

令和元年5月15日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19413

研究課題名(和文) ビッグアンジオテンシン-25の測定意義と組織アンジオテンシンII生成機構の解明

研究課題名(英文) Measurement significance of Big angiotensin-25 and elucidation of tissue angiotensin II production mechanism

研究代表者

永田 さやか (NAGATA, SAYAKA)

宮崎大学・医学部・研究員

研究者番号：00452920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ビッグアンジオテンシン-25 (Bang-25) は新しいレニン・アンジオテンシン系 (RA系) のペプチドである。RA系は、循環器疾患や腎臓疾患の発症や進展に重要な役割を果たしていることから Bang-25の研究は、これらの疾患の診断や治療に重要であると考えられる。本研究では様々な疾患の尿中Bang-25を測定し、尿中Bang-25が尿タンパクとは相関しないにもかかわらず推定糸球体濾過量 (eGFR) と負の相関が見られる事を明らかにした。また腎臓疾患の指標である尿中アルブミンとは異なる病勢を反映しており、糖尿病患者においても健常人と比較して尿中Bang-25濃度は有意に高値であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RA系は、循環器疾患や腎臓疾患の発症や進展に重要な役割を果たしており、RA系阻害薬は循環器疾患や腎臓疾患と予防薬や治療薬としてすでに使用されている。しかしながら現存するRA系阻害薬では臓器障害におけるRA系の抑制が不十分であり、また組織RA系の評価法は確立されていない。本研究において尿中Bang-25が腎臓障害と組織RA系の亢進のいずれも評価できる新しい診断法になりうる可能性があると考えられた。また、これまでのRA系とは異なる生成・変換機構への関与が示唆されたため、新しい心血管系の臓器障害の新しい診断・治療への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Big Angiotensin-25 (Bang-25) is a novel renin angiotensin system (RAS) related peptide. Since the RAS plays an important role in the development and progression of cardiovascular diseases and kidney diseases, it is considered that the study of Bang-25 is important for the diagnosis and treatment of these diseases. In this study, urinary Bang-25 in various diseases was measured, and it was revealed that negative correlation was observed with estimated glomerular filtration rate (eGFR) even though urinary Bang-25 was not correlated with urinary protein. It is also suggested that it may reflect a different disease than urinary albumin, which is an indicator of kidney disease. Urinary Bang-25 concentration was also significantly higher in diabetes mellitus patients compared with healthy volunteers.

研究分野：循環器内科

キーワード：ビッグアンジオテンシン-25 アンジオテンシンII 循環器疾患 腎臓疾患 レニン・アンジオテンシン系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) レニン・アンジオテンシン系 (RA 系) 阻害薬とレニン非依存性のアンジオテンシン II (Ang II) 生成経路

RA 系は循環器疾患および腎臓疾患の発症と進展においてその重要性が指摘されており、ゆえに RA 系の研究はこれまで活発に行われてきた。また大規模臨床試験により、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) といった RA 系阻害薬の循環器疾患や腎臓疾患の予防薬や治療薬としての有用性が実証されてきた。しかし現存する RA 系阻害薬のみでは臓器障害における RA 系の抑制が不十分であるという報告があり、より上流で RA 系を阻害するレニン阻害薬が開発され、その効果が期待された。そこで腎機能障害を伴った 2 型糖尿病患者を対象にレニン阻害薬と ACE 阻害薬あるいは ARB 治療を受けたランダム化・二重盲検・プラセボ対照国際共同試験である ALTITUDE 試験 (The Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardio-Renal Endpoints) が実施された。しかし、ACE 阻害薬や ARB にレニン阻害薬を追加した群で高カリウム血症、蘇生が必要な心停止、低血圧の発現率が有意に高く、腎合併症の発現には有意差がないという結果に終わり、試験は中止となった。つまり現段階で ACE 阻害薬や ARB を超える RA 系阻害薬は存在しないと考えられる。

また一方で脳内レニンの発見により、組織中には独自の RA 系 (組織 RA 系) が存在することが指摘されている。組織 RA 系に関しては以下のような報告がなされている。脳、心臓、腎臓、血管などの組織中には RA 系のすべての要素が存在しており、組織特異的に発現調節されている。

生成された Ang II は、血中 RA 系とは独立して作用している。血漿レニン活性が抑制されている病態においても RA 系阻害薬が有効である。これらより、組織中にはレニン非依存性の Ang II 生成経路が血中 RA 系とは独立して存在しており、高血圧や臓器障害に重要な役割を果たしていると考えられるが、その生成機構や役割に関しては未だに不明な点が多い。

(2) ピッグアンジオテンシン-25 (Bang-25) の発見

2013 年に研究代表者らはヒト尿中の主要なアンジオテンシン関連ペプチドを発見、構造解析に成功し、Bang-25 と命名した。Bang-25 は N 末にアンジオテンシン構造を有し、25 個のアミノ酸からなるペプチドで、14 番目の Asn が糖鎖修飾を受けている特色あるペプチドである。合成 Bang-25 はキマーゼにより速やかに Ang II を生産する一方で、合成 Bang-25 からのレニンによる Ang I 産生は著明に低値であった。また、Bang-25 の C 末認識抗体を利用して免疫染色による Bang-25 の組織分布を検討したところ、心臓や副腎髄質、腎臓のポドサイトをはじめ生体内に幅広く分布していることが明らかになった。以上の結果、Bang-25 はヒト RA 系の新たな構成要素と考えられ、レニンに依存しない組織 Ang II 生成経路に関与している可能性が高いと考えられた。さらに研究代表者らは最近、Bang-25 に特異的な測定系を確立した。現段階では組織 RA 系の評価法は確立されておらず、尿中 Bang-25 が腎障害と組織 RA 系の亢進のいずれも評価できる新しい診断法になりうる可能性があると考えられる。

以上より循環器・腎臓疾患における尿中 Bang-25 の測定意義を明確にし、Bang-25 を含む RA 系関連ペプチドの組織内での作用機序と病態生理学的役割を明らかにすることで、心血管系の臓器障害の新しい診断・治療への応用が期待できる。

2. 研究の目的

Bang-25 は 2013 年に研究代表者らが発見したヒト尿中に存在する新しい RA 系のペプチドである。Bang-25 は組織 Ang II 生成機構に関与していると考えられ、ゆえに循環器疾患や腎臓疾患の臓器障害に関与している可能性が高いと考えられる。また現段階では組織 RA 系を評価する方法はないが、尿中 Bang-25 が臓器障害と組織 RA 系の亢進をいずれも評価できる可能性があると考えられる。そこで本研究の目的は(1)尿中 Bang-25 の臨床的な測定意義の解明および(2) Bang-25 の組織内分布と病態生理学的意義を解明し、さらに(3) Bang-25 の生成・変換機構を明らかにすることで将来的な循環器・腎臓疾患の臓器障害における診断薬や治療薬開発へと臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

はじめに研究目的(1)(2)の研究を開始し、次に研究目的(3)の研究を行い本研究の達成を目指す。すなわち、独自に開発した Bang-25 の特異的な測定系を用いて循環器・腎臓疾患をはじめとする様々な疾患患者の尿中、血中の Bang-25 を含めた関連ペプチド濃度を測定して健常人と比較し、尿中 Bang-25 の測定意義と関連疾患を明確にする。また腎生検や剖検、手術時に得られたヒト組織もしくは疾患モデル動物の組織を Bang-25 の特異的な抗体を用いて免疫組織染色を行い Bang-25 の局在を明らかにする。さらに疾患モデル動物やヒトの培養細胞、血液を用いて複数のプロテアーゼ阻害剤や RA 系阻害剤の Bang-25 や RA 系関連ペプチドにおける生成・変換活性に及ぼす影響を観察し、Bang-25 の生成・変換酵素に特異的なプロテアーゼ阻害剤を検索する。

4. 研究成果

(1) 確立した Bang-25 の測定系 (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay (Alpha) LISA 法) を用いて腎臓疾患、糖尿病、ICU の患者、腎生検の腎臓組織や心疾患、オペ前後の尿・血液を含めた尿検体の Bang-25 を比較した。その結果、尿中 Bang-25 は尿タンパクとは相関し

ていない事が明らかとなった。一方で腎障害を反映する推定糸球体濾過量 (eGFR) とは負の相関が見られた。つまり尿中 Bang-25 は、現存する腎障害のバイオマーカーとは異なる病勢を反映している可能性が示唆された。特にポドサイト障害の進行した患者において尿中 Bang-25 濃度は高かった。また腎疾患の指標である尿中アルブミンとの関連も検討したところ、尿中 Bang-25 との相関が非常に低かったことから尿中アルブミンとは異なる病勢を反映している可能性が示唆された。

加えて健康診断の検体においても尿中 Bang-25 は尿タンパクとは相関しないにもかかわらず eGFR と負の相関が見られる事から将来的な腎障害の予測マーカーにもなりうる可能性もある。更に糖尿病患者においても健常人と比較して尿中 Bang-25 濃度は有意に高値であった。以上の結果より尿中 Bang-25 は糖尿病性腎症のバイオマーカーになりうる可能性があると考えられた。また、ヒト尿中のアンジオテンシン関連ペプチドの濃度を比較したところ尿中には Bang-25 が非常に多く存在しているのに対して Ang I や Ang II の濃度は低い事が判明した。つまり尿中 Bang-25 の測定は RA 系を評価するバイオマーカーとして利用しやすいと考えられた。

(2) ヒトの胎盤の組織抽出液を Bang-25 の Alpha LISA 法で測定した結果、胎盤組織中に Bang-25 に相当する分子が存在する事が確認できた。そこで胎盤の組織抽出液から Bang-25 に相当する分画を単離・精製した。また胎盤組織中には Ang II も同じように高濃度存在していた。一方で Ang I は極端に少ない事が明らかとなった。そのため、組織中にはレニンに依存しない Ang II 生成機構が存在している事が明らかとなった。胎盤組織を Bang-25 に特異的な抗体で免疫染色を行った結果、絨毛外栄養膜に局在が見られた。また、血中の Bang-25 は測定感度以下であったため、Bang-25 は組織 RA 系を反映しており、臓器障害の程度も反映しうると考えられた。

(3) ヒト腎臓の正常細胞において RA 系の及ぼす影響を観察した。その結果、RA 系の出発点であるアンジオテンシノーゲン (Aogen) の遺伝子発現は 24 時間後に増加するが Bang-25 存在下でも Aogen の遺伝子発現は同じように増加していた。そのため Bang-25 の増加は元々、存在している RA 系に影響を及ぼさないかもしれないと考えられた。さらにレニン阻害薬であるペプスタチンをヒト腎臓の正常細胞に加えたが、RA 系因子の遺伝子発現に大きな変化は見られなかった。一方でヒト血漿由来の Aogen の 14 番目糖鎖解析の結果、Aogen の 14 番目の糖鎖は少なくとも 3 種類、存在する事が明らかとなった。Aogen の 3 種類の糖鎖のうちの一つは Bang-25 と同じ事から、Bang-25 の糖鎖は Aogen 由来であると考えられた。また Bang-25 はレニンによる Ang I 生成に抵抗性を示すが Aogen は 14 番目の糖鎖がないとレニンによって Ang I を生成する事ができないという報告がある事から、14 番目の糖鎖の種類によって Aogen から Bang-25 もしくは Ang I など生成されるアンジオテンシン関連ペプチドの種類が変化しうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

1. Nagata S, Yamasaki M, Kawano A, Kitamura K: Developments of human adrenomedullin-IgG1 Fc fusion proteins. J Biochem, 78(3-4), 129-134 (2019) 査読あり DOI:10.1093/jb/mvz023.
2. Ansary TM, Urushihara M, Fujisawa Y, Nagata S, Urata H, Nakano D, Hirofumi H, Kitamura K, Kagami S, Nishiyama A: Effects of the selective chymase inhibitor TEI-F00806 on the intrarenal renin-angiotensin system in salt-treated angiotensin I-infused hypertensive mice. Experimental physiology, 103, 1524-1531 (2018) 査読あり DOI:10.1113/EP087209.
3. Nagata S, Yamasaki M, Kitamura K: Anti-Inflammatory Effects of PEGylated Human Adrenomedullin in a Mouse DSS-Induced Colitis Model. Drug Dev Res, 78(3-4), 129-134 (2017) 査読あり DOI: 10.1002/ddr.21383.
4. 永田さやか, 北村和雄: 新規アンジオテンシンペプチドとは: ビッグアンジオテンシン-25 と組織レニン・アンジオテンシン系. 循環器内科, 84(4), 1-8 (2018) 査読なし

[学会発表](計 24 件)

1. 永田さやか, 山崎基生, 北村和雄: 4 血管閉塞モデルラットを用いた持続性アドレノメデュリン誘導体の効果. 第 41 回日本高血圧学会総会 (2018 年)
2. 北村和雄, 永田さやか: アンジオテンシン関連ペプチドの新展開. 第 41 回日本高血圧学会総会 (2018 年)
3. 西山成, 漆原真樹, 浦田秀則, 永田さやか, 中野大介, 香美祥二, アンサリーチュバ: 高塩食とアンジオテンシン I 投与で生じる高血圧進展に対する選択的キマーゼ阻害薬の効果. 第 41 回日本高血圧学会総会 (2018 年)
4. 永田さやか: ペプチド探索から臨床応用へ. 第 9 回ペプチド・ホルモン研究会 (2018 年)
5. 永田さやか, 山崎基生, 北村和雄: 学習・記憶障害に対する持続性アドレノメデュリン誘導体の効果. Vascular Biology Innovation に関する研究助成 第 13 回研究発表会 (2018 年)
6. 永田さやか, 北村和雄: 尿中ビッグアンジオテンシン-25 の測定系の確立. 第 39 回日本循

環制御医学会総会（2018年）

7. 永田さやか：新しいアンジオテンシンペプチドの臨床応用に向けて．第22回日本心血管内分泌代謝学会学術総会（2018年）（受賞講演）
8. 永田さやか、山崎基生、北村和雄：学習・記憶障害に対する持続性アドレノメデュリン誘導体の効果．第91回日本内分泌学会学術総会（2018年）
9. Nagata S, Kitamura K, : Big angiotensin-25 (Bang-25): a novel glycosylated angiotensin-related peptide isolated from human urine. 第95回日本生理学会大会（2018年）
10. 永田さやか、山崎基生、北村和雄：持続性アドレノメデュリン誘導体の創製．第8回ペプチド・ホルモン研究会（2017年）
11. 永田さやか、山崎基生、北村和雄：持続性アドレノメデュリン誘導体の創製．第21回日本心血管内分泌代謝学会学術総会（2017年）
12. 永田さやか、山崎基生、北村和雄：高血圧発症を抑制する持続性アドレノメデュリン誘導体の創製．第40回日本高血圧学会総会（2017年）
13. Nagata S, Yamasaki M, Kitamura K, : Persistent adrenomedullin derivative inhibits development of hypertension. AHA Council on Hypertension 2017（2017年）
14. 永田さやか、山崎基生、北村和雄：持続性アドレノメデュリン誘導体の創製．Vascular Biology Innovation に関する研究助成 第12回研究発表会（2017年）
15. 山崎基生、永田さやか、北村和雄：炎症性腸疾患モデルにおけるアドレノメデュリン投与の効果．平成29年度日本生化学会九州支部例会（2017年）
16. 永田さやか、福田顕弘、佐藤祐二、長友優尚、油屋順子、藤元昭一、北村和雄：尿中ビッグ
17. グアンジオテンシン-25 測定法の開発．第20回日本心血管内分泌代謝学会学術総会（2016年）
18. 永田さやか、北村和雄：組織アンジオテンシン II 生成における新規ペプチドの単離．日本動物学会 第87回 沖縄大会2016（2016年）
19. 永田さやか、福田顕弘、佐藤祐二、長友優尚、油屋順子、藤元昭一、北村和雄：糖尿病患者における尿中ビッグアンジオテンシン-25．第39回日本高血圧学会総会（2016年）
20. Nagata S, Mariko Tokashiki, Kazuo Kitamura : Structural analysis of glycosyl chain at 14th amino acid of angiotensinogen in human plasma. The 26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension（2016年）
21. Nagata S, Kazuo Kitamura : Big angiotensin-25 (Bang-25): a novel glycosylated angiotensin-related peptide isolated from human urine. ISH2016 satellite symposium, Renin-angiotensin-aldosterone system（2016年）（招待講演）
22. 永田さやか、北村和雄：アドレノメデュリンの医薬品としての研究開発．第7回ペプチド・ホルモン研究会（2016年）
23. 永田さやか、北村和雄：尿中ビッグアンジオテンシン-25 の測定意義の解明．Vascular Biology Innovation に関する研究助成 第11回研究発表会（2016年）
24. 永田さやか、北村和雄：ビッグアンジオテンシン-25：ヒト尿中の主要なアンジオテンシン関連ペプチド．第34回内分泌代謝学サマーセミナー（2016年）
25. 永田さやか、北村和雄：アンジオテンシノーゲンの糖鎖構造解析．第89回日本内分泌学会学術総会（2016年）

6. 研究組織

(1)研究協力者:

研究協力者氏名：北村 和雄

ローマ字氏名：(KITAMURA, kazoo)

研究協力者氏名：福田 顕弘

ローマ字氏名：(FUKUDA, akihiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。