

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05996

研究課題名(和文)腎障害での細胞浸潤に対するエクソソームを用いたリキッドバイオプシー法の開発研究

研究課題名(英文)The search of biomarker for the liquid-biopsy to diagnose the cellular infiltration in the kidney injury

研究代表者

園田 紘子 (Sonoda, Hiroko)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：60608272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の課題は、「腎障害で浸潤してくる炎症細胞について尿を用いたリキッドバイオプシーで検出できるかどうか」である。アロジェニック腎移植ラット(Tp)を用いたところ、腎にCD8をマーカーとする細胞傷害性T細胞を主体とした細胞浸潤がみられた。CD8は対照群の尿中細胞外小胞(uEV)では検出されなかったが、Tp群では検出された。uEVマーカーであるTSG101はTp群の浸潤細胞で発現が認められ、uEV中のTSG101と細胞浸潤領域との間に正の相関関係が見られた。以上の結果からuEV中のCD8とTSG101の両方が、腎における細胞傷害性T細胞による細胞浸潤のバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AKIの罹患率は入院患者で多く、その死亡率は40%と非常に高い。また、日本におけるCKD患者は1000万人以上といわれており、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感染症を除いて、尿毒症はウシでのと畜禁止の原因の上位であり、小動物分野では腎疾患はイヌ・ネコの死亡原因の3位以内にランクインする。このように、医学領域と獣医領域の両方で、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。本研究は様々な腎臓病において共通してみられる細胞浸潤に着目し、リキッドバイオプシーという、非侵襲的なバイオマーカーを用いた診断方法の新規開発に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is the search of biomarker for the liquid-biopsy to diagnose the cellular infiltration in the kidney injury. I examined whether immune cell marker proteins such as CD8, a marker of cytotoxic T cell, were released into the urinary extracellular vesicles (uEV) in the allogenic renal transplant model rat (Tp group) or not. As a result, CD8 in uEV could be detected in Tp group but not in control group. In addition, TSG101, a uEV marker, was increased in uEV of Tp group. TSG101 was expressed in the infiltration cells and TSG101 level in uEV was correlated with the cellular infiltration area in the kidney. In summary, the combination of CD8 and TSG101 in uEV may be potential non-invasive biomarkers for the liquid-biopsy to diagnose the cellular infiltration with cytotoxic T cells in the kidney.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：リキッドバイオプシー 細胞外小胞 エクソソーム 細胞浸潤 腎障害

1. 研究開始当初の背景

尿中にエクソソームとよばれるナノサイズの細胞外小胞、エクソソームが存在することが、**2004**年に明らかになった【1】。エクソソームは細胞内の小胞輸送経路を通して細胞外に放出され、エクソソームには由来細胞に特異的なタンパク質、**mRNA** や **miRNA** といった核酸が含まれる。また、エクソソームは由来細胞(組織)が明確であること、体液中の大量物質が含まれ難いこと、エクソソームに含まれる分子は安定であること、エクソソーム生成は細胞活動を反映することなどの特徴から、エクソソームは有用なバイオマーカーソースとして注目されている。エクソソームは免疫分野でも注目されており、活性化した抗原提示細胞から放出されたエクソソーム中の抗原ペプチドや **MHC** 複合体が **T** 細胞の受容体に結合し **T** 細胞を活性化すること、エクソソーム中のホスファチジルセリンによってマクロファージのエクソソーム取り込みが促進されることなど、炎症細胞間におけるコミュニケーションツールとしてのエクソソームの意義が解明され始めている【2】。

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。**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られる。**AKI** と **CKD** では原疾患や時間経過が異なっているが、しばしば共通して腎間質への炎症細胞の浸潤と線維化がみられる。腎の線維化が重篤化すると腎が萎縮し、腎機能が著しく低下して終末期腎不全に陥る。細胞外マトリックスを産生する線維芽細胞の活性化には傷害を受けた上皮細胞や、浸潤してきた炎症細胞からの細胞外情報伝達物質が関与すると考えられている。腎線維化の程度が腎障害の予後と相関することが報告されており、線維化を誘導する炎症細胞浸潤を診断する方法の開発は、腎障害の予後を勘案した治療を行う上で重要な課題である。

一般的な腎障害のマーカーは血中クレアチニン濃度や尿中タンパク質である。しかし、血中クレアチニン濃度は **GFR** の指標で、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理を反映しない。そしてタンパク尿は高血圧など腎疾患以外の疾患でも検出されるために特異性に欠け、代償的な再吸収により腎障害初期には検出されにくい。また、特に **CKD** では原疾患の確定診断で用いられる侵襲的なバイオプシーは、腎出血や血尿、感染症などの合併症のリスクがあり、入院や運動制限といった患者への負担が大きい検査である。そこで近年、バイオプシーに替わる、体液中のバイオマーカーによる低侵襲性のリキッドバイオプシーと呼ばれる新しい手法が注目され始めている。

申請者は、これまでに原因は異なるが細胞浸潤が著明な複数の腎疾患モデルラットにおいて、尿エクソソーム中の **TSG101** タンパク質(エクソソームマーカー)が共通して増加することを見出した。**TSG101** タンパク質はエクソソームの生成に関与するタンパク質である。このことは、腎に細胞浸潤が起こると尿中のエクソソーム量が増加することを示唆している。また組織解析の結果、細胞浸潤が起こると炎症細胞が基底膜を破り尿細管内へ遊走していく像が多く認められた。このことから、このエクソソームの増加は炎症細胞からのエクソソーム放出を反映している可能性が考えられる。以上の研究背景から、炎症細胞浸潤がみられる腎から放出された尿エクソソーム中には、炎症細胞由来のマーカータンパク質が存在する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では腎障害後に浸潤する炎症細胞の種類および浸潤の程度をリキッドバイオプシーで診断することが可能かどうかについて、尿エクソソームに着目して検証することを目的とする。具体的には尿エクソソームを材料として腎障害後の浸潤細胞の種類と浸潤の程度をモニターできるマーカータンパク質を探索する。

3. 研究の方法

(1) アロジェニック腎移植ラットを用いた検討

細胞浸潤が著明な動物モデルとして、アロジェニック腎移植モデルラットを用いた。ドナーには **Wistar** ラット、レシピエントには **SD** ラットを用いた。**SD** ラットは両腎を摘出し、**Wistar** ラットの右腎を移植した(**Tp** 群、**n = 4**)。対照として左腎を摘出した **SD** ラットを用いた(**control** 群、**n = 4**)。術後 **5** 日に **6** 時間の蓄尿と採血、腎摘出を行った。尿からは段階遠心法により、最終的に **200,000 x g** の超遠心によりエクソソーム分画を抽出した。腎組織は **RNA** およびタンパク質抽出と、病理学的解析および免疫組織化学解析のためにホルマリン固定を行った。**RNA** は **RT-PCR** 法により、腎におけるエクソソームマーカーである **Alix** および **TSG101** の **mRNA** 発

現量を解析した。エクソソームおよび腎のタンパク質サンプルはイムノブロットによって炎症細胞マーカータンパク質あるいは **Alix** および **TSG101** タンパク質発現量の解析を行った。免疫組織化学解析では、各炎症細胞マーカータンパク質と **TSG101** タンパク質について検出を行った。

(2) その他の腎障害動物モデルを用いた検討

腎移植モデル以外の間質に細胞浸潤がみられる腎障害動物モデルとして、腎虚血再灌流傷害モデルラット (**IR** ラット) と、遺伝性ネフロン癆モデルマウスである **pcy** マウス (**Nphp3** 遺伝子欠損) を用いて検討を行った。

IR ラットは、両腎門部を **35** 分間虚血にし、その後血液を再灌流させて作製した。対照ラットには偽手術を処置した (**sham** ラット)。術後 **36** 時間の時点で腎を摘出し、ホルマリン固定を行った。進行性に多発性嚢胞を形成する **pcy** マウスからは、嚢胞が顕著にみられる **21** 週齢に腎を摘出し、ホルマリン固定を行った。対照マウスには遺伝的コントロールマウスである **DBA** マウスを用いた。それぞれの腎組織について、炎症細胞マーカーである、**CD4**、**CD8** および **Iba1** の免疫組織化学解析を行った。

4. 研究成果

(1) アロジェニック腎移植ラットを用いた検討

腎移植後 **5** 日の血液検査では対照群と比較して **Tp** 群で血漿クレアチニン値が上昇しており、腎機能の低下が認められた (**control** 群: 0.6 ± 0.1 mg/dl、**Tp** 群: 1.8 ± 0.3 mg/dl)。また、移植 **5** 日後の右腎重量は腎移植群で対照群のものよりも増加していた (**control** 群: 1.4 ± 0.1 g、**Tp** 群: 3.5 ± 0.2 g)。病理学的手法によって腎皮質における細胞浸潤領域を測定したところ、特に動脈周囲の尿細管間質において **Tp** 群で著しい細胞浸潤が認められた。間質に浸潤した細胞を特定するために、ヘルパー **T** 細胞マーカーである **CD4**、細胞傷害性 **T** 細胞マーカーである **CD8**、マクロファージマーカーである **Iba1** について免疫組織化学解析を行った。その結果、ほとんどの浸潤細胞が細胞傷害性 **T** 細胞マーカーである **CD8** 陽性となった (図 1)。

Iba1 は浸潤細胞において陽性が認められたが、**CD8** ほど顕著ではなかった。**CD4** は浸潤細胞が集積している領域で少数の陽性細胞が認められる程度であった。したがって、アロジェニック腎移植ラットでは、細胞傷害性 **T** 細胞が主体となった細胞浸潤が引き起こされており、拒絶反応が起きていることが示された。

また、イムノブロットによって、腎皮質における **CD8** と **Iba1** のタンパク質発現量を検討した。その結果、**control** 群ではどちらのマーカータンパク質も低発現であったがバンドは検出されていた。定量したところ、**control** 群と比較して、**CD8** タンパク質発現量は **Tp** 群で 60.0 ± 25.8 倍の増加がみられた (図 2 上段)。**Iba1** タンパク質については **4.3** \pm **2.3** 倍の増加がみられた。

次に、尿エクソソームタンパク質についてイムノブロットで検討した。その結果、**CD8** タンパク質は、**control** 群では尿エクソソーム中にみとめられなかったが、腎皮質において顕著な増加を示した **Tp** 群では全例で検出された (図 2 下段)。この結果から、**Tp** 群では細胞傷害性 **T** 細胞由来のエクソソームが尿中に放出されていることが示唆された。また、エクソソームマーカーである **TSG101** タンパク質について、**Tp** 群での増加がみとめられた (図 2 下段)。さらに、もう一つのエクソソームマーカーである **Alix** タンパク質についても **Tp** 群で増加が認められた。

これらのエクソソームマーカータンパク質の由来について検討するために、細胞浸潤が著しい皮質において **PCR** をおこなった。その結果、**TSG101 mRNA** 発現量において、

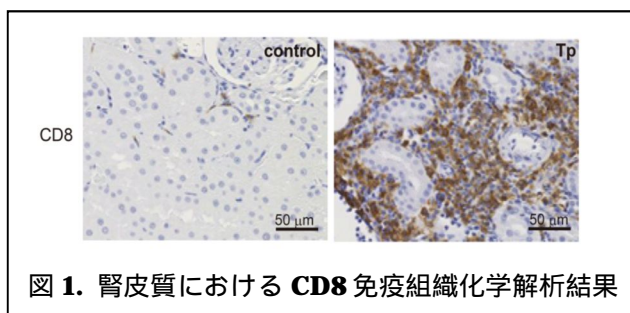


図 1. 腎皮質における **CD8** 免疫組織化学解析結果

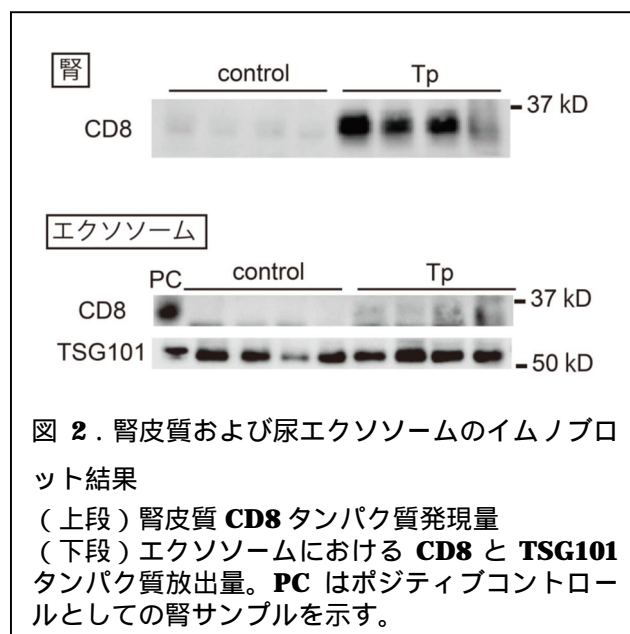


図 2. 腎皮質および尿エクソソームのイムノブロット結果

(上段) 腎皮質 **CD8** タンパク質発現量
(下段) エクソソームにおける **CD8** と **TSG101** タンパク質放出量。 **PC** はポジティブコントロールとしての腎サンプルを示す。

Tp 群で腎皮質での有意な増加が認められた。一方、**Alix mRNA** 発現量については変化がみられなかった。そこで、**TSG101 mRNA** 発現量の増加が、浸潤細胞での増加によるものかどうかについて、免疫組織化学解析によって **TSG101** タンパク質の検出をおこなった。その結果、尿細管上皮細胞における **TSG101** タンパク質発現量については、**control** 群と **Tp** 群に差はみられなかった。一方、**control** 群の動脈周囲の間質の細胞では **TSG101** タンパク質の発現は認められなかったにもかかわらず、**Tp** 群の間質に浸潤した細胞では **TSG101** タンパク質発現がみられた。このことから、アロジェニック腎移植によって増加した尿エクソソーム **TSG101** タンパク質は浸潤細胞由来である可能性が考えられた。

最後に、細胞浸潤の領域と尿エクソソームタンパク質との相関について検討をおこなった。尿エクソソーム中の **CD8** タンパク質量と腎皮質の細胞浸潤領域面積 (**10** 視野平均) の相関を調べた所、**control** 群では尿エクソソーム **CD8** タンパク質が検出できなかったこと、**Tp** 群の細胞浸潤領域面積に差がほとんどなかったことから、相関関係は見いだせなかった。一方、尿エクソソーム **TSG101** タンパク質については、細胞浸潤領域面積との間に有意な正の相関関係がみとめられた ($r = 0.65$, Spearman's test)。

本実験では、以下の結果が得られた。1) アロジェニック腎移植モデルラットでは、細胞傷害性 **T** 細胞を主体とした細胞浸潤がみられ、浸潤した **T** 細胞のマーカータンパク質が尿エクソソーム中に検出できたこと、2) 尿エクソソーム **TSG101** タンパク質が細胞浸潤の程度との間に正の相関を示したこと。これらの結果から、尿エクソソーム中の炎症細胞マーカーによって、定性的に細胞の同定が可能であること、そして **TSG101** タンパク質によってその細胞浸潤の程度が推測できることが考えられた。したがって、尿を用いたリキッドバイオプシーにおいて、尿エクソソーム中の **CD8** と **TSG101** の両方を調べることで、腎における細胞傷害性 **T** 細胞による細胞浸潤の発生と程度を推測できる可能性が考えられた。

(2) その他の腎障害動物モデルを用いた検討

腎移植モデル以外の細胞浸潤を伴う腎障害動物モデルとして、**IR** ラットと **pcy** マウスを用いた。

処置後 **36** 時間での **IR** ラットの腎において、病理学的解析から近位尿細管上皮細胞の壊死・脱落、尿細管の拡張、間質への細胞浸潤、尿円柱の形成がみとめられ、急性尿細管壊死が起きていることが示された。間質に浸潤した細胞を同定するために、**CD4**、**CD8**、および **Iba1** の免疫組織化学解析を行った。その結果、**IR** ラットの腎において **CD4** では陽性細胞は認められず、**CD8** 陽性細胞は少数が間質に散見され、**Iba1** で最も多くの陽性細胞数がみられた。しかしながら、**Iba1** 陽性細胞数は浸潤細胞の主体となるほどの数ではなかった。

21 週齢の **pcy** マウスでは病理学的解析から、多数の嚢胞形成がみとめられ正常な尿細管構造はほとんど失われており、間質に細胞浸潤と線維化が認められた。間質に浸潤した細胞を同定するために、**CD4**、**CD8**、および **Iba1** の免疫組織化学解析を行った。その結果、**pcy** マウスの腎間質において **CD4** および **CD8** の陽性細胞は認められなかった。一方、**pcy** マウスで **Iba1** 陽性細胞は間質に散見されたものの、浸潤細胞の主体となるほどの数ではなかった。

以上の結果の通り、**IR** ラットおよび **pcy** マウスモデルについて細胞浸潤の主体となる炎症細胞の特定には至らなかった。これらの腎障害モデルにおいては、本申請期間中、一時点における検討にとどまったため、細胞浸潤が最も引き起こされる時点が見出せなかった。この点について今後のさらなる検討が必要である。

< 引用文献 >

- [1] Pistkun T et al., Proc Natl Acad Sci USA (2004)
- [2] van Dongen HM et al., Microbiol Mol Biol Rev (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------