

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17695

研究課題名(和文)腎臓病における尿エクソソーム内包物の探索と機能解明

研究課題名(英文)Discovery and elucidation of urinary exosomes in kidney disease

研究代表者

河村 哲也(kawamura, tetsuya)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80773829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外小胞の一種であるエクソソームは蛋白、核酸等多種多様な分子を内包しており、細胞間コミュニケーションの担い手として働くことが知られている。本研究では、腎臓病動物モデルでの尿エクソソームの質的・量的比較検討を行い、その障害細胞特異性を明らかにすることを目的とした。糸球体・ポドサイト障害モデルとしてPAN腎症ラット、尿管障害モデルとして虚血再灌流ラットを採用し、モデル間、コントロールとの尿エクソソームの定量比較を行い、量的差異の有無を検討した。結果、モデルの障害時相に応じたエクソソームの量的変化を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿エクソソームは、過去の検討よりその疾患に特異的な生理機能を有する可能性が高いこと、尿により容易に採取が可能であること等の特徴を有する安定供給可能な生体試料ツールであり、ヒト診療への応用が有望視されてきた。今回、動物モデルでの障害時相における変化を検出できたことは診断バイオマーカーとしての応用につながる成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Exosomes contain a wide variety of molecules such as proteins and nucleic acids. Exosomes function as a carrier of cell-cell communication. The purpose of this study was to discover and elucidate of urinary exosome in kidney disease. We compared urinary exosomes between animal models of kidney disease. We used PAN nephropathy rats as a glomerular injury model and ischemia-reperfusion rats as a tubular injury model. As a result, we detected quantitative changes in exosomes according to the phase of injury.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：エクソソーム 腎臓病 細胞外小胞 micro RNA

1. 研究開始当初の背景

細胞外小胞の一種であるエクソソームは直径約 100nm の脂質二重膜小胞であり、内部には蛋白、miRNA・mRNA 等の核酸、転写因子、細胞質成分や分子を内包している。エクソソームはあらゆる細胞から分泌され、あらゆる体液から検出される。エクソソームが細胞間でやり取りされることによって、mRNA その他物質を介した細胞間のシグナル伝達やコミュニケーションを担うメッセンジャーとして働くことが明らかとなっている。腎臓病における先行研究でも各病態(急性腎障害、慢性腎臓病、糖尿病性腎症、ネフローゼ症候群、血管炎、腎移植後、等)に応じた細胞外小胞、エクソソームが血中、尿中に検出されることが報告されている。糸球体のバリア機能のため循環血中エクソソームは生理的状态では尿中に流出しないと考えられており、尿エクソソームは主に腎尿路細胞由来とされている。尿エクソソームのプロテオーム解析では糸球体、尿管、前立腺、膀胱など腎尿路何れの細胞由来のエクソソームかの解析が可能となっており、エクソソームが腎臓病分野でも疾患特異的なバイオマーカーとなり得る可能性が示されている。治療応用についての報告は限られてはいるが、急性腎障害を中心に動物モデルでの間葉系幹細胞由来エクソソームによる疾患保護作用が検討されている。しかしながら、エクソソームと腎臓病の関連については不明な点が多く、エクソソーム内包物のさらなる解析、体内動態の詳細な検討、予後規定マーカーとなり得るエクソソーム内包物の選定、及びこれらの物質が病因として働くのか疾患保護的に働くのかの検討等多くの課題が残されている。

2. 研究の目的

尿エクソソームは、過去の検討よりその疾患に特異的な生理機能を有する可能性が高いこと、尿から容易に採取が可能であること等の特徴を有する安定供給可能な生体試料ツールであり、ヒト診療への応用が有望視されている。しかしながら、腎臓病におけるエクソソームの役割についてはいまだ不明な点が多い。これまで診断マーカーとしての報告は散見されるが、治療応用に直結する尿エクソソームの生物学的機能に関する検討成果の報告は極めて限られており、現時点では尿エクソソームの生物学的機能の特定や腎臓病の診断・治療といったモデル開発や診療応用は国内外含めて達成されていないのが実状である。将来的なヒトへの臨床応用実現を念頭に置き、本研究では、ラット、ヒト各腎臓病間におけるエクソソームの質的・量的差異の検討を施行し、差異の有無を明らかにする。差異に応じて、診断マーカーとなりうるエクソソーム内包物の探索をおこなう。また、エクソソームによる培養細胞刺激実験で *in vitro* での細胞機能への影響の検討をおこない、エクソソームによる腎臓病の診断・治療モデルの確立を最終的に目指す。本研究で尿エクソソームの腎臓病診断及び治療ツールとしての有効性を明らかにすることができれば、尿エクソソームを患者自身の尿から純化可能であることより、安全性や倫理面において大きなアドバンテージを持つ成果となる。

3. 研究の方法

- (1)ラット尿エクソソームの簡便な抽出・定量方法は確立していないため、まず各種抽出・定量方法を比較し、適切な方法を明らかにする。
- (2)糸球体腎炎モデル動物間での比較検討：糸球体・ポドサイト障害モデル(PAN 腎症ラット、

Heymann 腎炎ラット), 尿細管障害モデル(虚血再灌流, シスプラチン投与ラット), コントロールラット間で尿エクソソームの定量比較を行い, 量的差異の有無を明らかにする.

(3)エクソソームに内包される蛋白・miRNA・mRNA の発現量についてマイクロアレイを用いての網羅的比較を行い, 質的差異の有無を明らかにする.

4. 研究成果

糸球体障害モデルとして PAN 腎症ラット, 尿細管障害モデルとして虚血再灌流ラットを選択し, モデル作成, 定量比較をおこなった. PAN ラットでは第 7 病日, 虚血再灌流ラットでは第 14 病日での尿エクソソーム量のピークを確認し, モデル間での障害時相に応じての変化を検出した. エクソソーム内包物の定量 PCR での質的差異の検討においては今回一貫した結果は得られなかった.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Imai Eri, Usui Joichi, Kaneko Shuzo, Kawamura Tetsuya, Suka Machi, Yamagata Kunihiro	4. 巻 15
2. 論文標題 The precise long-term outcomes of adult IgA nephropathy by mail questionnaires: Better renal survival compared to earlier cohort studies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0233186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0233186	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tawara Takashi, Kai Hirayasu, Kageyama Mikiko, Akiyama Tomoki, Matsunaga Takahiro, Sakuma Aki, Ishii Ryota, Tsunoda Ryouya, Kawamura Tetsuya, Fujita Akiko, Kaneko Shuzo, Morito Naoki, Saito Chie, Usui Joichi, Yamagata Kunihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 A case report of progressive multifocal leukoencephalopathy during steroid treatment for ANCA-associated renal vasculitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 354 ~ 358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-020-00482-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Usui Joichi, Yaguchi Misa, Yamazaki Satoshi, Takahashi-Kobayashi Mayumi, Kawamura Tetsuya, Kaneko Shuzo, Seshan Surya V., Ronco Pierre, Yamagata Kunihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Transcription factor 21 expression in injured podocytes of glomerular diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 ePub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68422-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Watanabe Megumi, Kaneko Shuzo, Usui Joichi, Takahashi Kazuhiro, Kawanishi Kunio, Takahashi Kobayashi Mayumi, Shimizu Tatsuya, Ishii Ryota, Tawara Takashi, Tsunoda Ryoya, Nagai Kei, Kawamura Tetsuya, Fujita Akiko, Kai Hirayasu, Morito Naoki, Saito Chie, Oda Tatsuya, Nagata Michio, Yamagata Kunihiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Literature review of allograft adenovirus nephritis and a case presenting as mass lesions in a transplanted kidney without symptoms of urinary tract infection or acute kidney injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplant Infectious Disease	6. 最初と最後の頁 ePub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tid.13468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Tatsuya, Saito Chie, Watanabe Megumi, Ishii Ryota, Kawamura Tetsuya, Nagai Kei, Fujita Akiko, Kaneko Shuzo, Kai Hirayasu, Morito Naoki, Usui Joichi, Yokosawa Masahiro, Kondo Yuya, Inoue Sae, Okiyama Naoko, Yamagata Kunihiro	4. 巻 60
2. 論文標題 Anti-PM/Scl Antibody-positive Systemic Sclerosis Complicated by Multiple Organ Involvement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1101 ~ 1107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.5665-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishida Reimi, Kaneko Shuzo, Usui Joichi, Kawamura Tetsuya, Tsunoda Ryoya, Tawara Takashi, Fujita Akiko, Nagai Kei, Kai Hirayasu, Morito Naoki, Saito Chie, Yamagata Kunihiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Plasma Exchange Is Highly Effective for Anti Neutrophil Cytoplasmic Antibody Associated Vasculitis Patients With Rapidly Progressive Glomerulonephritis Who Have Advanced to Dialysis Dependence: A Single Center Case Series	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Therapeutic Apheresis and Dialysis	6. 最初と最後の頁 253 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1744-9987.12830	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 本村鉄平, 河村哲也, 臼井丈一, 角田亮也, 藤田亜紀子, 金子修三, 甲斐平康, 森戸直記, 斎藤知栄, 山縣 邦弘
2. 発表標題 ANCA関連血管炎寛解導入治療での免疫抑制薬併用が感染症合併及び予後に与える影響
3. 学会等名 第117回日本内科学会総会・講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 臼井丈一, 金子修三, 河村哲也, 山縣邦弘
2. 発表標題 糸球体疾患に対する生物学的製剤の可能性と問題点 - Current and Future Indications - , ANCA関連疾患に対する生物学的製剤治療
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawamura T, Usui J, Kaneko S, Yamagata K
2. 発表標題 The strong relationship between anemia and renal manifestation in patients with ANCA-associated vasculitis: from the nationwide prospective cohort study
3. 学会等名 ISN World Congress of Nephrology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河村哲也, 金子修三, 臼井丈一, 山縣邦弘, 佐久間垂季, 岩淵聡, 佐田憲映, 槇野博史, 松尾清一
2. 発表標題 ANCA関連血管炎に合併する貧血は腎病変の重症度と関連する ~ Remit-JAV-RPGNコホートより ~
3. 学会等名 第64回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------