

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18784

研究課題名(和文)尿中exosome RNAsに着目した薬剤性腎障害診断マーカーの探索研究

研究課題名(英文)Diagnostic possibility of urinary exosomal RNAs for drug-induced kidney injury in rats

研究代表者

園田 紘子(Sonoda, Hiroko)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：60608272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は尿中に排泄されるexosomeに含まれるRNAに着目し腎障害マーカーを探索しようとするものである。尿中exosome RNAsの抽出方法についての検討を行ったところ段階遠心法と遠心カラムを組み合わせた方法が適することが示唆された。ネフローゼ症候群モデルラットにおいて腎機能が最も低下していた投与後5日目の尿中exosome RNAサンプルを用いてmiRNA PCRアレイを行った。その結果155種類のmiRNAが同定され、この結果をパスウェイ解析したところ炎症反応ネットワークが描出された。以上の結果から、ネフローゼ症候群において炎症に関連するmiRNAがマーカー候補となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined diagnostic possibility of urinary exosomal RNAs for drug-induced kidney injury. The combination method of differential centrifugation and spin column was relatively better to extract urinary exosomal RNAs than the commercial kit to extract exosomal RNA. The kidney function in drug-induced nephrotic syndrome model rats was the worst at 5 days after drug injection (day 5). The urinary exosomal RNAs samples on day 5 were extracted and miRNA PCR array was performed. The detected 155 miRNAs were analyzed by pathway analysis software, and inflammatory network was visualized. In conclusion, it is possible that urinary exosomal miRNAs related to inflammation are the candidates of diagnostic biomarker for nephrotic syndrome.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：尿中exosome RNAs バイオマーカー 薬剤性腎障害

1. 研究開始当初の背景

腎疾患は急性腎障害 (AKI) および慢性腎臓病 (CKD) に分類される。AKI は急激な糸球体濾過量 (GFR) の低下とそれに伴う窒素代謝物の蓄積を特徴とした症候群の総称であり、急性尿細管壊死などでみられる。AKI の罹患率は入院患者で多く、ICU 患者の 30% との報告があり、その死亡率は 40% と非常に高い。CKD は、タンパク尿などの腎障害を示す所見、もしくは腎機能低下が 3 ヶ月以上続く状態と定義されており、糸球体疾患などでみとめられる。日本における CKD 患者は 1000 万人以上ともいわれ、そのうち 30 万人以上が透析療法を受けている。このように腎疾患は国民の健康に重大な影響を与えている疾患である。獣医領域においても腎疾患は重要な疾患である。大動物分野では平成 23 年度の食肉検査によると、感染症以外の全廃棄の原因として尿毒症がブタで 4 位、ウシで 3 位となっており、腎疾患は畜産業において経済的損失の大きい疾患である。小動物分野では腎疾患はネコの死亡原因の 2 位、イヌの死亡原因の 3 位という調査報告がある。このように、獣医領域においても腎疾患は罹患率および死亡率を低下させるための研究が求められている。

腎疾患発見のきっかけは肉眼的症状や自覚症状である場合も少なくないが、健康診断の尿検査や血液検査で偶然発見されることが多い。腎疾患の診断は、GFR の間接的な指標である血中クレアチニン (Cr) 値の測定と糸球体障害の指標であるタンパク尿の検出などで行われる。しかしながら、血中 Cr 値は GFR が 50% 前後低下しないと異常値を示さない上に、尿細管細胞の壊死や間質の炎症・線維化などの腎実質の病態について直接反映していない。また、タンパク尿は高血圧などによっても検出されるだけでなく、タンパク尿発症初期では近位尿細管による代償的な再吸収の促進が起きるため検出されにくい。したがって、これらの検査による診断では、腎障害を早期かつ特異的に診断することは困難である。以上の理由から、早期かつ特異的に腎疾患を診断できるバイオマーカーが求められている。

尿は非侵襲的に得られるため、診断材料

として有用である。Pistkun らは尿中に exosome と呼ばれる小胞が存在することを明らかにした【Pistkun T et al, 2004】。尿中の exosome には、由来細胞特異的に発現しているタンパク質や、mRNA、miRNA (RNAs) が含まれることが知られている【Valadi H et al, 2007】。Exosome 排泄はエネルギー依存性の膜輸送機構によって行われるため、exosome に含まれる分子の排泄量の変化は、その由来細胞の状態を反映していることが考えられる。したがって、尿中 exosome タンパク質および RNAs は腎疾患バイオマーカーのソースとして注目されている。しかしながら、タンパク質の解析は ELISA 法やイムノブロット法など抗体に依存した手法が主であることから、臨床現場での迅速診断への応用については、今後タンパク質の迅速かつ簡便な解析方法の技術開発が必要である。RNAs は PCR 法によって定量できるため、タンパク質と比べると簡便に解析できる物質である。したがって、部位特異的に発現している mRNA や miRNA は、各部位における傷害を特異的に診断できるマーカーとなる可能性が考えられる。しかしながらこれまでに実験動物を用いて、腎疾患の病態進行をモニターしながら尿中 exosome RNAs 排泄量の変化を検討した報告はない。尿中 exosome RNAs の非侵襲的腎疾患バイオマーカーとしての有用性を明確にするには、この点を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

薬剤性腎障害は AKI の 5~20% を占めており、透析導入の一因となっている。腎毒性薬剤の中には特定の細胞を傷害するものがある。本研究は、薬剤性腎障害ラットモデルを用いて、尿中 exosome RNAs の非侵襲的腎疾患バイオマーカーとしての有用性を検討するものである。期間中には以下の実験を行った。

(1) 尿中 exosome からの RNAs の効率的な抽出方法の検討

(2) 腎ネフロン各部位の傷害ラットモデルでの尿中 exosome RNAs 排泄量の変化についての検討

当初の予定では (2) の実験について、ネ

フロン各部位について特異的に障害を引き起こす4種類の薬剤性腎障害モデルを用い、その後(3)各モデルにおける尿中 exosome RNAs の排泄量の変化メカニズムに関する検討を行う予定であったが、本研究を行っていく中で Puromycin aminonucleoside (PAN) 性ネフローゼ症候群モデル(系球体足細胞傷害モデル)を用いた研究において興味深い結果がえられたため、このモデルに焦点を絞って研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 尿中 exosome からの RNAs の効率的な抽出方法の検討

尿中 exosome は段階的遠心法にて最終的に 200,000 x g の超遠心によって分離することができる。申請者は予備的検討で、この方法でラットの尿中 exosome を分離し、RNA 抽出カラムを用いて total RNA を抽出することに成功した(627 ± 279 ng/Cr 1 mg 含有尿)。しかしながら、段階的遠心法では exosome を高純度で得ることはできないが、一般の臨床現場では適応しがたい。そこで、沈殿法による exosome RNAs 抽出キットを用いて、簡便な方法で十分な exosome RNA の抽出が可能かどうかについて従来法との比較検討を行った。抽出した RNAs の質については、バイオアナライザーを用いて解析を行った。バイオアナライザーは、ガラスチップ上に試料の注入、染色、分離、検出等の分析工程を組み込んだ分析装置で、ピコレベルの試料でも RNAs の質および量を解析することができる。

(2) 薬剤性腎障害ラットモデルでの尿中 exosome RNAs 排泄量の変化についての検討

PAN 性ネフローゼ症候群モデル(系球体足細胞傷害モデル)を用いた検討は以下の要領で行った。

性成熟した10週齢の雄性SDラットを用い、PANを125 mg/kgになるように腹腔内投与することでモデルを作製した。PANは系球体足細胞を特異的に傷害し、PANを投与されたラットはアルブミン尿、低アルブ

ミン血症および浮腫を特徴としたネフローゼ症候群を発症することが知られている。腎機能は血中Cr値によって評価した。また、尿中アルブミンを測定することで、ネフローゼ症候群の進行をモニターした。また、経時的に任意の時点で6時間の蓄尿を行った。尿サンプルからは、(1)で検討した方法で尿中 exosome RNAs を抽出した。そして腎障害によって排泄量が増加する尿中 exosome RNAs のスクリーニングを、miRNA PCR アレイ(QIAGEN社)を用いて行った。RNAの網羅的解析には一般的にマイクロアレイが用いられるが、PCRアレイはリアルタイムPCRで増幅することができるため、微量のRNA量であっても解析することができる。また、exosome中のRNA含有量は微量である可能性が考えられたため、アレイの前に前増幅工程を加えた。アレイで得られた結果についてはIngenuity pathway analysis(トミーデジタルバイオロジー社)を用いてパスウェイ解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 尿中 exosome からの RNAs の効率的な抽出方法の検討

尿中 exosome RNAs の抽出方法についての検討を行った。ラットをメタボリックケージに入れ、6時間の蓄尿を行った(n=12)。各尿量は尿中Cr量で補正した。尿中 exosome RNAs の抽出方法は、以下の二種類の方法を比較した。(A)段階遠心法(1,000 x g-17,000 x g-200,000 x g)によって exosome をペレットとして分離し、QIAGEN社のmiRNeasy kitの遠心カラムで抽出する方法。(B)Norgen社のUrine exosome RNA isolation kitを用い、尿中に exosome を吸着するビーズを加え攪拌し、それらのビーズから遠心カラムによって RNAs を溶出する方法。各サンプルのRNA濃度を吸光度計によって測定したところ、総RNA収量は平均値 ± 標準誤差で、A法では530.9 ± 122.2 ng/ul、B法では410.0 ± 82.1 ng/ulとなり、A法の方が多い傾向にあった。また、バイオアナライザーによってRNAの質を観察したところ、A法では18Sおよび28SのリボソームRNAのピークはほとんど見られ

なかったのに対し、B 法でははっきりとリボソーム RNA のコンタミネーションがみられるサンプルがあった。これは B 法では、尿沈渣を除く工程以外で、exosome よりも大きい夾雑物を除く行程がないのに対し、A 法では段階遠心法によって純度の高い exosome 分離が行われていることによると考えられる。また、本研究室ではウシの尿を用いて B 法によって exosome タンパク質抽出を試みたところ、従来法の段階遠心法によって抽出した等量の尿由来の exosome タンパク質よりも総タンパク質量が多い傾向にあったものの exosome マーカーである TSG101 タンパク質量が少なくなることを見出している。このことから B 法において exosome 以外の夾雑物もコンタミネーションしていることが示唆される。以上の検討から、A 法の方が高純度かつ収量の高い尿中 exosome RNAs の抽出に適していることが示唆された。

次に A 法により分離した exosome RNA サンプルを用いてオリゴ dT プライマーおよびランダムプライマーを用いた逆転写を行い、cDNA を作成した。その後近位尿細管とヘンレの細い下行脚に特異的に発現している AQP1 と集合管主細胞に特異的に発現している AQP2 について尿中 exosome 中に mRNA が存在しているかどうかについて全長あるいは部分配列の PCR を行った。その結果、AQP1 および AQP2 の部分配列は増幅されたものの全長 mRNA は増幅されなかった。これについては exosome に含まれる AQP1 および 2 の mRNA が断片的あるいは非常に微量にしか含まれないことが原因であると考えられる。申請者は微量な mRNA に関してはタッチダウン PCR 法によって増幅できることを経験しているため、今後タッチダウン PCR 法によって増幅を試みる予定である。

(2) 薬剤性腎障害ラットモデルでの尿中 exosome RNAs 排泄量の変化についての検討

PAN 性ネフローゼ症候群モデル(糸球体足細胞傷害モデル)は SD ラットに PAN を腹腔内投与することで作製した。PAN 投与後 2、5、8 日後に採血・採尿をおこなった。腎機能の指標である血漿 Cr 値は、PAN 群では PAN 投与により上昇し、投与後 5 日でピークとなった。腎機能低下に伴い、PAN 群では投与後 5 日

有意な乏尿を示した。一方、尿タンパク質排泄量は投与後 5 日から 8 日へと持続的に増加し続けた。腎機能が最も低下していた投与後 5 日目の尿サンプルを用いて、(1) で検討した方法で exosome RNA を抽出した。ラット miRNA の cDNA 作製キットを用いて逆転写を行い、前増幅工程を行ったのち、ラット miRNA PCR アレイを実施した。その結果、同定された全ての miRNA は 155 種類であった。PAN 群のみで同定された miRNA は 29 種類(rno-miR-672-5p、rno-15b-5p、rno-134-5p など)であった。両群で共通に同定された miRNA は 64 種類でそのうち、コントロール群と比較して PAN 群で 2 倍以上に増加していたものは 37 種類(rno-miR-29c-5p、rno-miR-375-3p、rno-miR381-3p、rno-miR-702-5p など)で、0.5 倍以下に減少していたものは 8 種類(rno-miR-18a-3p、rno-miR-30e-3p、rno-25-3p など)であった。また、コントロール群でのみ検出された、つまり PAN 群で検出限界以下まで減少していたと考えられる miRNA は 62 種類(rno-let-7d-3p、rno-miR-106b-3p など)であった。これらの結果を用いてパスウェイ解析を行った。すると、上記の分子を最も多く含むパスウェイとして炎症性疾患・炎症反応ネットワークが形成された。以上の結果から、尿中 exosome RNAs 中の炎症に関連する miRNA がネフローゼ症候群においてバイオマーカー候補となる可能性が示された。

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)

[学会発表](計 2 件)

園田 紘子、腎疾患とエクソソーム、心血管代謝週間 CVMW2017、2017

Yuya Hoshino, Hiroko Sonoda, Kenichi Ishibashi, Masahiro Ikeda, Involvement of NADPH Oxidase 2 in the kidney injury of aquaporin-11 KO mouse, Kidney Week 2015, 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

園田 紘子 (SONODA, Hiroko)

宮崎大学・農学部・獣医学科・助教

研究者番号：60608272