

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659445

研究課題名（和文） 尿中エクソソーム解析による非侵襲的腎臓病診断法の確立

研究課題名（英文） Establishment of non-invasive diagnostic method for CKD by using urinary exosomes.

研究代表者

土井 俊夫 (DOI TOSHIO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：60183498

研究成果の概要（和文）：糖尿病性腎症患者の尿より、エクソソームを単離し、ポドサイトに由来する転写因子タンパク（PDETFs）が含まれていることが判った。アルブミン尿の増加は全ての患者で殆ど差がなかったが、糖尿病性腎症のような進行性の腎機能低下を示す疾患では、尿中に PDETFs が高レベルの発現が見られた。また、糸球体内の PDETFs の発現は、エクソソーム中の増加に並行し、減少していた。エクソソーム中の PDETFs の評価と分析は、CKD と CVD の分子レベルでの関連性を理解する上での手がかりとなり得る。

研究成果の概要（英文）： We isolated exosomes from diabetic nephropathy patients and examined the expression of podocyte-derived exosomal transcriptional factors (PDETFs). To determine the severity of kidney injuries, albuminuria and PDETFs were measured and analyses. While extent of albuminuria was not different among all nephrotic syndrome patients, progressing renal diseases such as diabetic nephropathy exhibited high levels of urinary PDETFs. Glomerular expression of PDETFs was decreased in accordance with the amount of PDETFs in urine in each diabetic nephropathy patients. Evaluation and analysis of PDETFs would provide some clues to understanding the molecular linkage between CKD and CVD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病、バイオマーカー、エクソソーム、CKD、ポドサイト

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease、

CKD）の概念が提唱され、進行性の CKD は不可逆的な糸球体硬化に陥り、末期腎不全、透析導入へと進行するだけでなく、心筋梗

塞・脳卒中といった心血管イベント・死亡の重要なリスクとなることが明らかになってきていた。このような生命を脅かし、医療費の高騰を招く CKD の進展を抑制するために、より早期の診断と治療開始の重要性が認識されていた。しかし、現状では、アルブミン尿は腎疾患の鑑別には用いることができず、腎機能低下の進行速度は予測できない。

数多くの腎疾患において、現在、その診断は侵襲性の強く、頻回の反復検査の困難な腎生検によるしかない。われわれは、ここまでに糖尿病性腎症の責任分子として Smad1 を同定しており、尿中 Smad1 量が糸球体硬化の出現を正確に反映し、微量アルブミン尿よりも特異性で優れ、より早期に硬化進展を診断しうることを示していた。また、病態解析に有用と考えられる尿中バイオマーカーの候補 vesicle として、既に、さまざまなシグナル伝達分子や細胞骨格・細胞極性調節分子などが腎構成細胞の障害の程度・種類により、各細胞からエクソゾームと呼ばれる vesicle に包まれて、尿中へ分泌されることも明らかとなっていた。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病性腎症の硬化進展だけでなく、さまざまな長期の経過をたどる腎疾患の診断、予後予測、治療に対する効果判定などを分子レベルで評価し、病態解析に有用となる尿中バイオマーカーの開発を目指す。

3. 研究の方法

進行性の腎疾患においては、尿中にポドサイトが脱落することが知られている。また、尿細管障害では、尿細管上皮細胞が尿中に脱落する。ところが、これら脱落細胞のカウントだけでは、元の腎疾患の診断に用いることはできない。これまでに、マウスを用いた予備実験で、ポドサイトまたは尿細管上皮由来分子がエクソゾームタンパクとして尿中に出現し、これは細胞の脱落に先行してみられることを明らかにしている。

本研究では、腎生検で確定診断のついたヒトのさまざまな腎疾患において尿中エクソ

ゾームタンパクを抽出し、その解析によって、糸球体硬化、ポドサイト障害、尿細管間質障害などの評価を行う。病態を反映するバイオマーカーの選定・測定法の樹立を行い、そのパネル化によって、非侵襲的な腎疾患の診断、予後予測、治療効果判定を行う指標作成を目的とする。

4. 研究成果

(1) 簡易尿中エクソゾームタンパク抽出法の確立

尿中エクソゾームタンパクは、従来法では、大量の尿 (200ml) から超遠心法にてサンプル抽出を行っていたが、エクソゾームの表面マーカーを利用したカラムによる精製法を利用した少量 (1-3ml) の尿よりの抽出を可能とした。尿の採取法・保存法・添加するプロテアーゼの選択、エクソゾームの溶出などの各条件の最適化を行い、従来法である超遠心法で得られたサンプルと、スクロース密度勾配法によって、各 fraction の比較を行い、目的とするエクソゾーム内のタンパクの評価に適した簡易抽出法を確立した。

(2) 尿中エクソゾームタンパク内のバイオマーカーの選定

以前に行った、ネフローゼ症候群、腎不全、メサンギウム増殖性腎炎などのモデル動物の尿中エクソゾームタンパク解析によって、候補としていた Nephrin, Podocin, CD 2 AP などのポドサイトに特異的な分子、メサンギウム障害のマーカーである Smad1、内皮細胞障害に関しては、Endoglin など、さらに、尿細管障害に対しては、Snail, AQP2 が慢性腎臓病患者の尿中エクソゾームタンパク中にも実際に検出可能であることを Western blot 法によって確認した。腎構成細胞障害特異的でヒト尿サンプル測定に有用な尿中エクソゾームタンパクを用いて、さまざまな腎疾患において比較解析を行った。腎生検にて得られた組織を用いた免疫組織学的な解析により、病変に一致した発現であることを確認した後、動物モデルにおいても同様の発現が観察されることを確認した。生検における診断確定後に尿中エクソゾームタンパク群を経

時的に解析したところ、ネフローゼ症候群の原因がアルブミン尿では分類が不能であったが、今回発見したポドサイト由来のエクソソーム転写因子においては、腎機能に影響を与える原因と影響を及ぼさない原因とに、腎疾患を分類することがかとうとなった。また、尿中への排泄量の増加は腎不全への進行速度を反映していることが明らかとなり、腎不全への予測マーカーとしての価値を確認できた。

(3) 各種腎疾患患者の尿・腎組織サンプルのバンク化

腎生検により、確定診断の得られた腎疾患患者尿サンプルのバンク化を遂行している。倫理委員会で承認され、同意書の得られたものについて、背景となる臨床情報を連結可能な匿名化により収集し、バンク化を行った。同時に、生検を施行した腎組織も、同様に匿名化・バンク化を行った。各腎疾患において、現在用いられている、ステロイド、各種免疫抑制剤、RA系阻害薬をはじめとする、さまざまな治療に対する反応・不応例に関して、病勢に平行して推移するマーカーの選別を行った。尿タンパクのみに有効な治療、腎機能保持のみに有効な治療、または両者に有効な治療を、ポドサイト由来エクソソーム転写因子のパネル化によって、評価可能とした。同じ原因であっても、これらマーカーの変動は異なり、また、同じ治療であってもその奏効率によってマーカーが変動することが明らかとなり、各腎疾患における、治療に対する反応、病勢、予後予測に有用なマーカーを確立できた。

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4件)

(1) Abe H, Tominaga T, Matsubara T, Abe N, Kishi S, Nagai K, Murakami T, Araoka T, Doi T, Scleraxis modulates bone morphogenetic protein 4 (BMP4)-Smad1-smooth muscle α actin (SMA) signal transduction in diabetic nephropathy., J Biol Chem, 査読有、Vol.287,

2012,20430-20442,
DOI 10.1074/jbc.M111.275610

(2) 安部秀斉、心腎貧血連関における心血管イベント予測新規バイオマーカー血中Smad1の解析、腎臓、査読有、34(2)、2011、112-116

(3) 安部秀斉、冨永辰也、松原雄、土井俊夫、BMP4・Smad1シグナルと糖尿病性腎症、日本腎臓学会誌、査読有、53(7)、2011、1000-1005

(4) 安部秀斉、糖尿病性腎症の病因解析の進歩、臨床病理、査読有、59(2)、2011、179-186

[学会発表] (計4件)

(1) 金井麻衣、冨永辰也、安部秀斉、美馬晶、林早苗、長井幸二郎、土井俊夫、糸球体腎炎におけるCD44作用機序の解析、第85回日本生化学会大会、2012年12月14日～16日、福岡国際会議場(福岡県)

(2) 安部尚子、林早苗、土井俊夫、安部秀斉、Predictive biomarkers for kidney function declines: podocyte-derived exosomal transcriptional factors、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～14日、福岡国際会議場(福岡県)

(3) 安部尚子、安部秀斉、土井俊夫、新規バイオマーカーとしての尿中エクソソームによる慢性腎臓病患者の病態解析、第58回日本臨床検査医学会学術集会、2011年11月18日、岡山コンベンションセンター(岡山県)

(4) 林早苗、安部秀斉、冨永辰也、安部尚子、近藤直樹、土井俊夫、尿中エクソソームを用いた慢性腎臓病の非侵襲的診断法と予後予測、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月15日、パシフィコ横浜(神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井 俊夫 (DOI TOSHIO)

徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部・教

授

研究者番号：60183498

(2) 研究分担者

安部 秀斉 (ABE HIDEHARU)

徳島大学大学院・ヘルスハイサイエンス研究部・准教授

研究者番号：60399342

富永 辰也 (TOMINAGA TATSUYA)

徳島大学大学院・ヘルスハイサイエンス研究部・助教

研究者番号：80425446

岸 誠司 (KISHI SEIJI)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：10519507

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：