

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592439

研究課題名(和文)多発性嚢胞腎における細胞微小小胞の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of urinary exosome in ADPKD

研究代表者

堀江 重郎 (Horie, Shigeo)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40190243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CKD Gstage4患者ならびにADPKD患者から、尿中のexosomeを抽出し、含まれているmicroRNAを網羅的に解析した。この結果i)Wnt/b-catenin/GSK-3 b ii)がん遺伝子の発現調節 iii)腎細胞癌iv)がん抑制遺伝子v)炎症、酸化ストレスの抑制に関するmicroRNAがCKD患者に比して有意にADPKD患者において増加していた。

本研究からADPKDには特異的なmicroRNAが尿中exosomeから検出でき、これらのmicroRNAはADPKDのprognostic, predictive factorとなる可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Urinary exosome was isolated from either CKD Gstage4 or ADPKD patients upon consent, and the identified microRNA was compared between these 2 groups. MicroRNAs specific for Wnt/b-catenin/GSK-3, regulating Oncogenes, associated with renal cell carcinoma, tumor suppressor gene, and inhibitory for inflammation were more expressed in ADPKD. Specific microRNAs identified from urinary exosome of ADPKD patients can be either prognostic or predictive for the clinical course of ADPKD.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：ADPKD 多発性嚢胞腎 exosome microRNA

1. 研究開始当初の背景

常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)は、約 1,000 ~2000 人に 1 人に発症する最も頻度が高い遺伝性腎疾患である。多発性嚢胞腎患者の 85% は 16 染色体上の PKD1 遺伝子に異常があり、残りの 15% は 4 染色体上の PKD2 遺伝子の異常であることが知られている。これらの遺伝子産物である polycystin1 および 2 は尿細管の形態と機能の維持に働いている。多発性嚢胞腎の本邦の推定患者数は、約 30000 人であり、60 歳台までに患者の半数は、終末期腎不全へと進行する。腎嚢胞形成には種々のサイトカインや細胞増殖因子が関与しているが、申請者は、HGF が塩濃度が高い近位型嚢胞に高濃度に存在し、また cAMP が塩濃度が低い遠位型嚢胞に高濃度であることを初めて報告した。cAMP は多発性嚢胞腎患者から得られた嚢胞上皮細胞の増殖を促進すること、また嚢胞腎モデル動物である PCK ラットおよび pcy マウスでは腎において cAMP 量が増加しており、cAMP により転写調節される aquaporin2 およびバゾプレッシン V2 レセプターの発現が増加していることから、cAMP は嚢胞の増大と上皮の増殖の両方に関与していると考えられる。ADPKD では、腎嚢胞の形成により腎の構造が破壊され、濃縮力障害が起こり、バゾプレッシンが恒常的に高値となる。そこでバゾプレッシン V2 レセプター阻害薬をこれらの動物モデルに投与したところ、腎 cAMP 含有量が減少し、嚢胞形成が劇的に抑制された。バゾプレッシン V2 受容体阻害薬は腎嚢胞の増大を抑え、慢性腎臓病(CKD)の進行も抑制する。またわれわれは糖尿病治療薬であるチアゾリジン系薬剤が PKD1 欠損マウスで腎嚢胞を発生時から抑制することを発見した。さらにわれわれは京都大学との共同研究により、PKD1 欠損マウスから induced-pluripotent 細胞 (PKD iPS 細胞)を作成した。PKD iPS 細胞を腎臓に導入した PKD1 欠損マウスでは、嚢胞形成が抑制され、細胞治療について新たな可能性が開かれつつある。このように創薬について近年進歩があるものの、多発性嚢胞腎の発症の分子機序についての理解は未だ十分で

ない。一方 多発性嚢胞腎の分子創薬が盛んになるにつれて、治療介入時期と治療効果の判定には、分子病態を示すバイオマーカーの必要性が高まっている。糸球体濾過量を基準とする血中クレアチン値やシスタチン C は、多発性嚢胞腎が尿細管間質疾患であるため鋭敏なバイオマーカーではない。また多発性嚢胞腎では、嚢胞形成と同時に尿細管の萎縮、蛋白尿が見られ、レニン-アンギオテンシン系 (RAS) の亢進と炎症性サイトカインの産生が見られる。しかしこれらの現象は病態がかなり進行してから出現するため、尿中の MCP-1 をはじめとするサイトカインも病態のバイオマーカーとしては有用でない。すなわち腎機能が正常に維持されている段階で腎臓に起こる変化を捕捉するバイオマーカーが必要になってくる。

われわれは多発性嚢胞腎の疾患遺伝子 PKD1 を欠損したマウスを本邦ではじめて作成し、その腎臓尿細管細胞を観察すると、尿細管は正常の形態ながら細胞の E-cadherin の発現が減少することが、嚢胞形成に進展する第一歩であることを発見、報告した。この研究から腎尿細管の細胞接着の異常が嚢胞形成の初期病態として重要であると考えられる。ADPKD では尿細管細胞の極性が失われ、上皮間質転換(EMT)を生じた嚢胞上皮細胞の増殖と間質での血管新生が生じる。マクロ的には嚢胞形成とともに腎実質に炎症が生じ、腎の萎縮が生じる。最近になり、細胞間接着による細胞のコミュニケーションには、細胞が産出する微小小胞 (microvesicle) が関与することが明らかになった。microvesicle は、細胞内の小胞由来の膜構造が細胞外へ分泌される exosome と、細胞膜が細胞質を含んで細胞から産出される shedding vesicle に分類される。尿中 exosome は、ネフロンから分泌され 40-80 nm の大きさを持つ。shedding vesicle は 100 nM-1 μ M の大きさを持ち、その産生は細胞内カルシウム濃度と細胞接着に。microvesicle は体液内に存在し、サイトカインなどの生理活性物質、蛋白、RNA を含んでいる。microvesicle は、膜受容体をはじめとする蛋白の供給、mRNA、microRNAなどを細胞に供給することで、免疫細

胞や血管内皮細胞などの標的細胞の活性化、炎症、動脈硬化、がん細胞のアポトーシス抑制などの病態への関与や、発生において細胞の分化過程を改変することが知られている。

exosome は超遠心法によりはじめて沈殿する分画に含まれ、また尿中 exosome の特徴として水チャネルアクアポリン(AQP2)を豊富に含んでいる。現在健常者の尿中には約 300 種類の蛋白が exosome に含まれており、尿細管、糸球体、尿路上皮細胞由来の蛋白が確認されている。これらの蛋白は質量分析により比較的容易に解析できる。さらに尿中 exosome は蛋白質のみならず mRNA, microRNA も含んでいることから、細胞 細胞間相互作用を反映していることが報告され、包括的な遺伝子発現解析が腎組織の採取を必要とせずに、尿の採取のみで行える可能性もある。

研究成果として多発性嚢胞腎の発症初期に特異的な microRNA が microvesicle に得られれば、病態の理解に重要な分子である可能性があり、また関連する細胞内情報伝達系を解析することは分子創薬の可能性を開拓する。また microvesicle の機能を解析することにより、多発性嚢胞腎の早期治療介入に活用できる可能性がある。

2 . 研究の目的

1 . 多発性嚢胞腎患者尿に含まれる炎症性サイトカインなどのバイオマーカーを探索し、正常者と比較する。また多発性嚢胞腎のマウスモデルである DBA/2FG-*pcy* の尿中のバイオマーカーと腎で発現されている蛋白を比較し、バイオマーカーの有用性を検討する。

2 . 尿中分泌細胞小体 (exosome) とは、細胞内の小胞由来の膜構造を総称し、尿中 exosome は、ネフロンから分泌され 40-80 nm の大きさを持つ。尿中 exosome は蛋白質のみならず mRNA, および microRNA も含んでいることから、細胞-細胞間相互作用を反映していることが報告されている。嚢胞形成時の、microvesicle の動態と、含まれる蛋白を解析することにより、多発性嚢胞腎の創薬につながる新規標的分子を同定することを目標と

する。

3 . 研究の方法

1 .

6名の健常者と23名の多発性嚢胞腎患者の尿から ELISA 法により、尿中 PKD1N, PKD1C, PKD2C, AQP2, vWF, IL-8, IL-18, M-CSF, VEGF, IFNAE2, TFF1, TFF2, TFF3, PEPI, and NGAL, vasopressin, aldosterone, HGF, cAMP, MCP-1 (R&D Systems, Inc.), 8-OHdG, 8-Isoprostane, L-FABP, angiotensinogen, LDH, lysozyme and ceruloplasmin を測定し、尿中クレアチニンで補正した。

2 . DBA/2FG-*pcy*マウスとその野生型の

DBA/2Jclの尿中のNGAL, M-CSF, MCP-1 を測定した。腎よりRNAを抽出し、マイクロアレイ microarray (Mouse Genome 430 2.0 Array, Affymetrix, Inc., OH, USA)により遺伝子発現解析を行った。

3 . 多発性嚢胞腎尿 exosome 抽出と microRNA の発現の検討

健常者と多発性嚢胞腎患者より早朝尿を採取し、プロテアーゼ阻害薬を加え、17,000g 4 15 分間遠心し、この上清をさらに 200,00g の超遠心機で 1 時間遠心する。ペレットを SDS-PAGE で電気泳動した後、抗水チャネル AQP2 (アクアポリン) 抗体で western blot を行い、AQP2 蛋白の存在を確認することで exosome であるか確認する。

CKD Gstage4 患者ならびに ADPKD 患者から、尿中の exosome を抽出し、含まれている microRNA を網羅的に解析した。

4 . 研究成果

1 . 多発性嚢胞腎患者では、vWF, IFNAR2, M-CSF, 8-OHdG, IL-8, TFF3, HGF, MCP-1, ceruloplasmin, PEPI が有意に高値を示した。DBA/2FG-*pcy* においては野生型に比べて NGAL, ceruloplasmin, M-CSF, vWF の発現が有意に高かった。また尿中では NGAL, M-CSF, MCP-1 が有意に高値であった。

2 .

i) Wnt/b-catenin/GSK-3 b ii) がん遺伝子の発現調

節 iii)腎細胞癌 iv)がん抑制遺伝子 v)炎症、酸化ストレスの抑制に関する microRNA が CKD 患者に比して有意に ADPKD 患者において増加していた。本研究から ADPKD には特異的な microRNA が尿中 exosome から検出でき、これらの microRNA は ADPKD の prognostic, predictive factor となる可能性があることが示唆された。

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 20 件)

1: Nakajima A, Lu Y, Kawano H, Horie S, Muto S. Association of arginine vasopressin surrogate marker urinary copeptin with severity of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). Clin Exp Nephrol. 2015 Feb 27. [Epub ahead of print]

2: Muto S, Kawano H, Higashihara E, Narita I, Ubara Y, Matsuzaki T, Ouyang J, Torres VE, Horie S. The effect of tolvaptan on autosomal dominant polycystic kidney disease patients: a subgroup analysis of the Japanese patient subset from TEMPO 3:4 trial. Clin Exp Nephrol. 2015 Feb 7. [Epub ahead of print]

3: Kawano H, Muto S, Ohmoto Y, Iwata F, Fujiki H, Mori T, Yan L, Horie S. Exploring urinary biomarkers in autosomal dominant polycystic kidney disease. Clin Exp Nephrol. 2014 Dec 28. [Epub ahead of print]

4: Yoshihara D, Kugita M, Sasaki M, Horie S, Nakanishi K, Abe T, Aukema HM, Yamaguchi T, Nagao S. Telmisartan ameliorates fibrocystic liver disease in an orthologous rat model of human autosomal recessive polycystic kidney disease. PLoS One. 2013 Dec 6;8(12):e81480.

5: Cheng LT, Nagata S, Hirano K, Yamaguchi S, Horie S, Ainscough J, Tada T. Cure of ADPKD

by selection for spontaneous genetic repair events in Pkd1-mutated iPS cells. PLoS One. 2012;7(2):e32018.

[学会発表] (計 5 件)

1. Horie S, Muto S, Mochizuki T, Tsuchiya T, Nishio S, Hanaoka K, Tsuruya K, Ishimura E, Narita I, Kamura K, Ubara Y, Nutahara K. The compiling data at the time of enrollment in J-PKD registry. World Congress of Nephrology 2013, 2013/5/31-6/4, Hong Kong, China.

2. Muto S, Mochizuki T, Tsuchiya K, Nishio S, Hanaoka K, Tsuruya K, Ishimura E, Narita I, Kamura K, Ubara Y, Ando M, Nutahara K, Horie S. The compiling data at the time of enrollment in J-PKD registry. 46th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Nov.7-Nov.10, 2013 in Atlanta, USA.

3. 中島 晶子, 武藤 智, 杉浦 正一郎, 堀内 明, 古謝 将之, 井上 正浩, 野間 康央, 北村 香介, 常盤 紫野, 斎藤 恵介, 吉井 隆, 磯谷 周治, 井手 久満, 山口 雷蔵, 堀江 重郎. 反復する嚢胞感染に対して術前検討用腎三次元立体モデルを作成し開窓術を行った ADPKD 患者の一例. 第 78 回日本泌尿器科学会東部総会. 東京. 2013/10/17-19.

4. 中島 晶子, 武藤 智, 杉浦 正一郎, 堀内 明, 古謝 将之, 井上 正浩, 野間 康央, 北村 香介, 常盤 紫野, 斎藤 恵介, 吉井 隆, 磯谷 周治, 井手 久満, 山口 雷蔵, 堀江 重郎. 反復する嚢胞感染に対して術前検討用腎三次元立体モデルを作成し開窓術を行った ADPKD 患者の一例. 第 43 回日本腎臓学会東部学術大会. 東京. 2013/10/4-5.

5. 武藤 智, 望月俊雄, 土谷 健, 奴田原紀久雄, 西尾妙織, 花岡一成, 鶴屋和彦, 石村栄治, 成田一衛, 香村衡一, 乳原善文, 堀江重郎. 多発性嚢胞腎患者全国登録による多施設共同研究 (J-PKD レジストリー研究) の登録時データの集計. 第 56 回日本腎臓学会学術総会. 東京. 2013/5/9-12.

6 . 研究組織

(1)研究代表者 堀江重郎

(Shigeo Horie)

順天堂大学大学院・医学系研究科・泌尿器外科
学教授

研究者番号 : 40190243