

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：32643
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592084
 研究課題名（和文）多発性嚢胞腎における尿中分泌細胞小体の包括的解析
 研究課題名（英文）Comprehensive analysis of urinary exosomes in ADPKD
 研究代表者 堀江 重郎（HORIE SHIGEO）
 帝京大学・医学部・教授
 研究者番号：40190243

研究成果の概要（和文）：健常者ならびにADPKD患者において、尿中の exosome を抽出し、含まれている蛋白質を質量分析法 で解析した。液体クロマトグラフィー/質量分析法で解析したところ、ADPKD に特異的なペプチド群が見いだされ、現在その臨床的な意義を検討している。

研究成果の概要（英文）： We have isolated urinary exosomes in the control and patients with ADPKD. By utilizing liquid chromatography / mass spectrometry, specific peptides were identified in exosomes of patients with ADPKD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：ADPKD, exosome, 尿中分泌細胞小体, 多発性嚢胞腎

1. 研究開始当初の背景

常染色体優性多発性嚢胞腎は約 1,000～2000 人に 1 人に発症する最も頻度が高い遺伝性腎疾患である。多発性嚢胞腎患者の 85% は 16 染色体上の PKD1 遺伝子に異常があり、残りの 15% は 4 染色体上の PKD2 遺伝子の異常であることが知られている。多発性嚢胞腎の本邦の推定患者数は、約 30000 人であり、60 歳台までに患者の半数は、終末期腎不全へと進行する。

腎嚢胞形成には種々のサイトカインや細胞増殖因子が関与しているが、申請者らははじめて HGF が塩濃度が高い近位型嚢胞に高濃度に存在し、また cAMP が塩濃度が低い遠位型

嚢胞に高濃度であることを初めて報告した。さらに cAMP は多発性嚢胞腎患者から得られた嚢胞上皮細胞の増殖を促進すること、また嚢胞腎モデル動物である PCK ラットおよび pcy マウスでは腎において cAMP 量が増加しておりまた cAMP により転写調節される aquaporin2 およびバゾプレッシン V2 レセプターの発現が増加していることから、cAMP は嚢胞の増大と上皮の増殖の両方に関与していると考えられる。そこでバゾプレッシン V2 レセプター阻害薬をこれらの動物モデルに投与したところ、腎 cAMP 含有量が減少し嚢胞形成が劇的に減少した。この結果を基に現在多発性嚢胞腎患者に対してバゾプレッシン V2 レセプター阻害薬の国際臨床試験が開

始されている。また申請者らはチアゾリン系薬剤が動物モデルで嚢胞を縮小することを発見し、臨床応用が期待されている。一方多発性嚢胞腎の分子創薬が盛んになるにつれて、治療介入時期と治療効果の判定には、分子病態を示すバイオマーカーの必要性が高まっている。糸球体濾過量を基準とする血中クレアチン値やシスタチンCは、多発性嚢胞腎が尿細管間質疾患であるため鋭敏なバイオマーカーではない。また多発性嚢胞腎では、嚢胞形成と同時に尿細管の萎縮、蛋白尿が見られ、レニン-アンギオテンシン系(RAS)の亢進と炎症性サイトカインの産生が見られる。しかしこれらの現象は病態がかなり進行してから出現するため、尿中のMCP-1をはじめとするサイトカインも病態のバイオマーカーとしては有用でない。すなわち腎機能が正常に維持されている段階で腎臓に起こる変化を捕捉するバイオマーカーが必要になってくる。

申請者らは尿細管細胞は嚢胞形成に際して脱分化し、細胞接着因子 E-cadherin の発現が減少することを既に発見、報告した。これは多発性嚢胞腎の疾患遺伝子 PKD1 を欠損したマウスを作成し、その腎臓尿細管細胞を観察すると、尿細管は正常の形態ながら細胞の E-cadherin の発現が減少することが明らかになった。近年こういった分子病態を反映した構成細胞の変化は、細胞からの exosome 分泌に変化をもたらすことが明らかになった。exosome は細胞内の小胞由来の膜構造を総称し、尿中 exosome は、ネフロンから分泌され 40-80 nm の大きさを持つ。exosome は超遠心法によりはじめて沈殿する分画に含まれ、また尿中 exosome の特徴として水チャネルアキアポリン(AQP2)を豊富に含んでいる。現在健常者の尿中には約 300 種類の蛋白が exosome に含まれており、尿細管、糸球体、尿路上皮細胞由来の蛋白が確認されている。これらの蛋白は質量分析により比較的容易に解析できる。さらに尿中 exosome は蛋白質のみならず mRNA, microRNA も含んでいることから、細胞-細胞間相互作用を反映していることが報告され、包括的な遺伝子発現解析が腎組織の採取を必要とせずに、尿の採取のみで行える可能性もある。多発性嚢胞腎に特異的な蛋白が尿中 exosome に得られれば、病態の理解に重要な分子の可能性があり、また関連する細胞内情報伝達系を解析することは分子創薬の可能性を開拓する。また病態を示すバイオマーカーであれば、多発性嚢胞腎の早期治療介入に活用できる可能性がある。またがん細胞も exosome を分泌することから今後尿路腫瘍におけるバイオマーカーの探索にもこの研究を活用することが期待される。

2. 研究の目的

本研究は平成 21 年度から 23 年度において尿中 exosome を解析することで多発性嚢胞腎のバイオマーカーを探索することを目的とする。具体的には経年的な臨床データが得られている、多発性嚢胞腎患者から同意を得て採尿し、しょ糖密度勾配での超遠心により exosome を抽出し、含まれている蛋白質を質量分析法で解析する。

3. 研究の方法

尿 exosome 抽出と液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS: Liquid Chromatography / Mass Spectrometry)の確立

健常者と多発性嚢胞腎患者より早朝尿を採取し、プロテアーゼ阻害薬を加え、17,000g 4°C 15 分間遠心し、この上清をさらに 200,000g の超遠心機で 1 時間遠心する。ペレットを SDS-PAGE で電気泳動した後、抗水チャネル AQP2 (アキアポリン) 抗体で western blot を行い、AQP2 蛋白の存在を確認することで exosome であるか確認する。ペレットを SDS-PAGE で展開し、Coomassie blue で染色したのちに、分子量に応じてゲルを切り出す。切り出したゲルをトリプシン処理をして分解し、液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS: Liquid Chromatography / Mass Spectrometry)にかける。健常者と多発性嚢胞腎とで蛋白の発現プロフィールを比較検討する。

4. 研究成果

尿中分泌細胞小体(exosome)とは、細胞内の小胞由来の膜構造を総称し、尿中 exosome は、ネフロンから分泌され 40-80 nm の大きさを持つ。exosome は超遠心法によりはじめて沈殿する分画に含まれ、また尿中 exosome の特徴として水チャネルアキアポリン(AQP2)を豊富に含んでいる。現在健常者の尿中には約 300 種類の蛋白が exosome に含まれており、尿細管、糸球体、尿路上皮細胞由来の蛋白が確認されている。さらに尿中 exosome は蛋白質のみならず mRNA, および microRNA も含んでいることから、細胞-細胞間相互作用を反映していることが報告されている。したがって exosome から遺伝子、たんぱく質を採取できれば、包括的な遺伝子発現解析が腎組織の採取を必要とせずに、尿の採取のみで行える可能性もある。平成 22 年度は、健常者ならびに ADPKD 患者において、

しよ糖密度勾配での超遠心により尿中の exosome を抽出し、含まれている蛋白質を質量分析法 で解析した。液体クロマトグラフィー/質量分析法で解析したところ、ADPKD に特異的なペプチド群が見いだされ、現在その臨床的な意義を検討している。また嚢胞腎を形成する遺伝子異常を持つ *pcy* マウスにおいても、尿から exosome を分離し、含まれている蛋白質についてペプチド探索を行ったところ、NGAL、MCP1 など尿細管由来のバイオマーカーを尿中に同定した。これらの蛋白が治療により変動するかを検討する予定である。

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 16 件)

- ① The relationship between renal volume and renal function in autosomal dominant polycystic kidney disease. Tokiwa S, Muto S, China T, Horie S. Clin Exp Nephrol. 2011;15:539-45.
- ② The impact of the great Tohoku Earthquake on the dialysis practice in the disaster-stricken area. Tsubokura M, Horie S, Komatsu H, Tokiwa M, Kami M. Hemodial Int. 2011 Dec 30. 16(2): 320-1
- ③ 武藤 智、堀江重郎. VI 嚢胞性腎疾患 常染色体優性多発性嚢胞腎、常染色体劣性多発性嚢胞腎. 別冊日本臨床 腎臓症候群第二版. 2011;577-80.
- ④ 武藤 智、堀江重郎. 13 章 嚢胞性腎疾患患者へのアプローチ. レジデントのための腎臓病診療マニュアル第二版. 2011;421-2.
- ⑤ 武藤 智、堀江重郎. 内科疾患インストラクションガイド 何をどう説明するか 腎・尿路疾患 腎嚢胞/多発性嚢胞腎. Medicina. 2011;48:342-6,
- ⑥ 武藤 智、堀江重郎. 嚢胞腎の形態と分子病態. モノグラフ 病気の分子病態学. 2011;215-7.
- ⑦ 武藤 智、堀江重郎. 腎臓内科学 多発性嚢胞腎の新しいガイドライン. 医学のあゆみ. 2011;865-6.
- ⑧ 武藤 智、堀江重郎. 特集 全身性疾患と腎障害 多発性嚢胞腎診療ガイドライン. 総合臨床. 2011; 1315-9.
- ⑨ 武藤 智、堀江重郎. 遺伝性疾患: 多発性嚢胞腎. 腎疾患・透析 最新の治療. 2011;236-40.
- ⑩ [Autosomal dominant polycystic kidney disease]. Horie S. Nihon Jinzo Gakkai Shi. 2011;53:6-9.
- ⑪ Tolvaptan in autosomal dominant polycystic kidney disease: three years' experience. Higashihara E, Torres VE, Chapman AB, Grantham JJ, Bae K, Watnick TJ, Horie S, Nutahara K, Ouyang J, Krasa HB, Czerwiec FS; TEMPOFormula and 156-05-002 Study Investigators. Clin J Am Soc Nephrol. 2011;6:2499-507.
- ⑫ Shino Tokiwa, Satoru Muto, Toshiyuki China and Shigeo Horie. The relationship between renal volume and renal function in autosomal dominant polycystic kidney disease、Clinical and Experimental Nephrology、査読有、2011 DOI:10.1007/s10157-011-0428-y
- ⑬ 堀江重郎、常染色体優性多発性嚢胞腎 (特集 腎臓学 この一年の進歩)、日本腎臓学会誌、査読無、53(1)巻、2011、6-9
- ⑭ 武藤 智、堀江重郎、TOPICS 多発性嚢胞腎の治療の新展開、医学のあゆみ、査読無 228 巻、2009、252-253
- ⑮ 武藤 智、堀江重郎、特集 腎における細胞内シグナル伝達と病態生理 尿細管細胞の cilia を介するシグナル伝達と囊

胞性腎疾患、腎と透析、査読無、67 巻
2009、392-395

- ⑩ 武藤 智、堀江重郎、CKD の治療各論 多
発性嚢胞腎、腎と透析 増刊号 CKD の
すべて、査読無、67 巻、2009、390-395

[学会発表] (計 15 件)

- ① Muto S, Tokiwa S, Nagae M, China T,
Kumamoto T, Koseki T, Yoshii T, Saito
K, Isotani S, Yamaguchi R, Ide H, Horie
S. The relationship between renal
volume and renal function in autosomal
dominant polycystic kidney disease.
American Society of Nephrology 2011.
Philadelphia, PA. 2011/11/8-13
- ② 磯谷周治、井上正浩、小川裕太郎、永榮
美香、知名俊幸、小関達郎、常磐紫野、
吉井 隆、斉藤恵介、井手久満、武藤 智、
山口雷蔵、堀江重郎。泌尿器科ホームペ
ージを介した尿路結石の治療情報提供
とその web 解析。第 476 回 日本泌尿器
科学会東部総会。横浜、2011/10/20-2。
- ③ 武藤 智、望月俊雄、奴田原紀久雄、堀
江重郎。多発性嚢胞腎患者向けパンフレ
ットの作成。第 476 回 日本泌尿器科学
会東部総会。横浜、2011/10/20-22。
- ④ 磯谷周治、吉井 隆、小関達郎、井上正
浩、小川裕太郎、永榮美香、常磐紫野、
斉藤恵介、井手久満、山口雷蔵、武藤 智、
堀江重郎。当院における Holmium YAG
レーザーを使用した軟性尿管鏡による
経尿道的尿路結石砕石術 (f-TUL) の治療
成績に関する検討。第 476 回 日本泌尿
器科学会東部総会。横浜、2011/10/20-22。
- ⑤ 天野慶子、奈倉通仁、武田剛一、本間 仁、
加藤秀樹、野坂仁也、種本雅之、武藤 智、
堀江重郎、内田俊也。9 年の間隔をあけ
て両側腎梗塞を発症した腎動脈解離の

一例。第 476 回 日本泌尿器科学会東部
総会。横浜、2011/10/20-22。

- ⑥ 磯谷周治、吉井 隆、小関達郎、井上正
浩、小川裕太郎、永榮美香、常磐紫野、
斉藤恵介、井手久満、山口雷蔵、武藤 智、
堀江重郎。当院における Holmium YAG
レーザーを使用した軟性尿管鏡による
経尿道的尿路結石砕石術 (f-TUL) の治療
成績に関する検討。第 41 回 日本腎臓
学会東部学術大会、東京、2011/10/14-15
- ⑦ Muto S, Tokiwa S, Nagae M, China T,
Kumamoto T, Koseki T, Yoshii T, Saito
K, Isotani S, Yamaguchi R, Ide H, Horie
S. The relationship between renal
volume and renal function in autosomal
dominant polycystic kidney disease.
FASEB summer research conference
Polycystic kidney disease: from Bench
to Bedside. Vermont Academy.
2011/6/26-7/1.
- ⑧ 奴田原紀久雄、東原英二、堀江重郎、武
藤智、望月俊雄、西尾妙織：常染色体多
発性嚢胞腎における腎機能と腎容積の
変化。第 54 回日本腎臓学会学術総会
2011 年 6 月 15 日 横浜市
- ⑨ 奴田原 紀久雄、東原 英二、堀江 重郎、
常染色体優性多発性嚢胞腎患者に対するトルパ
ブタン長期投与成績、第 53 回日本腎臓学会学
術総会、2010/6/18、神戸国際会議場
- ⑩ 武藤 智、永榮 美香、堀江 重郎、常
染色体優性多発性嚢胞腎患者における腎機能
と腎容量、第 53 回日本腎臓学会学術総会、
2010/6/18、神戸国際会議場
- ⑪ 武藤 智、永榮 美香、堀江 重郎、常
染色体優性多発性嚢胞腎患者における腎機能
と Abdominal Wall Fat Index、第 53 回日本腎
臓学会学術総会、2010/6/17、神戸国際会議
場
- ⑫ 武藤 智、奴田原紀久雄、東原英二、堀
江重郎、多発性嚢胞腎における腎機能と
腎容量の長期経過、第 9 回 P K D 研究会、
2009/12/19、東京
- ⑬ 武藤 智、永榮美香、知名俊幸、熊本友

香、小関達郎、常盤紫野、西尾浩二郎、
斉藤恵介、吉井 隆、磯谷周治、上山 裕、
井手久満、堀江重郎、多発性嚢胞腎に対
するバソプレシン V2 受容体拮抗薬
OPC41061 長期投与の経験、第 39 回日本
腎臓学会東部学術総会、2009/10/2、東
京

⑭ 武藤 智、知名俊幸、常盤紫野、西尾浩
二郎、永榮美香、斉藤恵介、磯谷周治、
上山 裕、井手久満、堀江重郎、多発性
嚢胞腎における腎機能/腎容積と血管内
皮機能、第 17 回嚢胞性腎疾患研究会、
2009/9/12、東京

⑮ 武藤 智、知名俊幸、常盤紫野、西尾浩
二郎、永榮美香、斉藤恵介、磯谷周治、
上山 裕、井手久満、堀江重郎、多発性
嚢胞腎におけるアポリポ蛋白と腎機能
および血管内皮機能、第 52 回日本腎臓
学会学術総会、2009/6/4、東京

[図書] (計 4 件)

- ① 武藤 智、堀江重郎、中外医学社、
かかりつけ医と専門医のための CKD
診療ガイド、2009 年 6 月
- ② 武藤 智、堀江重郎、メディカルビ
ュー、腎移植のすべて、2009 年 5
月
- ③ 武藤 智、堀江重郎、中外医学社、
エキスパートのための腎臓内科学、
2009 年 4 月
- ④ 武藤 智、堀江重郎、医学書院、専
門医のための腎臓病学 第 2 版、
2009 年 3 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 重郎 (HORIE SHIGEO)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号 : 40190243