

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461245

研究課題名(和文) アンジオテンシンIV受容体可溶性成分の高感度測定系構築と臨床的有用性の評価

研究課題名(英文) Establishment of a high sensitivity measurement system for soluble angiotensin IV receptor and evaluation of the utility

研究代表者

此下 忠志 (Konoshita, Tadashi)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：40270954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：私たちはこれまで高血圧や糖尿病に関係する新しいタンパク質としてDNA遺伝子チップを用いた網羅的な解析から、高血圧に関係するレニン-アンジオテンシン系と糖尿病に関係するインスリンの両方に関係するタンパク質アンジオテンシンIV受容体を抽出し、その血液濃度の測定法を開発しました。今回はその精度を上げるためにモノクローナル抗体を用いた方法に取り組み、大幅に感度の改善した次世代型測定方法を開発しました。生活習慣病の診療に役立つことが期待されます。

研究成果の概要(英文)：We had identified Angiotensin IV (AT4) receptor as a hypertension/diabetes specific gene through genetic DNA chip analysis and we had already established a measurement system for this AT4. This time we tried to improve the sensitivity of the measurement by monoclonal antibody methods and as a result we could established a next generation measurement system for AT4 with largely improved sensitivity. This measurement system would be of use for medical care of life-style related diseases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アンジオテンシンIV受容体 LNPEP IRAP レニン-アンジオテンシン系 高血圧 糖尿病 糖尿病性腎症

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで申請者らは腎生検組織を用いた網羅的発現遺伝子解析(図1)により、Ontology解析、Pathway解析を介して高血圧/糖尿病に特有な発現変動を示す遺伝子としてアンジオテンシンIV受容体(AT4)を抽出しました。

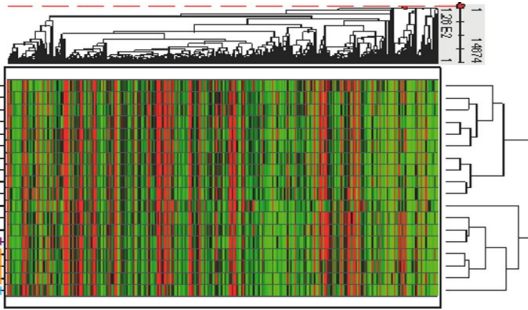


図1

想定される可溶成分(sAT4)に対してまずポリクローナル抗体による感度0.01nmol/mlレベルのサンドイッチELISA法による測定系を確立しました(図2)。

sIRAP/AT4 (LNPEP) Assay System



標準品濃度 (nM)	吸光度 (450nm)
0	1.892
2.5	0.932
1.25	0.493
0.625	0.262
0.313	0.180
0.156	0.120
0.078	0.093
0 (検体ブランク)	0.058

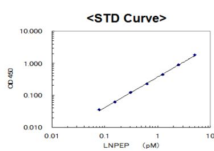


図2

臨床症例652例の血漿濃度の測定では、血圧や糖代謝異常を含む生活習慣病に関連した病態により統計学的に有意な差異を認める成績が得られており、生物学的な解釈としても整合性のある成績と考えられました。しかしながら感度については、血漿での陽性率が必ずしも高くありません(図3)。

652例の測定成績

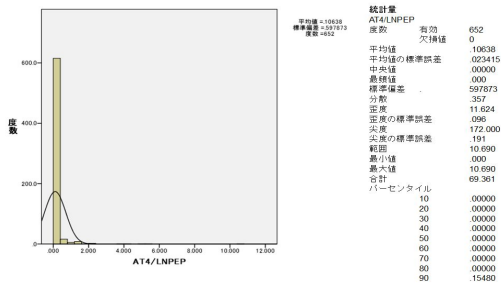


図3

2. 研究の目的

そこでモノクローナル抗体を用いることによる高感度測定系を確立することにより

臨床上大変有意義なバイオマーカーとなることが強く期待され、これを構築し臨床症例で評価することを目的としました。

3. 研究の方法

このため、まず抗原タンパク質(標準物質)としての人工合成遺伝子を作製し、発現細胞により培養調製し、次にマウスを免疫しハイブリドーマを作製、クローニングしモノクローナル抗体を精製、高感度ヒト sAT4 ELISA キットを構築する実験系を計画しました。初年度の平成25年度には、人工合成遺伝子の作製、培養調製まで進め、発現ベクターの構築によるCHO細胞での発現を確認しました(図4)。

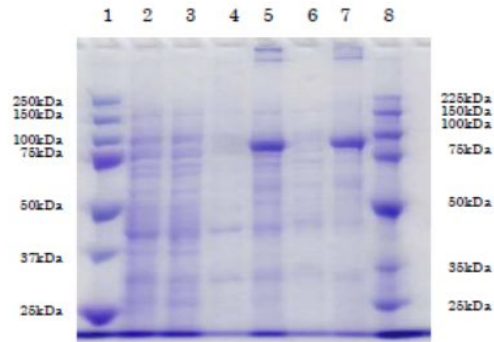


図4

しかし、収量が十分であり、リコンビナントタンパクによるモノクローナル抗体作成に切り替えました。

4. 研究成果

手順としてマウスの免疫、脾臓、リンパ節とX63との細胞融合を行い、上清によるスクリーニングを進めたところ多数の陽性クローンが作成されました。発現量の多い適当数のクローンを選択、サンドイッチELISA法による組み合わせ試験を複数ステップで実施し徐々に選別した結果、標識側についてはあるFab'抗体(図5)が最適と考えられました。

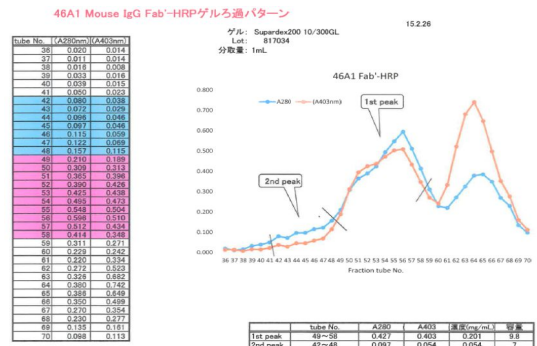


図5

一方固相化側には2つの候補が残りましたが最終的にそのうちの1つを選定し(図6) これを用いる組み合わせが最適と考えられサンドイッチELISA法による測定系の2

抗体について最終決定としました。

Anti-LNPEP Biotin サンドイッチ Assay

46A1 抗体での検定

標準	Anti-LNPEP Mouse IgG (Bio+)	46A1	46A3	55A2	57A2	62A2	77A1	46A1	46A3	55A2	57A2	62A2	77A1
Plate	Anti-LNPEP Mouse IgG (Bio+)	46A3	55A2	57A2	62A2	77A1	46A1	46A3	55A2	57A2	62A2	77A1	46A1
STD	1000.00	0.170	0.084	0.170	0.087	0.343	0.228	0.101	0.088	0.117	0.120	0.093	0.093
	200.00	0.080	0.039	0.039	0.114	0.084	0.097	0.048	0.052	0.039	0.059	0.059	
	62.50	0.046	0.021	0.020	0.054	0.033	0.034	0.044	0.043	0.045	0.044	0.049	
	19.5	0.026	0.013	0.012	0.041	0.024	0.031	0.044	0.040	0.045	0.049	0.049	
	3.81	0.018	0.011	0.004	0.030	0.030	0.041	0.037	0.039	0.040	0.040	0.040	
Biotin 抗体 (Bio+)	0.030	0.016	0.003	0.014	0.013	0.049	0.054	0.054	0.057	0.052	0.052	0.052	
Biotin 抗体 (Bio-)	0.000	-0.003	0.001	0.006	0.001	-0.001	-0.001	0.002	-0.001	0.001	0.001	0.001	

ブランク補正

標準	Anti-LNPEP Mouse IgG (Bio+)	46A1	46A3	55A2	57A2	62A2	77A1	46A1	46A3	55A2	57A2	62A2	77A1
Plate	Anti-LNPEP Mouse IgG (Bio+)	46A3	55A2	57A2	62A2	77A1	46A1	46A3	55A2	57A2	62A2	77A1	46A1
STD	1000.00	0.170	0.084	0.170	0.087	0.343	0.228	0.101	0.088	0.117	0.120	0.093	0.093
	200.00	0.080	0.039	0.039	0.114	0.084	0.097	0.048	0.052	0.039	0.059	0.059	
	62.50	0.046	0.021	0.020	0.054	0.033	0.034	0.044	0.043	0.045	0.044	0.049	
	19.5	0.026	0.013	0.012	0.041	0.024	0.031	0.044	0.040	0.045	0.049	0.049	
	3.81	0.018	0.011	0.004	0.030	0.030	0.041	0.037	0.039	0.040	0.040	0.040	
Biotin 抗体 (Bio+)	0.030	0.016	0.003	0.014	0.013	0.049	0.054	0.054	0.057	0.052	0.052	0.052	
Biotin 抗体 (Bio-)	0.000	-0.003	0.001	0.006	0.001	-0.001	-0.001	0.002	-0.001	0.001	0.001	0.001	

図 6

この組み合わせによりモノクローナル抗体によるキットを作成し、実際のプレートを用いて測定を試みました(図7)

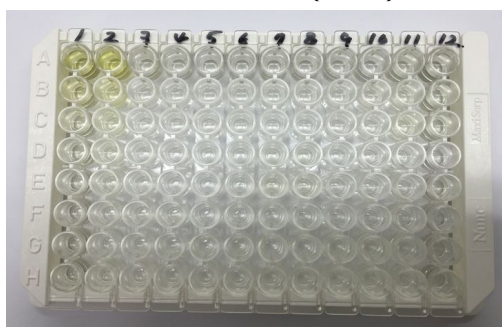


図 7

標準物質の希釈段階についてプレートリーダーにて測定したところ、精度の高い検量線が得られました(図8)

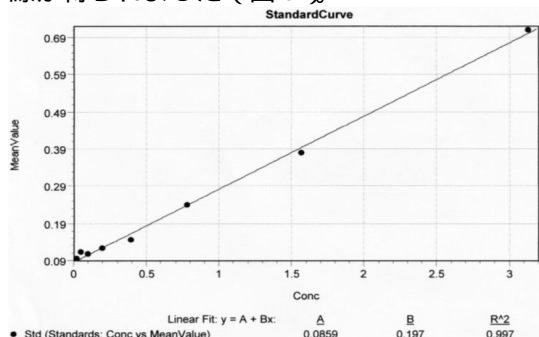


図 8

その後、反応時間や温度設定など各種の測定条件の適正化を進め、再現性等のチェックを実施しました。まず感度について0.18ng/ml と大幅な改善を認めました。また同時再現性 CV 値 3.3%~7.9%、測定間再現性 CV 値 7.2%~13.7%、Angiotensinogen など3タンパク質に対する交差性を認めず特異度の高い測定系であることが確認されました。引き続き臨床検体で測定し各種病態における意義を解析します。

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17件)

欧文誌

Onoe T, Yamada K, Mizushima I, Ito K,

Kawakami T, Daimon S, Muramoto H, Konoshita T, Yamagishi M, Kawano M, Hints to the diagnosis of uromodulin kidney disease. *Clin Kidney J* 9:69-75, 2016, doi: 10.1093/ckj/sfv110. (査読あり)

Mitoma J, Kitaoka M, Asakura H, Anyenda EO, Hori D, Nguyen TT, Hamagishi T, Hatashi K, Shimizu Y, Tsujiguchi H, Kambayashi Y, Hibino Y, Konoshita T, Sagara T, Shibata A, Nakamura H, Prevalence of chronic pain, especially headache, and relationship with health-related quality of life in middle-aged Japanese residents. *Health* 8: 116-124, 2016, doi: 10.4236/health.2016.81014. (査読あり)

Nguyen TT, Higashi T, Kambayashi Y, Anyenda EO, Michigami Y, Hara J, Fujimura M, Tsujiguchi H, Kitaoka M, Asakura H, Hori D, Hibino Y, Konoshita T, Nakamura H, A longitudinal study of association between heavy metals and itchy eyes, coughing in chronic cough patients: Related with non-immunoglobulin e mediated mechanism. *Int J Environ Res Public Health* 13(1). pii: E110, 2016, doi: 10.3390/ijerph13010110. (査読あり)

Makino Y, Konoshita T, Omori A, Maegawa N, Nakaya T, Ichikawa M, Yamamoto K, Wakahara S, Ishizuka T, Nakamura H; Genomic Disease Outcome Consortium (G-DOC) Study Investigators A genetic variant in the distal enhancer region of the human renin gene affects renin expression. *PLoS One* 10: e0137469, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0137469. (査読あり)

Wakahara S, Konoshita T, Sakai A, Nakaya T, Ichikawa M, Yamamoto K, Imagawa M, Kimura H, Okazawa H, Ishizuka T, Intrathoracic benign goiter imaged by <sup>18</sup>F-FDG-PET. *Medicine* 94: e1387, 2015, doi: 10.1097/MD.0000000000001387. (査読あり)

Konoshita T, Nakaya T, Sakai A, Yamada M, Ichikawa M, Sato S, Imagawa M, Fujii M, Yamamoto K, Makino Y, Arakawa K, Suzuki J, Ishizuka T, Nakamura H; Genomic Disease Outcome Consortium (G-DOC) Study Investigators, Determinants of plasma renin activity - Role of a human renin gene variant as a genetic factor. *Medicine* 93: e354, 2014, doi: 10.1097/MD.0000000000001387. (査読あり)

Arakawa K, Konoshita T, Makino Y, Ishizuka T, Blue toe in a male of cholesterol embolization syndrome. *Clin Med* 14: 688-689, 2014, doi: 10.7861/clinmedicine.14-6-688. (査読あり)

Ichikawa M, Konoshita T, Nakaya T,

Yamamoto K, Yamada M, Sato S, Imagawa M, Makino Y, Fujii M, Zenimaru Y, Arakawa K, Suzuki J, Ishizuka T, Nakamura H, Genetic variant of the renin-angiotensin system and prevalence of type 2 diabetes mellitus: a modest but significant effect of aldosterone synthase. *Acta Diabetol* 51: 595-599, 2014, doi: 10.1007/s00592-014-0561-7. (査読あり)

Hattori K, Konoshita T, Wakahara S, Miyamori I, Pedal edema in a female of RS3PE. *J Postgrad Med* 60: 211, 2014, doi: 10.4103/0022-3859.132369. (査読あり)

Mutoh H, Konoshita T, Onoe T, Makino Y, Arakawa K, Nakamura H; Genomic Disease Outcome Consortium (G-DOC) Study Investigators, Angiokeratoma in a man with Fabry disease. *Am J Med Sci* 346: 302, 2013, doi: 10.1097/MAJ.0b013e3182639555. (査読あり)

Konoshita T, Makino Y, Kimura T, Fujii M, Morikawa N, Wakahara S, Arakawa K, Inoki I, Nakamura H, Miyamori I and the Genomic Disease Outcome Consortium (G-DOC) Study Investigators, A crossover comparison of urinary albumin excretion as a new surrogate marker for cardiovascular disease among 4 types calcium channel blockers. *Int J Cardiol* 166: 448-452, 2013, doi:10.1016/j.ijcard.2011.10.133. (査読あり)

和文誌

此下忠志, 中屋隆裕, 市川麻衣, 山本勝司, 牧野耕和, 高血圧症と RAS バイオマーカー - 特にレニン遺伝子と血漿レニン活性について -, *Angiotensin Research* 12: 194-199, 2015 (査読なし)

市川麻衣, 此下忠志, レニン アンジオテンシン系遺伝子多型と 2 型糖尿病発症の関連解析, *Angiotensin Research* 12: 48-50, 2015 (査読なし)

此下忠志, 診療の極意「その一言!」「ご家族のためにも、健康で長生きしましょう」, 生活習慣病 News&Views 35: 14, 2014 (査読なし)

此下忠志, 心腎血管病の予測マーカー, アルブミン尿を低下させる Ca 拮抗薬は何か - 代表的 4 系統 Ca 拮抗薬の比較 - 循環 plus 13:7-9, 2013 (査読なし)

此下忠志, 山田実夏, 市川麻衣, 藤井美紀, 特集 エビデンスからみた降圧薬の長所と短所, カルシウム拮抗薬の長所と短所, 循環器内科 74:345-350, 2013 (査読なし)

此下忠志, 山田実夏, 市川麻衣, 藤井美紀, 特集「CKD と動脈硬化」, Part4 CKD における高血圧治療, 3 .CCB の適応と限界, 動脈硬化予防 12:50-57, 2013 (査読なし)

[学会発表](計 16 件)

国際学会

Konoshita T, Nakaya T, Sakai A, Yamada M, Ichikawa M, Yamamoto K, Sato S, Imagawa M, Makino Y, Fujii M, Zenimaru Y, Suzuki J, Ishizuka T, N/L type calcium channel blocker, cilnidipine, leads to less elevation of plasma aldosterone compared to l type calcium channel blocker, amlodipine besilate on the top of valsartan administration. 25th European Meeting on Hypertension, June 12-15, 2015, Milan

Ichikawa M, Konoshita T, Nakaya T, Sakai A, Yamada M, Yamamoto K, Sato S, Imagawa M, Makino Y, Fujii M, Zenimaru Y, Suzuki J, Ishizuka T, Genetic variant of the renin-angiotensin system and prevalence of type 2 diabetes mellitus. 25th European Meeting on Hypertension, June 12-15, 2015, Milan

Konoshita T, Nakaya T, Yamamoto K, Yamada M, Ichikawa M, Sato S, Imagawa M, Makino Y, Fujii M, Zenimaru Y, Arakawa K, Suzuki J, Ishizuka T, Nakamura H, Determinants of plasma renin activity - role of a human renin gene variant as a genetic factor. 24th European Meeting on Hypertension, June 13-16, 2014, Athens

Makino Y, Konoshita T, Fujii M, Zenimaru Y, Ishizuka T, Genetic variation in the renin-angiotensin-aldosterone system and renal survival in Japanese patients with diabetic nephropathy. 2014 Annual Scientific Meeting of American Society of Hypertension, May 16-20, 2014, New York

Konoshita T, Yamada M, Ichikawa M, Sato S, Imagawa M, Makino Y, Fujii M, Wakahara S, Zenimaru Y, Arakawa K, Suzuki J, Kato N, Measurement of soluble angiotensin-IV receptor (s-AT4), identified through systemic transcriptome analysis of hypertensive and diabetic renal tissue. 23rd European Meeting on Hypertension, June 14-17, 2013, Milan

国内学会

中屋隆裕, 帰山沙織, 浦邊真知, 坂井亜衣, 山田実夏, 市川麻衣, 佐藤さつき, 今川美智子, 山本勝司, 藤井美紀, 銭丸康夫, 鈴木仁弥, 牧野耕和, 石塚 全, 此下忠志, アンジオテンシン変換酵素遺伝子型と高血圧 - 2 型糖尿病コホートにおける関連解析, 第 38 回日本高血圧学会総会, 平成 27 年 10 月 9 日, 松山

市川麻衣, 浦邊真知, 帰山沙織, 中屋隆裕, 坂井亜衣, 山田実夏, 佐藤さつき, 今川美智子, 山本勝司, 牧野耕和, 藤井美紀, 銭丸康夫, 鈴木仁弥, 石塚 全, 此下忠志, メタボリックシンドロームにおけるレニン - アンジオテンシン系, 第 38 回日本高血圧学会総会, 平成 27 年 10 月 9 日, 松山

坂井亜衣, 山田実夏, 市川麻衣, 佐藤さつき, 今川美智子, 山本勝司, 藤井美紀, 銭丸康夫, 鈴木仁弥, 牧野耕和, 石塚 全, 加藤規弘, 此下忠志, Angiotensinase A (ENPEP) 遺伝子型と糖尿病性腎症の関連解析, 第 38 回日本高血圧学会総会, 平成 27 年 10 月 9 日, 松山

中屋隆裕, 坂井亜衣, 山本勝司, 山田実夏, 市川麻衣, 佐藤さつき, 今川美智子, 牧野耕和, 藤井美紀, 銭丸康夫, 鈴木仁弥, 石塚 全, ジャギデジャ ムードレイ, 此下忠志, アルドステロン合成酵素遺伝子多型と慢性腎臓病の相関解析, 第 37 回日本高血圧学会総会, 平成 26 年 10 月 17 日 (17-19), 横浜

坂井亜衣, 中屋隆裕, 山本勝司, 山田実夏, 市川麻衣, 今川美智子, 牧野耕和, 藤井美紀, 銭丸康夫, 鈴木仁弥, 石塚 全, ジャギデジャ ムードレイ, 加藤規弘, 此下忠志, ENPEP (angiotensinase A) 遺伝子多型と高血圧症の相関解析, 第 37 回日本高血圧学会総会, 平成 26 年 10 月 17 日, 横浜

山本勝司, 中屋隆裕, 坂井亜衣, 山田実夏, 市川麻衣, 佐藤さつき, 今川美智子, 牧野耕和, 藤井美紀, 銭丸康夫, 鈴木仁弥, 石塚 全, ジャギデジャ ムードレイ, 此下忠志, 高齢 2 型糖尿病における血圧と循環レニン-アンジオテンシン系の特性, 第 37 回日本高血圧学会総会, 平成 26 年 10 月 19 日, 横浜

市川麻衣, 中屋隆裕, 坂井亜衣, 山本勝司, 山田実夏, 佐藤さつき, 今川美智子, 牧野耕和, 藤井美紀, 銭丸康夫, 鈴木仁弥, 石塚 全, ジャギデジャ ムードレイ, 此下忠志, レニン-アンジオテンシン系遺伝子と 2 型糖尿病の関連解析, 第 37 回日本高血圧学会総会, 平成 26 年 10 月 19 日, 横浜

市川麻衣, 山本勝司, 中屋隆裕, 山田実夏, 佐藤さつき, 今川美智子, 牧野耕和, 藤井美紀, 銭丸康夫, 鈴木仁弥, 此下忠志, 石塚 全, プレム ガチラム, ジャギデジャ ムードレイ, レニン-アンジオテンシン系遺伝子多型と 2 型糖尿病発症の関連 - アルドステロン合成酵素遺伝子型の意義 -, 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 平成 26 年 5 月 24 日, 大阪

山本勝司, 中屋隆裕, 山田実夏, 市川麻衣, 佐藤さつき, 今川美智子, 牧野耕和, 藤井美紀, 銭丸康夫, 鈴木仁弥, 此下忠志, 高齢 2 型糖尿病症例の特徴, 特に循環レニン-アンジオテンシン系について, 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 平成 26 年 5 月 22 日, 大阪

此下忠志, 山田実夏, 市川麻衣, 木村朋子, 佐藤さつき, 今川美智子, 牧野耕和, 藤井美紀, 銭丸康夫, 若原成行, 稲葉聡, 鈴木仁弥, 網羅的発現遺伝子解析で抽出された糖尿病関連因子, Insulin regulated aminopeptidase (IRAP/AT4) 可溶性成分の測定, 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 平成 25 年 5 月 18 日, 熊本

此下忠志, 山田実夏, 市川麻衣, 木村朋

子, 佐藤さつき, 今川美智子, 牧野耕和, 藤井美紀, 銭丸康夫, 若原成行, 稲葉聡, 鈴木仁弥, 網羅的発現遺伝子解析で抽出された高血圧/糖尿病関連因子, アンジオテンシン IV 受容体可溶性成分 (sAT4) の測定, 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 平成 25 年 5 月 10 日, 東京

〔図書〕(計 1 件)

此下忠志, 多発性嚢胞腎診療ガイドライン, 日本腎臓学会編, 東京医学社, 東京, 2014 年 10 月 2 日 (査読委員)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

此下 忠志 (KONOSHITA TADASHI)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号: 40270954

### (2) 連携研究者

銭丸 康夫 (ZENIMARU YASUO)

福井大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号: 20397269

藤井 美紀 (FUJII MIKI)

福井大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号: 10401978

今川 美智子 (IMAGAWA MICHIKO)

福井大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号: 70464055

市川 麻衣 (ICHIKAWA MAI)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 30646659

山田 実夏 (YAMADA MIKA)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 90646655

### (3) 研究協力者

鈴木 仁弥 (SUZUKI JINYA)

医学部附属病院・講師

研究者番号: 20293417

山本勝司 (KATSUSHIYAMAMOTO)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 40753950

中屋隆裕 (NAKAYA TAKAHIRO)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 50750353

坂井亜衣 (SAKAI AI)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 40750352

牧野 耕和 (MAKINO YASUKAZU)

福井大学・医学部・大学院生

研究者番号: なし

佐藤さつき ( SATO SATSUKI )  
福井大学・医学部・大学院生  
研究者番号：なし