

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20847

研究課題名（和文）尿中細胞外小胞の物理的特性に着目した小児腎疾患の病態解析

研究課題名（英文）Pathophysiological analysis of pediatric kidney diseases focusing on physical characteristics of urinary extracellular vesicles

研究代表者

滝澤 慶一（Takizawa, Keiichi）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10791957

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：小児慢性腎臓病（CKD）患者における尿中細胞外小胞（尿中EV）の物理学的特性を明らかにするために、健常児と小児CKD患者でナノ粒子追跡解析、プロテオーム解析等を行った。粒子のピークサイズの密度は、小児CKD患者で有意に低下しており、尿濃度が粒子数や粒子径に影響していることも分かった。また、物理的パラメーターによらず、小児CKD患者において尿中EV中の特定の分子群の発現量が変化していることを見出し、これらの分子発現量を簡便に測定するためのELISAプロトコルを確立した（Takizawa K et al, STAR Protoc. 2023）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児CKDの多くは、希釈尿で、かつ顕著な蛋白尿や血尿を認めないため、現状の学校検尿システムでは見逃されることが多い。また、血清クレアチニンによる糸球体濾過量の測定は侵襲的であるだけでなく、残存ネフロンによる代償により病態の早期検出が困難であるという問題を抱えている。本研究成果で得られた小児CKDに特徴的な尿中EVの物理特性や分子発現量の変化を高精度に測定できる検査系を確立することができれば、上記の問題を解決し、これまで見逃されていた小児CKDの早期発見につながることで期待できる。

研究成果の概要（英文）：To characterize the physics of urinary extracellular vesicles (urinary EVs) in pediatric chronic kidney disease (CKD) patients, nanoparticle tracking analysis and proteome analysis were performed in healthy children and pediatric CKD patients. The density of peak size was found to be significantly lower in pediatric CKD patients, and urinary concentration was also found to affect the number and size of particles. Also, we observed changes in the expression levels of a specific molecules in urinary EVs in pediatric CKD patients regardless of physical parameters, and an ELISA protocol was established to measure the expression of these molecules in a simple manner (Takizawa K et al STAR Protoc. 2023).

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：尿中細胞外小胞 小児慢性腎臓病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児期慢性腎臓病(CKD)は腎炎やネフローゼのみならず、生まれつき腎臓が小さい低形成腎や、早産などによる腎機能低下など様々な原因に起因する。若年で腎不全に至ると医療経済に大きな負荷となるだけでなく、患者家族に長期にわたり身体的精神的負担が強られる。それぞれの疾患の診断や重症度評価には腎病理診断が重要であるが、特に小児にとっては侵襲的な検査であることが問題である。腎組織の変化を非侵襲的に捉え、疾患の早期発見と病態解明につなげることは極めて重要な医療課題である。

腎組織変化を非侵襲的に同定する手段として、尿中の細胞外小胞(Extracellular Vesicles:EV)(Kosaka N et al. J Clin Invest 2016, Fujita Y et al. Cancer Sci 2016)に着目した。細胞は様々な特性を持った異種のEVを放出し、それらは由来する細胞の分子情報を保有するため、尿中EVは腎組織の変化を反映する可能性がある。

これまでに健常小児およびCKDの小児から尿中EVを精製し、高分解能質量分析装置(LTQ-Orbitrap-Velos; Thermo Scientific社)を用いたプロテオーム解析を行った。解析した小児全症例で尿中EVにテトラスパニン分子(CD9、CD63、CD81)等が検出され、高い精度でEVが精製されていることを確認した。さらに腎機能低下と関連して発現量が変動する尿中EV中の分子を同定し、腎機能低下を検出する新たな非侵襲的バイオマーカーとして利用できることを発見した。この結果は腎疾患では尿中EVの分子特性が大きく変化することを示している。本研究ではこの知見をさらに推し進め、尿中EVの物理的特性の変化を検討した。

2. 研究の目的

尿中EVの物理的特性と病態との関わりについての検討はほとんどない。独自のプロテオーム解析結果と、ナノ粒子追跡解析、マイクロ流路粒子解析を用いた物理的パラメーターを統合し、小児CKDの診断や病態解明に応用する。

3. 研究の方法

(1) 腎臓病における尿中EVの物理的特性(粒径およびゼータ電位)の検討

各ネフロンセグメントに存在する様々な細胞は異なる機序でEVを放出している。そのため尿中にはさまざまなサイズや電荷を持った小胞が存在する。これらの物理学的特徴を健常児および様々なCKD患者において検討し、疾患特異的あるいは腎機能低下に特徴的な変化が存在するかどうかを検討する。本研究では様々な腎疾患に適応して検討する。既にネフロン癆、低形成腎、単腎、多嚢胞性異形成腎、嚢胞腎、逆流性腎症、癒合腎、水腎症などの患者の尿サンプルを収集し解析用に保管しており、解析に供する。

(2) 尿中EVの物理的特性の変動メカニズムの解析

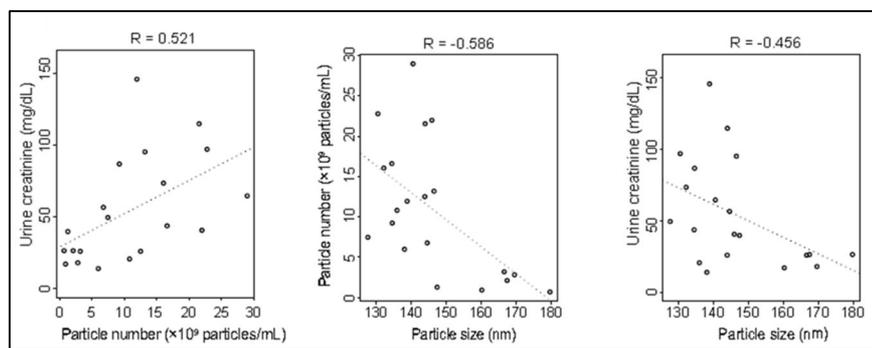
それぞれの患者の尿中EVのプロテオームデータを用い、粒径や電位と関連する発現分子変動がないかを検討する。またそれらへの尿比重などによる影響や腎機能等の臨床的なパラメーターとの関連を相関解析により検討する。これにより尿中EVの特性を病態発症・進展のバイオマーカーとして使用できるかも検討する。

4. 研究成果

国内の小児腎臓疾患を診療している 8 施設に協力依頼し収集した検体のうち、ナノ粒子追跡解

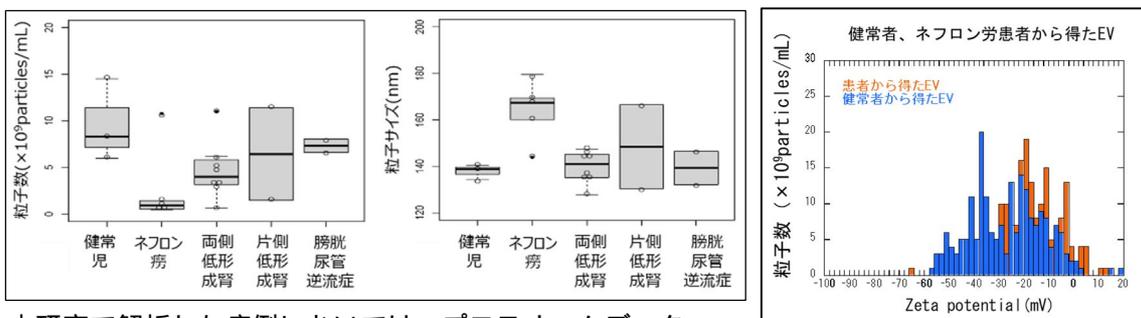
析(NTA)に必要なサンプル量が十分確保できる 20 検体 (健常児 3 例、小児 CKD 患者 17 例) を用いて、Tim4 蛋白質アフィニティー法で尿中 EV サンプルを精製した。405nm のレーザーと高感度の sCMOS カメラを搭載した NanoSight LM10 system による NTA を施行したところ、サンプルによって観測される粒子数に大きなばらつきを認め、正確な測定を可能とする適切濃度を検討の上、20 サンプルの解析を完了した。ストークス-アインシュタインの関係式に基づき、個々の粒子のブラウン運動から健常児 3 例の尿中 EV の粒子数、粒子径のデータを取得した。さらにこれらのデータを解析し、粒子のピークサイズの密度も明らかにした。得られた物理的パラメーターを用いて、健常児と小児 CKD 患者の 2 群比較を行ったところ、粒子数と粒子径には、統計的な有意差を認めなかったが、ピークサイズの密度は、小児 CKD 患者で有意に低下していることが判明した。さらに、尿浸透圧が粒子数、粒子径に影響を与えるという報告を受け (Blijdorp et al., 2021) NTA に使用した尿検体から尿中クレアチニン (uCr) 値を測定した。粒子数と uCr は正の相関があり、両者は粒子径と負の相関があった (下図)。さらに、希釈尿から精製した尿中 EV は濃縮尿から精

製した尿中 EV より、40-150nm のサイズの粒子の割合が減少し、150-1000nm のサイズの粒子の割合が増加するという結果が得られた。上記内

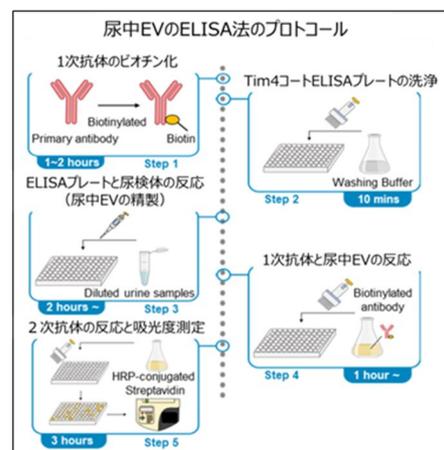


容を含めて論文報告した (Takizawa K et al, iScience. 2022)

また、小児 CKD の原因疾患毎の物理的パラメーターに関しても比較検討したところ、低形成腎や逆流性腎症と比較して、特にネフロン癆の検体において粒子数の減少と粒子サイズの増大が顕著であった。マイクロ流路粒子解析でもネフロン癆の患者において zeta potential が健常者と比較してプラスの電荷を帯びている傾向にあった (下図)。



本研究で解析した症例においては、プロテオームデータと物理的パラメーターとの直接的な関連性は認められなかったが、原因疾患や物理的パラメーターによらず小児 CKD 患者において、尿中 EV 中の特定の分子群の発現量が変化していた。臨床応用に向けて尿中 EV の分子発現量を簡便に測定するための ELISA プロトコルも確立し (右図、Takizawa K et al, STAR Protoc. 2023) 成人 CKD への応用も視野に入れて検討を進めている。小児 CKD 患者、特にネフロン癆で物理学的パラメーターが変化するメカニズムの解明は今後の課題である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takizawa Keiichi, Ueda Koji, Sekiguchi Masahiro, Nakano Eiji, Nishimura Tatsuya, Kajiho Yuko, Kanda Shoichiro, Miura Kenichiro, Hattori Motoshi, Hashimoto Junya, Hamasaki Yuko, Hisano Masataka, Omori Tae, Okamoto Takayuki, Kitayama Hirotsugu, Fujita Naoya, Kuramochi Hiromi, Ichiki Takanori, Oka Akira, Harita Yutaka	4. 巻 25
2. 論文標題 Urinary extracellular vesicles signature for diagnosis of kidney disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105416 ~ 105416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105416	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 -

1. 著者名 Takizawa Keiichi, Nishimura Tatsuya, Harita Yutaka	4. 巻 4
2. 論文標題 Enzyme-linked immunosorbent assay to detect surface marker proteins of extracellular vesicles purified from human urine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102415 ~ 102415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2023.102415	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keiichi Takizawa
2. 発表標題 Urinary extracellular vesicles as biomarkers of pediatric kidney diseases
3. 学会等名 The 18th Congress of Asian Society for Pediatric Research (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keiichi Takizawa, Tatsuya Nishimura, Yutaka Harita
2. 発表標題 MUC1 on urinary extracellular vesicles for detection of impaired renal function
3. 学会等名 Kidney Week 2023, American society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 滝澤 慶一, 西村 竜哉, 張田 豊
2. 発表標題 尿中細胞外小胞を用いた腎機能低下の検出
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村 竜哉, 滝澤 慶一, 張田 豊
2. 発表標題 DOHaD関連慢性腎臓病スクリーニングにおける尿中細胞外小胞の有用性
3. 学会等名 第31回発達腎研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 腎機能障害診断マーカーの検出方法、腎予後の判定方法、腎機能障害診断マーカーの検出キット及び腎機能障害診断マーカー	発明者 滝澤慶一・植田幸嗣・張田豊	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/039851	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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