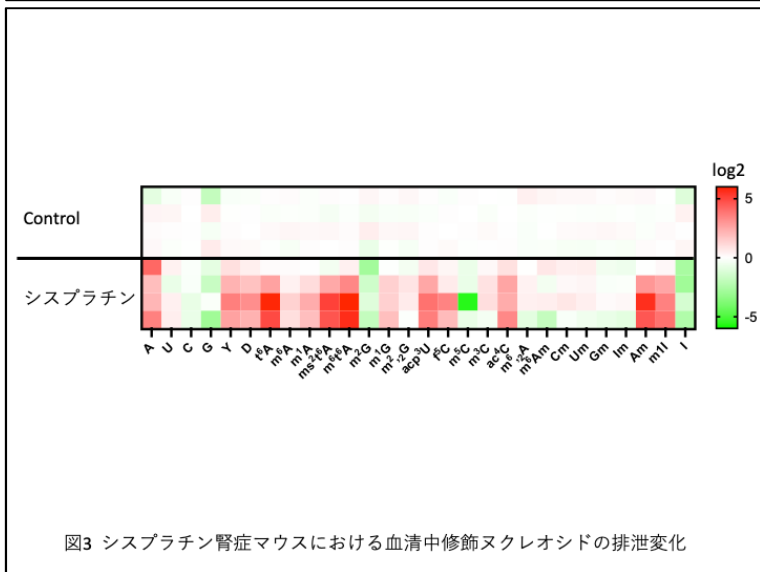


図3 シスプラチン腎症マウスにおける血清中修飾ヌクレオシドの排泄変化

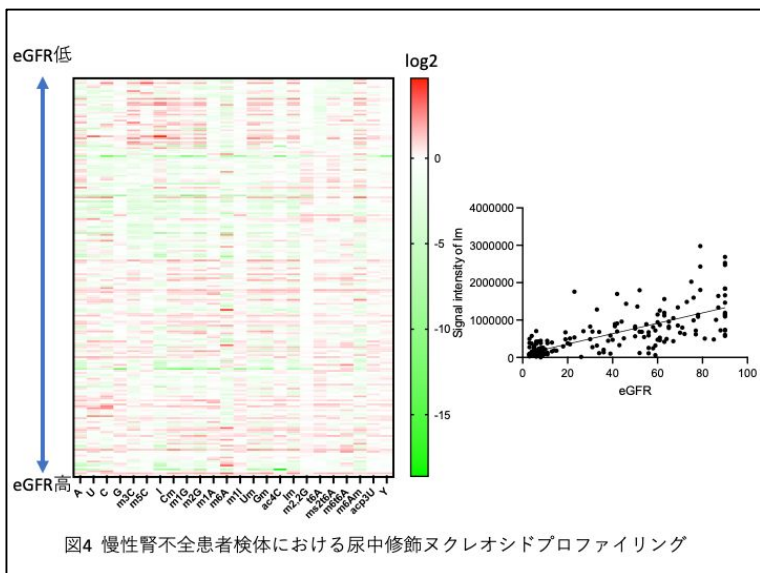


図4 慢性腎不全患者検体における尿中修飾ヌクレオシドプロファイリング

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 1件）

1. 著者名 Nagayoshi Yu et al	4. 巻 12
2. 論文標題 t6A and ms2t6A Modified Nucleosides in Serum and Urine as Strong Candidate Biomarkers of COVID-19 Infection and Severity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1233 ~ 1233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom12091233	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------