

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860624

研究課題名(和文) 転移RNAの挙動に基づいた新規腎障害マーカーの確立

研究課題名(英文) Conformational change in transfer RNA is an early indicator of acute cellular damage

研究代表者

三島 英換 (Mishima, Eikan)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00706939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：tRNAの構成成分である修飾核酸1-メチルアデノシンの挙動変化を検知することが急性腎傷害の新しいバイオマーカーとなることを明らかにした(Mishima, JASN, 2014)。また大迫研究コホートのサンプルを用いた一般住民の解析から血中の1-メチルアデノシン濃度がその後の総死亡率と相関することを明らかにした。さらに本研究の過程から各種修飾塩基(1-メチルアデノシン、N6メチルアデノシン、シュードウリジン、5-メチルシチジン)に対するモノクローナル抗体を使用してRNA内の修飾を簡便に検出するImmuno-Northern blotting法を確立した(Mishima, PLoS ONE, 2015)。

研究成果の概要(英文)：We revealed that the detection of 1-methyladenosine, which is a modified nucleoside containing in transfer RNA, is a useful new biomarker for diagnosis of acute kidney injury (Mishima et al. JASN, 2014). In addition, we showed that circulating 1-methyladenosine levels are significantly associated with the mortality in the general population using the sample of Ohasama cohort study. Therefore, tRNA damage reflects early oxidative stress damage, and detection of tRNA damage may be a useful tool for identifying organ damage and forming a clinical prognosis. Furthermore, we developed a method for detecting RNA modifications called immuno-northern blotting analysis and confirmed its various capabilities (Mishima et al. PLoS ONE, 2015).

研究分野：腎臓病学

キーワード：tRNA 転移RNA 急性腎障害 修飾核酸 1-メチルアデノシン シュードウリジン 酸化ストレス バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

tRNA は一般にはタンパク質の翻訳時にアミノ酸をリボソームに運搬する役割が知られているが、その役割のみならず酸化ストレスに対する細胞内ダメージ応答メカニズムとして tRNA の関与の重要性が近年注目され始めている。また small non-coding RNA の一種である micro RNA 挙動が新たな病態疾患マーカーとして有用性が報告されつつある。そこで我々は同じ small non-coding RNA の中でも転移 RNA (transfer RNA, tRNA) に着目し、細胞障害時の転移 RNA (tRNA) の挙動を検知することが新規の組織障害のバイオマーカーとなりうることを見出してきた。中でも tRNA 上の構成成分の一つで修飾塩基である 1-メチルアデノシンが組織障害時に血中に増加することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

(1) 組織障害を早期に検知する新しいマーカーとして tRNA 分解産物である 1-メチルアデノシンの臨床有用性を確立する。

(2) tRNA 代謝産物濃度の測定が予後判定因子となりうるか、一般住民における血中の tRNA 代謝産物濃度とその予後との関連の検討する。

(3) 我々は tRNA 構成成分を検出する方法を検討する過程で、我々は修飾塩基に対する抗体を用いて RNA 修飾の検出する方法であるイムノノーザンプロット法 (Immuno-Northern Blotting) を新たに開発した。このイムノノーザンプロット法のプロトコルを確立させ、その有用性の検討を行う

3. 研究の方法

(1) 急性腎傷害時の血中 1-メチルアデノシン濃度の変化検討

腎障害モデルとしてラット虚血再灌流モデル (腎動脈を 60 分間血管クリップで遮断後に解除)、シスプラチン誘導性腎障害モデル (20mg/kg を腹腔内投与)、ブタ虚血再灌流モデル (両側腎動脈を 15 分間血管クリップで遮断後に解除) を用いた。各モデルにおいて経時的に採取した血漿中の 1-メチルアデノシン濃度を EILSA または LC-MS/MS 法を用いて測定した。その結果、血中 1-メチルアデノシン濃度は腎障害後すみやかに上昇を認めることが明らかとなった。またブタ虚血再灌流モデルにおいて全身末梢血と腎静脈からそれぞれ採取した血漿サンプルを比較すると血中 1-メチルアデノシン濃度は腎静脈中でより高値であった。そのため急性腎傷害後に増加する血中 1-メチルアデノシンの由来は傷害を受けた腎組織に起因する

ことが示唆された。

さらにヒトの胸部大動脈瘤の患者の術中から術後の血液検体を用いて検討を行った。大動脈置換術の術中には手術手技上、腎臓の一定時間の虚血とその後の再灌流が不可避であり急性腎傷害が高い確率で起きうる。この大動脈置換術を受けた患者の術中から術後に採取した血漿検体を用いて血中 1-メチルアデノシン濃度を EILSA 法を用いて測定した。その結果、血中 1-メチルアデノシン濃度は腎臓の虚血再灌流の 10 分後から有意な血中濃度の上昇をみとめた。その上昇のタイミングは一般的な腎障害マーカーである血清クレアチニンや KIM-1 よりも早期の時期から上昇していた (図 1)。以上から血中 1-メチルアデノシン濃度は急性腎傷害を早期に検知するバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

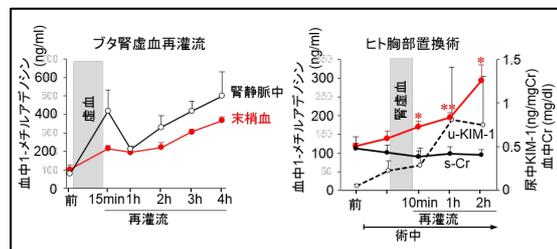


図 1. ブタ虚血再灌流モデル (左) およびヒト大動脈置換術 (右) の術中の血中 1-メチルアデノシン濃度の変化 (発表文献 10 より引用)

(2) 血中 1-メチルアデノシン濃度が高い状態は慢性的酸化ストレス状態を反映しているという仮説の検証のため、大迫研究コホートの一般住民サンプルを用いて、血中 1-メチルアデノシン濃度と予後との関連性について検討した。一般住民 1,033 人から回収した血清中の 1-メチルアデノシン濃度を LC-MS/MS によって測定した。6.7 年の平均フォローアップ期間で 72 人の死亡を認めた。単変量解析では血中総死亡率に相関性を認めた。またこの相関は年齢、性別、収縮期血圧、腎機能、喫煙、高血圧治療歴、糖尿病の有無、高脂血症、心血管死亡率で多変量解析しても両者相関性を認め、血中濃度が最も高い群は低い群と比較して 3.05 倍の総死亡の相対危険度が高かった (図 2)。以上から血中 1-メチルアデノシン濃度はその後の予後と相関しており、血中 1-メチルアデノシン濃度が高い状態は慢性的酸化ストレス状態を反映している可能性が示唆された。

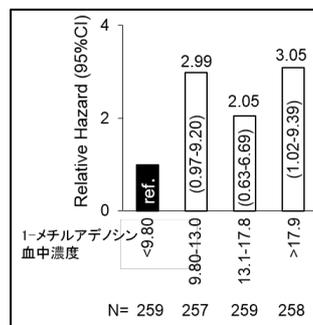


図 2. 血中 1-メチルアデノシン濃度と総死亡率の相関

### (3) ストレス誘導性 tRNA 分解酵素 Angiogenin KO マウスの解析

細胞内の tRNA は酸化ストレス曝露時に tRNA 分解酵素の一つである angiogenin によって半分に切断され half-tRNA の状態である tiRNA へと分解される。この angiogenin のノックアウトマウスを作成し、組織障害時の tRNA の挙動の変化および組織障害に与える表現形への違いについて検討を行った。Ang1-KO マウスは通常飼育では野生型マウスと同等の体重変化で成長を認めた。また 20 週齢までの通常飼育下での観察では明らかな表現形の違いを認めなかった。tRNA のストレス誘導性の分解のモデルとして行った肝臓の虚血再灌流モデルにおいては Ang1-KO マウスにおいて野生型と比較して組織障害時の tiRNA の出現量の減少を認めた。本結果は Ang1 が欠損していることで酸化ストレス曝露による tRNA の分解が KO マウスでは減少していることを示した所見である。このストレス誘導性 tRNA 分解の減少が組織障害の程度に変化を与えるか検討を行った。しかし肝虚血再灌流モデルでは肝臓の組織障害の程度は Ang1-KO マウスと野生型マウスの間で有意な差を認めなかった。今後は他の組織障害モデルでの検討をすすめる予定である。

### (4) イムノノーザンプロットング法のプロトコル検討と有用性の評価。

RNA 修飾を検出する方法として、修飾塩基に対する抗体を使用して検出するイムノノーザン法を開発した。イムノノーザン法は、抗体を利用して目的タンパク質を検出するウェスタンプロットング法と、相補的プローブを使用して目的 RNA を検出するノーザンプロットング法の両者の原理をハイブリッドさせた方法である。概略としては、アクリルアミドゲルもしくはアガロース電気泳動でサンプル中の RNA を分離をした後に、ゲル内の RNA をポジティブチャージナイロンメンブレンへ転写を行う。その後 RNA が転写されたメンブレン上で標的修飾塩基に対する抗体と反応させることで、標的修飾塩基を含む RNA を検出する方法である(図 3)。

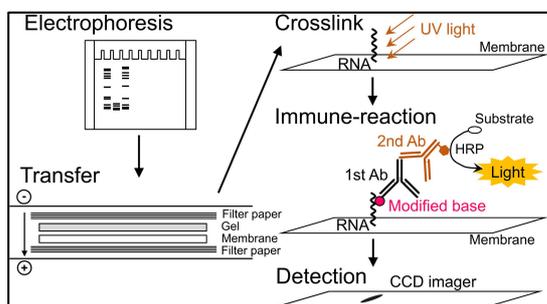


図 3. イムノノーザン法の概略 (発表文献 2 より引用)

RNA 中の修飾塩基の内 1 - メチルアデノシン、N6 - メチルアデノシン、シュードウリジン、5 - メチルシチジンについて各特異的抗体を用いてイムノノーザン法で解析することで生物種、細胞種、オルガネラ毎に RNA 修飾のパターンが異なることを明らかにした(図 4)

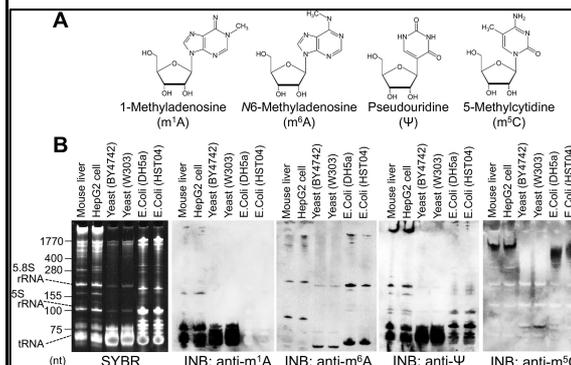


図 4. 各修飾塩基に対する抗体を用いたイムノノーザン法の検討 (発表文献 2 より引用)

### 4. 研究成果

(1) 血中の 1-メチルアデノシン濃度が急性腎障害の鋭敏なバイオマーカーとなりうることを明らかにした。

(2) tRNA 由来代謝産物である血中の 1-メチルアデノシン濃度が予後予測因子となりうることを明らかにした。

(3) RNA 修飾を簡便にかつ定量性に優れた検出法であるイムノノーザン法を新たに確立した。また本研究の過程で樹立を行った 1 - メチルアデノシン、5 - メチルシチジン及びシュードウリジンのモノクローナル抗体が今後の研究で広く使用できるように一般購入可能な状態とした (現在 MBL 社から購入可能な状態となっている。)

### 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 14 件)

- Mishima E (8 名中 1 番目) Impact of Small Renal Ischemia in Hypertension Development: Renovascular Hypertension Caused by Small Branch Artery Stenosis. J.Clin.Hypertens. (Greenwich)2016;18:248-249. doi: 10.1111/jch.12661 査読あり
- Mishima E (14 人中 1 番目) Immuno Northern Blotting: Detection of RNA Modifications by Using Antibodies against Modified Nucleosides. PLoS One. 2015;10: e0143756. 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0143756
- Mishima E (15 名中 1 番目) Alteration of the Intestinal Environment by Lubiprostone Is Associated with Amelioration of Adenine

Induced CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26: 1787-94, 2015. 査読あり doi: 10.1681/ASN.2014060530

4. Takeuchi Y, **Mishima E** (16名中2番目) Exonic Mutations in the SLC12A3 Gene Cause Exon Skipping and Premature Termination in Gitelman Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26: 271-9, 2015. 査読あり doi: 10.1681/ASN.2013091013

5. **Mishima E** (7名中1番目) Posterior reversible encephalopathy syndrome treated with renin-angiotensin system blockade. *J. Neurol. Sci.* 355: 219-21, 2015. 査読あり doi: 10.1016/j.jns.2015.06.007

6. **Mishima E** (10名中1番目) Detection of Segmental Renal Ischemia by Diffusion Weighted Magnetic Resonance Imaging: Clinical Utility for Diagnosis of Renovascular Hypertension. *J. Clin. Hypertens.* (Greenwich). 2016;18:364-5, 2015. doi: 10.1111/jch.12675 査読あり

7. Suzuki T, **Mishima E** (32人中13番目) Mitochondrial Acid 5 (MA-5), a Derivative of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid, Improves Survival of Fibroblasts from Patients with Mitochondrial Diseases. *Tohoku J. Exp. Med.* 236: 225-32, 2015. 査読あり doi: 10.1620/tjem.236.225

8. Endo S, **Mishima E** (9人中2番目) Periodontitis-associated septic pulmonary embolism caused by Actinomyces species identified by anaerobic culture of bronchoalveolar lavage fluid: a case report. *BMC Infect Dis.* 2015;15:552. 査読あり doi: 10.1186/s12879-015-1286-0.

9. Suzuki T, **Mishima E** (41人中20番目) Mitochondrial Acid 5 Binds Mitochondria and Ameliorates Renal Tubular and Cardiac Myocyte Damage. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Epub ahead 査読あり, pii: ASN.2015060623

10. **三島英換** 阿部高明 生活習慣病と酸塩基平衡: CKDと酸塩基平衡 *Medicament News* 2206, 10-11, 2015. 査読なし

11. **Mishima E** (35人中1番目) Conformational change in transfer RNA is an early indicator of acute cellular damage. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25: 2316-26, 2014. 査読あり doi: 10.1681/ASN.2013091001

12. **三島英換** 伊藤貞嘉 阿部高明 急性組織障害時における transfer RNA の挙動 検知: 特異的修飾塩基抗体を用いた解析 *Proceedings of clinical electron microscopy*, 33, 2014, 13-18 査読なし

13. **三島英換** 伊藤貞嘉 最新臨床高血圧学 高血圧治療の最前線 合併症を有する高血圧: *CKD 日本臨床* 72 (supple 6): 454-58, 2014. 査読なし

14. 阿部高明 **三島英換** 伊藤邦彦 林謙一郎 慢性腎臓病の病態と新規治療 *日本内科学会雑誌* 103: 2158-62, 2014. 査読なし

〔学会発表〕(計11件)

1. **三島英換** (発表者) 尿毒素蓄積における腸内細菌叢の関与 -無菌腎不全マウスと CE-TOFMS を用いた解析-, 第58回日本腎臓学会学術総会、2015年6月5-7日、国際会議場(愛知県名古屋市)
2. **Mishima E** (発表者), Lubiprostone Ameliorates the Progression of Chronic Kidney Disease By Altering the Intestinal Environment, *Kidney Week ASN 2014*, 13-15/11/2014, Philadelphia (USA)
3. **三島英換** (発表者) メタゲノムとメタボローム解析による腎不全時の腸内環境変化の検討、第57回日本腎臓学会学術総会、2014年7月4~6日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)  
・その他発表者として8件の学会発表あり。

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 細胞ストレス状態のバイオマーカー  
発明者: 阿部高明、伊藤邦彦  
権利者: 国立大学法人東北大学、静岡県公立大学法人  
種類: モノクローナル抗体  
番号: 特願 2011-184506、特開 2013-44698  
出願年月日: 平成23年8月26日出願  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

東北大学病院腎高血圧内分泌科:

<http://www.int2.med.tohoku.ac.jp/index.html>

東北大学大学院医工学研究科 分子病態医工学分野:

<http://plaza.umin.ac.jp/~takaabe/>

本研究を通じて樹立した1-メチルアデノシン、5-メチルシチジン及びシュードウリジンモノクローナル抗体は現在 MBL 社から一般購入可能な状態となっている(それぞれ Code No. D345-3、D346-3、D347-3)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三島 英換 (Mishima, Eikan)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 00706939