

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790715

研究課題名（和文） ヒトの尿に内在する新たな循環器・腎臓疾患のバイオマーカーの開発

研究課題名（英文） Development of the biomarker in urine of cardiovascular and kidney disease.

研究代表者

永田 さやか（NAGATA SAYAKA）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：00452920

研究成果の概要（和文）：ヒトの尿より新たなアンジオテンシン関連ペプチドを単離し、構造解析を行った。その結果、このペプチドはこれまでに報告のない新しい分子型である事が分かった。そこで、このペプチドに対する抗血清をウサギで作製し、測定系を確立した。ヒトの尿 500 検体の新規ペプチドの測定を行ったところ糸球体濾過率が減少すると尿中の新規ペプチドの排泄量が有意に増加する事が明らかとなった。また蛋白尿を伴う糖尿病患者ではこの新規ペプチドが有意に増加していた。つまり糖尿病性腎症のバイオマーカーになりうる可能性が示唆された。さらに抗血清を用いて免疫染色を行ったところ腎臓・心臓を含めた多くの組織中に新規ペプチドが存在している事が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：I isolated and identified a new angiotensinogen-derived peptide from the human urine. Then, I made antiserum to use rabbits for this peptide. And I established assay system. So, I collected urine samples and measured of this peptide by radioimmunoassay. I found that urinary new peptide/creatinin ratio was significantly higher than the estimated glomerular filtration rate (eGFR) < 30 ml/min/1.73 m² group in other two groups (eGFR >90, 90-30 ml/min/1.73 m²). And, when compared with the protein urea plas in diabetes, the urinary new peptide/creatinin ratio was significantly higher than in protein urea minus group. In addition, urinary this peptide is associated renal derangement in patients with diabetic nephropathy. In addition, this peptide is abundant in a wide range of organs and tissues including the heart and kidney of human by immunohistochemistry.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：臨床心血管病態学・バイオマーカー・生理活性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

（1）RA 系：RA 系は血中においては、腎臓から分泌されるレニンが、循環血液中のアン

ジオテンシノーゲンを特異的にアンジオテンシン I (Ang I) に変換する。次に、Ang I はアンジオテンシン変換酵素 (ACE) によって

Ang II となり、RA 系の主要な作用が発揮される。また近年、脳内レニンの発見により、組織 RA 系の存在が指摘されてきた。組織 RA 系は、血中 RA 系とは独立して、高血圧や各種臓器障害に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしその生成機構や役割に関しては未だに不明な点が多い。

(2) プロアンジオテンシン-12 (proang-12) の発見：proang-12 は、研究代表者が 2006 年にラット小腸より発見した Ang I の C 末に 2 個のアミノ酸が付加した (Leu-Try) 内在性の強力な昇圧ペプチドである。proang-12 は、多くの組織で Ang I、Ang II よりも高濃度に存在していることから、組織 RA 系関連ペプチドであると考えられる。また、レニンはアンジオテンシノーゲンから Ang I に変換する特異性の高い酵素であることを考慮すると proang-12 の発見により、レニン非依存性の Ang II 合成経路の存在が強く示唆される。この発見により、ヒトにおいても同じようなペプチドが存在していると考えられ、研究代表者が予備的検討を行ったところ新しい RA 系関連ペプチドの存在が確認された。これら RA 系関連ペプチドの組織 RA 系での作用機序と病態生理学的役割を明らかにすることで、心血管系の臓器障害の新しい診断・治療への応用が期待できる。

(3) 臓器障害のバイオマーカー：臓器障害のバイオマーカーとして、尿中のアルブミン排泄率がよく使用されている。さらに近年、尿中のアンジオテンシノーゲンは、腎症や高血圧、食塩負荷などで上昇する事が報告されており、腎障害における新しいバイオマーカーとして期待されている。しかしながら、アルブミンの分子量は 66,000、アンジオテンシノーゲンの分子量は約 50,000 と大きく、尿中に排泄される場合は、糸球体障害が亢進している。本研究代表者の予備的検討では、新規 RA 系関連ペプチドの推定分子量は、5000~6000 である (proang-12 の約 4 倍)。つまり、比較的初期の腎障害・循環器疾患における臓器障害のバイオマーカーになりうる可能性が非常に高いと考えられ、早期発見・早期治療へとつながる可能性も秘めている。

2. 研究の目的

レニン・アンジオテンシン系 (RA 系) は、循環器・腎臓疾患の発症や進展において重要な役割を果たしている。そのため RA 系阻害薬や RA 系の評価 (生化学検査) は、現在の循環器・腎臓疾患の治療・診断に欠かせないものとなっている。最近、研究代表者の予備的検討により、尿中に循環器・腎臓疾患のバイオマーカーとなりうる RA 系関連ペプチドの存在が確認された。そこで本研究の目的は

(1) 尿中に存在する RA 系関連ペプチドの精製・構造解析；(2) 発見したペプチドの簡便な測定系の確立；(3) 各疾患患者で新規ペプチドの特徴付け；(4) 動物実験にて新規ペプチドの病態生理学的役割の解明；(5) 以上 4 点の研究を行い、関連疾患での臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヒトの尿中に存在する新しい RA 系関連ペプチドの精製と構造解析：アンジオテンシン関連ペプチドを複数認識可能なアンジオテンシノーゲンの N 末端に特異的なラジオイムノアッセイ (RIA) を用いた予備的検討で、ヒト尿中に proang-12 より分子量が大きなペプチドの存在を確認している。ヒト尿を用いて、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてこの RA 系関連ペプチドの精製を繰り返し行う。最終的に精製されたペプチドの構造は、質量分析装置 (LC/MS/MS システム) もしくはプロテインシーケンサーを用いて行う。

(2) 簡便で特異的な測定系の確立：構造が明らかとなった関連ペプチドについて、グルタルアルデヒド法を用いて C 末端に特異的な抗体をウサギに免疫し、作製する。この抗体を用いて RIA に加え、N 末認識抗体と C 末認識抗体の両方を用いて ELISA (サンドイッチ法) など、簡便で特異的な測定法を確立する。

(3) ヒトにおける新規 RA 系関連ペプチドの病態生理学的役割の解明：高血圧、動脈硬化、心不全、心筋梗塞、腎不全などの患者の尿中の関連ペプチド濃度を測定して健常人と比較し、疾患重症度を含む臨床パラメータとの関連性を明らかにする。また、ヒトの組織を用いて免疫染色を行い新規ペプチドの局在と明確にする。

(4) ラットにおける新規 RA 系関連ペプチドの病態生理学的役割の解明：動脈硬化、心不全、心筋梗塞、腎不全等の疾患モデルラットの組織中、血中、尿中における新規ペプチドの局在を免疫組織染色および濃度を RIA にて評価する。

4. 研究成果

(1) ヒトの尿中に存在する新しい RA 系関連ペプチドの精製と構造解析：アンジオテンシン関連ペプチドを複数認識可能な RIA を用いてゲル濾過法、HPLC、Affinity カラムで尿中より新規ペプチドを精製し、質量分析装置やプロテインシーケンサーを用いて構造解析を行った。このペプチドは何らかの修飾を受けている事が明らかとなった構造を決定す

る事ができなかった。そこで精製ペプチドを様々な酵素で切断し、断片化する事で構造を決定した。その結果、このペプチドはこれまでに報告のない分子型である事が明らかとなった。

(2) 簡便で特異的な測定系の確立：このペプチドのC末端部位を合成し、ウサギに免疫する事で特異的な抗血清を作製した。またこの抗血清の特異性を高めるために Affinity 精製を行った。精製した抗血清を用いて RIA を確立したが、臨床で実用化するためには測定感度が低すぎた。そのため、N 末を認識する抗体とC末を認識する抗体の2つを用いてサンドイッチ ELISA を立ち上げた。しかしこの ELISA は尿サンプルを測定前に酵素処理が必要であり、誰でもどここの施設でも測定できるような簡便で特異的な測定系にすべく、今後も改良が必要である。

(3) ヒトにおける新規 RA 系関連ペプチドの病態生理学的役割の解明：ヒトの尿 500 検体を収集し新規ペプチドを予備的に測定したところ糸球体濾過率 (eGFR) が減少するにつれ尿中の新規ペプチドの排泄量が増加する事が明らかとなった。つまり腎障害に深く関わりがある可能性が示唆された。また糖尿病患者で蛋白尿を伴う場合、この新規ペプチドの尿中排泄量が有意に増加していた。以上より糖尿病性腎症のバイオマーカーになりうる可能性が高い事が示唆された。また抗血清を用いてヒトの組織における新規ペプチドの局在を免疫染色にて確認したところ、心臓や腎臓、消化管など全身に広く分布している事が明らかとなった。今後、心臓疾患との関連性についても明らかにしていく予定である。

(4) ラットにおける新規 RA 系関連ペプチドの病態生理学的役割の解明：新規ペプチドはゲノムデータベースよりラットとは構造が異なる事が明らかとなった。そこでヒトアンジオテンシノーゲンが発現しているトランスジェニックラットを用いて検討する事にした。このラットの心臓、腎臓の組織を新規ペプチドに特異的な抗血清を用いて組織の免疫染色を行った。結果、心臓、腎臓に存在している事が明らかとなった。更にこのペプチドが関与していると考えられる組織レニン・アンジオテンシン系の作用を明らかにするために関連ペプチドである proang-12 についての検討も行った。高血圧自然発症ラット (SHR) に 1 週間、アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) ロサルタンと ACE 阻害薬イミダプリルを、それぞれ経口投与したところ、薬剤投与の両群において血中のレニン活性、Ang I、Ang II の濃度は上昇したが、proang-12

濃度には、変化がなかった。一方、組織中では、薬剤投与の両群において proang-12、Ang II 濃度は減少傾向にあった。また Wistar Rat に 1 週間、8%NaCl (高塩食) と 0.3%NaCl (低塩食) を含む食事を与えたところ、低塩食においては、血中のレニン活性、アルドステロン濃度が上昇し、それに伴い Ang I、Ang II 濃度も上昇した。一方で proang-12 の血中濃度は変化がなかった。さらに組織中においても低塩食で Ang I、Ang II 濃度は上昇傾向にあったが、proang-12 の濃度に変化はなかった。これらの結果より proang-12 の生成に血中のレニン活性が影響しないことが判明し、さらにレニンに依存する RA 系と proang-12 が関与すると考えられるレニン非依存性の RA 系が独立して存在している可能性が示唆された。

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 13 件)

- ①Moriwa N, Varagic J, Ahmad S, VanCannon JL, Simington SW, Wang H, Groban L, Brosnihan KB, Nagata S, Kato J, Kitamura K, Gomez RA, SequeiraLopez ML, Ferrario CM: Hemodynamic and hormonal changes to dual renin-angiotensin system inhibition in experimental hypertension. Hypertension, 61(2): 417-424 (2013) 査読有
- ②Nagata S, Kato J, Kuwasako K, Kitamura K: Plasma and tissue concentrations of proangiotensin-12 in rats treated with inhibitors of the renin-angiotensin system. Hypertens Res, 35: 234-238 (2012)
- ③Kuwasako K, Hay DL, Nagata S, Hikosaka T, Kitamura K, Kato J: The third extracellular loop of the human calcitonin receptor-like receptor is crucial for the activation of adrenomedullin signalling. Brit J Pharmacol, 166: 137-150 (2012) 査読有
- ④Komatsu Y, Kida N, Nozaki N, Kuwasako K, Nagata S, Kitamura K, Kato J: Effects of proangiotensin-12 infused continuously over 14 days in conscious rats. Eur J Pharmacol, 683: 186-189 (2012) 査読有
- ⑤Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Nozaki N, Kato J: Characterization of the single transmembrane domain of human receptor activity-modifying protein 3 in adrenomedullin receptor internalization. Biochem Biophys Res Commun, 420: 582-587 (2012) 査読有

- ⑥ Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Kato J: Circulation control by adrenomedullin 1 receptor complex. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 140(1): 8-13 (2012) (Japanese) 査読有
- ⑦ Saito H, Ikeda R, Inoue K, Nagata S, Kitamura K, Minamino N, Kangawa K, Miyata A: Neuromedin B stimulates proliferation of mouse chondrogenic cell line ATDC5. *Peptides*, 36(2): 299-302 (2012) 査読有
- ⑧ Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Hikosaka T, Kato J: Structure-function analysis of helix 8 of human calcitonin receptor-like receptor within the adrenomedullin 1 receptor. *Peptides*, 32(1): 144-149 (2011) 査読有
- ⑨ Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Hikosaka T, Kato J: Shared and separate functions of the RAMP-based adrenomedullin receptors. *Peptides*, 32(7): 1540-1550 (2011) 査読有
- ⑩ Hikosaka T, Tsuruda T, Nagata S, Kuwasako K, Tsuchiya K, Hoshiko S, Inatsu H, Chijiwa K, Kitamura K: Adrenomedullin production is increased in colorectal adenocarcinomas; its relation to matrix metalloproteinase-9. *Peptides*, 32(9): 1825-1831 (2011) 査読有
- ⑪ Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Kato J: Molecular basis of adrenomedullin 1 receptor function and its roles in the cardiovascular system. *Curr Hypertens Rev*, 7: 207-216 (2011) 査読有
- ⑫ Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Hikosaka T, Kato J: Function of the cytoplasmic tail of human calcitonin receptor-like receptor in complex with receptor activity-modifying protein 2. *Biochem Biophys Res Commun*, 392(3): 380-385 (2010) 査読有
- ⑬ Nagata S, Kato J, Kuwasako K, Kitamura K: Plasma and tissue levels of proangiotensin-12 and components of the renin-angiotensin system (RAS) following low- or high-salt feeding in rats. *Peptides*, 31(5): 889-892 (2010) 査読有
- [学会発表] (計 14 件)
- ① 永田さやか, 桑迫健二, 北村和雄: アンジオテンシン II 産生におけるプロアンジオテンシン-12 の役割. 第 85 回 日本内分泌学会学術総会, 2012 年 4 月, 愛知
- ② 桑迫健二, 北村和雄, 永田さやか, 野崎尚美, 加藤丈司: G 蛋白共役型受容体キナーゼ (GRK) の新作用: GRK4 と GRK5 による 1 型アドレノメデュリン受容体 (AM 1 受容体) の細胞膜輸送と細胞内シグナリングの強力な抑制. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月, 横浜
- ③ Hikosaka T, Tsuruda T, Nagata S, Ashizuka S, Inatsu H, Kitamura K: Adrenomedullin production is increased in colorectal adenocarcinomas; its relation to matrix metalloproteinase-9. The 19th United European Gastroenterology Week, 2011-10 (Stockholm, Sweden)
- ④ 桑迫健二, 北村和雄, 永田さやか, 野崎尚美, 加藤丈司: 2 つのアドレノメデュリン (AM) 受容体の活性化を規定する責任領域の特定と特徴化: CGRP 受容体と異なる新たな活性化機構. 第 34 回日本高血圧学会総会, 2011 年 10 月, 宇都宮
- ⑤ 桑迫健二, 北村和雄, 永田さやか, 彦坂ともみ, 加藤丈司: 降圧系 1 型アドレノメデュリン (AM 1) 受容体のヘリックス 8 は AM1 受容体を負に制御し, Gs 蛋白の結合に不可欠である. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月, 横浜
- ⑥ 齊藤弘樹, 井上和彦, 池田龍二, 中町友哉, 塩田清二, 永田さやか, 北村和雄, 南野直人, 宮田篤郎: ラット骨芽細胞における増殖調節因子としてのニューロメディン B の生理的役割の解明. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月, 横浜
- ⑦ 加藤丈司, 永田さやか, 桑迫健二, 北村和雄: プロアンジオテンシン-12 の単離同定と産生調節機序の検索. 第 40 回日本心臓血管動物質学会シンポジウム「RAAS ホットトピック」, 2011 年 2 月, 高松
- ⑧ 桑迫健二, 北村和雄, 永田さやか, 加藤丈司: G 蛋白共役型受容体キナーゼ 4 (GRK4) と GRK5 によるアドレノメデュリン (AM) 受容体の細胞膜輸送の強力な抑制効果およびその受容体上の責任領域の同定. 第 33 回日本高血圧学会総会, 2010 年 10 月, 福岡
- ⑨ Hikosaka T, Nagata S, Tsuruda T, Kuwasako K, Inatsu H, Kitamura K: Increased levels of adrenomedullin peptide and expression of related genes in local colorectal cancer. The 7th International Symposia on the CGRP Family; CGRP, Adrenomedullin, Amylin, Intermedin and Calcitonin, 2010-8 (Queenstown, New Zealand)
- ⑩ Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Hikosaka T, Kato J: Interaction between receptor activity-modifying proteins (RAMPs) and G-protein-coupled receptors and the function of the C-terminal tail

of calcitonin receptor-like receptor in complex with RAMP2. The 7th International Symposia on the CGRP Family; CGRP, adrenomedullin, Amylin, Intermedin and Calcitonin, 2010-8 (Queenstown, New Zealand)

⑪ Nagata S, Hikosaka T, Ashizuka S, Tsuruda T, Kuwasako K, Kato J, Kitamura K: Effect of adrenomedullin administration in two rat models of experimental inflammatory colitis. 7th International Symposia on the CGRP Family; CGRP, Adrenomedullin, Amylin, Intermedin and Calcitonin, 2010-8 (Queenstown, New Zealand)

⑫ Nagata S, Kato J, Kuwasako K, Kitamura K: Effects of salt depletion and RAS blockade on plasma and tissue levels of rat angiotensin-related peptides. The 14th Scientific Session of the Society of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism, 2010-4 (Nara, Japan)

⑬ 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、加藤丈司：1回膜貫通型の受容体活性調節蛋白が作用するG蛋白共役型受容体を同定するための簡易スクリーニング法の確立および応用解析。第83回日本薬理学会年会、2010年3月、大阪

⑭ Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Kato J: Characterization of the trafficking interactions between endocrine G protein-coupled receptors and receptor activity-modifying proteins. The 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010), 2010-3 (Kyoto, Japan)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：新規ペプチドおよびその用途

発明者：永田さやか、北村和雄、浅田裕士郎

権利者：宮崎大学

種類：特願

番号：特願 2012-244752

出願年月日：平成 24 年 11 月 6 日

国内外の別：国内

〔研究会〕（計4件）

① 永田さやか、北村和雄：循環器・腎臓疾患の新しいバイオマーカーの開発を目指して。第2回 ペプチド・ホルモン若手研究会、2012年3月、広島

② 永田さやか、加藤丈司、朝見麻希、北村和雄：ラット血中・組織中のアンジオテンシン II (Ang II) 産生におけるプロアンジオテンシン-12 (proang-12) の役割。第2回 Molecular Cardiovascular Conference、2011年9月、北海道

③ Hikosaka T, Nagata S, Ashizuka S, Inatsu H, Kitamura K: Therapeutic effect of adrenomedullin administration in two rat models of experimental inflammatory colitis. 第2回 Molecular Cardiovascular Conference、2011年9月、北海道

④ 永田さやか、加藤丈司、桑迫健二、北村和雄：低塩刺激およびRA系阻害薬投与に伴うプロアンジオテンシン-12 (proang-12) やレニン・アンジオテンシン系 (RA系) 因子の血中・組織中の変化。第15回アンジオテンシンカンファレンス、2010年2月、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 さやか (NAGATA SAYAKA)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：00452920