

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32413

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 23 年度～平成 24 年度

課題番号：23790627

研究課題名（和文）尿中アルブミン漏出の新規機序に対応した尿細管機能予測マーカーの探索

研究課題名（英文）Proteomic-based identification of renal tubular markers related to the new mechanism of urinary albumin excretion.

研究代表者 中山 亜紀（Aki Nakayama）

文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科 助手

研究者番号：00599425

### 研究成果の概要（和文）：

尿細管上皮細胞の代謝能を間接的に予測する生理的に分泌されているアルブミンペプチドの組成を明らかにした。また遠位尿細管上皮細胞に発現している Tamm-Horsfall protein が腎機能障害に伴って分泌量が低下することを明らかにした。さらに尿路上皮細胞機能変化を直接的に反映するエキソソームを解析する上で重要な健常人エキソソームタンパク質プロファイルを提供した。以上のように尿細管上皮細胞で代謝を受ける、ないしは分泌される成分に注目し、尿細管上皮細胞の機能評価を目的とした相互的な評価を行った。

研究成果の概要（英文）：The urinary albumin peptides metabolized in the renal tubular cells and excreted into urine, and which is considered as an in-direct tubular marker were identified by proteome analysis. The quantitative analysis of urinary Tamm-Horsfall protein showed that the significant decrease level in the patients with renal dysfunction. The proteome analysis of urinary exosomes enabled the identification of variety types of protein derived from renal epithelial cells. These results provide the basic information to predict the tubular dysfunction in renal disease condition.

### 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態医科学

キーワード：尿中アルブミン、Tamm-Horsfall protein、エキソソーム

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 尿細管主導型アルブミン排泄メカニズム

蛍光標識アルブミンをラットに注入し、腎臓における代謝の様子を 2 光子顕微鏡で観察する in vivo イメージング法により解析した結果、①糸球体を通過するアルブミンの量がコントロール群と糖尿病群で有意差を認めないこと、②尿細管でのアルブミン再吸収量が、糖尿病群で有意に低下していたことから、糖尿病における尿へのアルブミン漏出の要因として糸球体濾過能の破綻よりも尿細管での再吸収能の低下が優位である事が示された<sup>1</sup>。この報告以降、従来の糸球体主導か

ら尿細管主導型のアルブミン排泄説へと注目が集まっている<sup>1,2</sup>。

(2) アルブミン尿が意味する現象

RI 標識アルブミンを生体循環させた後の尿をゲル濾過 HPLC にて分離し、検出した RI カウントからアルブミン分子サイズを比較した研究において、健常人では 10 kD 以下のアルブミンペプチドが大量に検出された。それに対し、腎疾患では病態の重症化に伴いアルブミンペプチド分泌が低下し、66 kD のモノマーアルブミン量が増加した<sup>2</sup>。この研究から、腎障害において尿細管でのアルブミンの再吸収および代謝能が低下し、ペプチド分泌が抑制され、アルブミンは再吸収されな

いままモノマーの状態では排泄されるようになることが示された。つまり、アルブミンペプチド排泄量の律速が尿細管であることが推測されている。

以上のようにアルブミン排泄メカニズムの解釈を解釈する上で糸球体よりも尿細管機能との関連を重要視する報告が近年増加傾向にある。

## 2. 研究の目的

前述の背景を基に、本研究では尿細管上皮細胞機能を反映し得る3つの項目に注目して解析を進めることにした。①尿中アルブミンペプチドの詳細を明らかにし、尿細管の再吸収・代謝能を予測する、②尿細管より分泌されている Tamm-Horsfall protein (THP)<sup>3</sup>の動態を明らかにし、尿細管の分泌能を予測する、さらに③尿に排泄されているエキソソーム構成タンパク質から細胞内ダイナミクスを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) アルブミンペプチド解析法

書面にて同意の得られた対象者から提供を受けた尿をプールし (20 ± 2 歳、男女各3名)、防腐剤およびプロテアーゼインヒビター (尿 50 mL あたり 100 mmol/L アジ化ナトリウム 1.67 mL、プロテアーゼインヒビターとして 125 mmol/L ベンジルスルホニルフルオリド 200 μL、1 mmol/L ロイペプチン 50 μL) を添加して測定までに -80°C に保存した<sup>4</sup>。調整したプール尿を 20 kD の限外濾過法 (Kurabo, Tokyo, Japan) により分離し、濾過画分を抗ヒトアルブミンポリクローナル抗体 (Dako Japan Inc.) および ProteinG Mag Sepharose (GE healthcare) を用いて免疫沈降し、低質量アルブミンペプチドを回収した。このペプチドサンプルを高速液体クロマトグラフィー (Advance-nano UHPLC, AMR)・質量分析装置 (amaZon ETD, BrukerDaltonics) にて解析した。高速液体クロマトグラフィーでは逆相カラム (L-column Micro, 0.1×50 mm, L2-C-18, 化学物質評価研究機構) を用いた。移動相 A は 0.1% ギ酸、移動相 B は 100% アセトニトリルを用い、グラジエント条件は、%B が 20 分間 5→45%、20~21 分間 45→95%、21~24 分間 95%、24~25 分間 95→5%、25~30 分間 5% で行った。検出されたペプチドは、Mascot search (Matrix science) により、タンパク質を同定した。

### (2) THP 定量法

THP 定量のための ELISA 法を構築した。炭酸緩衝液 (0.5 mol/L 塩化ナトリウム、46 mmol/L 炭酸ナトリウム、50 mmol/L 炭酸水素ナトリウム、pH9.6) を用いて 5.57 mg/ml 抗ヒト THP モノクローナル抗体 (自家製) を 1

μg/ml に希釈し、96 穴 Maxisorp プレート (Nunc) に 1 ウェルにつき 100 μL 加え、4°C で一晩放置し固相させた。抗体固定プレートをプレートウォッシャー (Auto Mini Washer AMW-8, バイオテック株式会社) を用いて 0.05% Tween 20 を含む phosphate buffer saline (PBS) で 1 ウェルにつき 350 μL で 3 回洗浄後、0.5% カゼインナトリウムを含む PBS を各ウェルに 300 μL 加え、室温で 90 分間ブロッキングした。その後洗浄を 3 回行った。検体は超純水および検体希釈液 (5 mmol/L トリスヒドロキシメチルアミノメタン、29 mmol/L スクロース、220 mmol/L 塩化ナトリウム、49 mmol/L ウシ血清アルブミン、pH8.0) で 4,000 倍に希釈した尿を用いた。また、検量線作成用として、自家製 THP 標準品を超純水で希釈し、80 ng/ml から 1.25 ng/ml までを調整した。それらを各ウェルに加え、室温で 90 分間反応させた。その後、洗浄を 3 回を行い、抗体希釈液 (1% ウシ血清アルブミン、0.1% カゼインナトリウムおよび 5% スクロースを含む 10 mmol/L PBS) で希釈したウサギ抗ヒト THP ポリクローナル抗体 (自家製) を各ウェルに 100 μL 加え、室温で 90 分間反応させた。その後、洗浄を 3 回を行い、抗体希釈液で希釈したペロオキシダーゼ標識ブタ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (DAKO) を各ウェルに 100 μL 加え、室温で 90 分間反応させた。洗浄を 3 回を行い、3,3'-5,5' テトラメチルベンジジン (KPL) を 100 μL 加え、遮光して室温で 15 分間発色させた。0.3 mol/L 硫酸を各ウェルに 100 μL 加え、反応を停止させた。ELISA リーダー (パーキンエルマー・ジャパン) を用いて波長 450nm で測定し、THP 検量線から尿検体の THP 濃度を算出した。

### (3) 尿中エキソソームタンパク質解析法

(1) と同様に調整した尿検体を 17,000 g、37°C、10 分間、高速遠心機 (himac CR 20G, 日立工機, R15A ローター) で遠心し、上清 (上清①) を分離した。尿中有形成分を含む沈渣を isolation solution (250 mmol/L スクロース、10 mmol/L トリエタノールアミン) で溶解後、200 mg/ml ジチオスレイトール (DTT) を加え 37°C、5 分間反応させた。さらに isolation solution を加え再度 17,000 g、37°C、10 分間、高速遠心した。上清 (上清②) を分離し、上清①と②を混和した。この上清を 200,000 g、37°C、1 時間、超遠心機 (himac CP 70MX, 日立工機) で超遠心した。ここまでは Fernández-Llama らの方法に準じた<sup>4</sup>。上清は捨て、エキソソームが含まれた沈渣を 25 mmol/L トリスヒドロキシメチルアミノメタン (pH 7.6)、150 mmol/L 塩化ナトリウム、1% ノニデット P-40、1% デオキシコール酸、0.1% SDS を含む Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA) buffer (Thermo Scientific) に溶解した<sup>5</sup>。

エキソソーム検体の前処理として脱塩および濃縮を行うために 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare)を用いた。一次元目のゲルストリップ (Invitrogen)1 本あたりのタンパク量が 15  $\mu\text{g}$  となるように調製し、rehydration buffer (8 mol/l 尿素、32.5 mmol/l CHAPS、0.005% ampholytes (pI 3-10)、35.7  $\mu\text{mol/l}$  bromophenol blue)で一晩膨潤した。その後、等電点電気泳動を 200 V 20 分、450 V 15 分、750V 15 分、2000 V 60 分の条件で行った。一次元目の泳動が終了後、sample reducing agent (Invitrogen)で還元、125 mmol/l ヨードアセトアミドでアルキル化を行った。二次元目には 15%のポリアクリルアミドゲルを使用した SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。二次元電気泳動法により分離したタンパク質はシルバーステイン KANTO III(関東化学)を使用して銀染色を行った。

泳動像からタンパク質スポットを切り取り、シルバーステイン KANTO ゲル洗浄液質量分析用(関東化学)により脱色後、25 ng/ $\mu\text{l}$  トリプシン (Promega)で 37  $^{\circ}\text{C}$  16 時間ゲル内消化を行った。その後の質量分析装置による解析は(1)と同様の方法で行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) アルブミンペプチドの探索結果

健常人尿の低質量画分より免疫沈降法で分離したアルブミンのアミノ酸配列を有するペプチドとして質量約 1,600 Da から 3,300 Da の 6 種のペプチドが同定された。本研究で確立した尿からのペプチド分離法を基に各種腎疾患患者尿でも検討を行い、生理的に分泌されているこれらの主たるペプチドが、腎機能の低下により変動するか否か今後の検討していきたい。

##### (2) 各種腎症患者における THP の動態

年齢を合致させた健常人群における尿中 THP 濃度は  $49.2 \pm 5.48 \text{ mg/l}$  であったのに対し、IgA 腎症患者をはじめとする各種腎症患者においては  $10.4 \pm 2.20 \text{ mg/l}$  と健常人群と比較して有意に低値を示した。興味深いことに、腎生検像で顕著な尿細管障害を示す患者のみならず、尿細管障害を認めない糸球体性腎症の患者群においても THP の分泌低下が認められた。尿細管の組織的な異常を呈する前段階からすでに機能障害を生じていることを示唆する結果である。尿細管機能を直接的に反映する THP の定量法は臨床的意義の高い検査法と成り得るであろう。

##### (3) 尿中エキソソームタンパク質からバイオマーカー候補探索へ

プロテオーム解析により 2 次元電気泳動ゲルの 98 のスポットから 76 種のタンパク質が同定された。この 76 種のタンパク質のうち

15 種については遠心分離前の尿検体と共通して認められたタンパク質であり、尿タンパク質のコンタミネーションであると推測された。61 種のタンパク質についてはエキソソーム分画のみに認められた。このうち charged multivesicular body protein 1b、chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3、cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolaseをはじめとする 17 種のタンパク質についてはエキソソームタンパク質の主要なデータベースに掲載されていなかったことから、今回新規に同定されたエキソソームタンパク質であると考えられた。エキソソーム分画から同定されたタンパク質のうち 43%は細胞質や細胞骨格を成すものであり、15%は細胞外領域に発現が認められているタンパク質であった。また基底膜成分は 6%を占め、その他 36%については発現部位が確認されなかった。エキソソームは分泌される細胞の縮図と考えられており、それを証明するように尿路上皮系細胞の内外を構成するタンパク質が同定された。尿中エキソソームから得られる情報が、尿路上皮系の細胞の生理的状态や代謝様式の理解に寄与するであろう。さらに本研究で得られた健常人尿中エキソソームタンパク質のプロファイルを基に腎機能障害患者尿中のエキソソームと比較することで、疾患に起因するタンパク質組成の変化から病態を予測するマーカーを見出せるかもしれない。

#### 参考文献

1. Russo LM, Sandoval RM, Campos SB, Molitoris BA, Comper WD, Brown D. Impaired tubular uptake explains albuminuria in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:489-94.
2. Comper WD, Hilliard LM, Nikolic-Paterson DJ, Russo LM. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:1589-600.
3. Serafini-Cessi F, Malagolini N, Cavallone D. Tamm-Horsfall glycoprotein: biology and clinical relevance. *Am J Kidney Dis* 2003 ;42 :658-76.
4. Fernández-Llama P, Khositseth S, Gonzales PA, Star RA, Pisitkun T, Knepper MA. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int.* 2010;77:736-42.
5. Kosaka A, Nakayama A, Yamaguchi I, Kasama T, Totsuka M, Shiba K. Comparison of urinary exosomal protein solubilization methods for two-dimensional gel electrophoresis. *J Electrophoresis* 2012;56:7-11.

#### 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2件) 査読あり

1. Nakayama A, Odake J, Kanke A, Sakatsume M, Kasama T, Shiba K. Redox State of Urinary Albumin in Patients with IgA Nephropathy. Rinsho Byori 2011;59:1013-18. 【優秀論文賞受賞】
2. Kosaka A, Nakayama A, Yamaguchi I, Kasama T, Totsuka M, Shiba K. Comparison of urinary exosomal protein solubilization methods for two-dimensional gel electrophoresis. J Electrophoresis 2012: 56:7-11.

〔学会発表〕(計14件)

1. Kubota R, Nakayama A, Odake J, Sakatsume M, Kasama T, Narita I, Sakai N, Kanamori K, Shiba K. Cellulose acetate membrane electrophoresis coupled with sensitive colloidal silver staining for urinary approach for predicting the renal injury. Annual meeting 2011, American Association for Clinical Chemistry, July 28, 2011, Atlanta, USA.
2. 中山亜紀、平賀香奈子、香坂亜沙美、片山映、鈴木秀典、芝紀代子 二次元電気泳動法を用いた健常人 尿中エキソソームタンパク質の解析、第62回日本電気泳動学会総会、平成23年11月12日、横浜市
3. 香坂亜沙美、中山亜紀、山口委久江、戸塚実、芝紀代子、二次元電気泳動法による尿中エキソソームの解析、第58回日本臨床検査医学会学術集会、平成23年11月20日、岡山市
4. 大竹純矢、中山亜紀、坂爪実、成田一衛、笠間健嗣、芝紀代子、セルロースアセテート膜電気泳動法により9分画に分離した尿細管障害患者のタンパク質解析、平成23年11月20日、岡山市
5. 中山 亜紀、香坂 亜沙美、平賀 香奈子、片山 映、鈴木 秀典、芝 紀代子、健常人尿中エキソソームタンパク質の基礎的解析、第22回生物試料分析学会年次学術集会、平成24年3月11日、九州市
6. 中山 亜紀、香坂 亜沙美、平賀 香奈子、片山 映、鈴木 秀典、芝 紀代子、尿中エキソソームタンパク質の基礎的解析、第8回腎・泌尿器検査研究会学術集会、東京都
7. Nakayama A, Odake J, Kimino M, Sakatsume M, Kasama K, Kanamori K, Shiba K. Constructive analysis of urinary proteins using cellulose acetate membrane electrophoresis for predicting renal damages. American Association for Clinical Chemistry Annual meeting 2012, July 18, 2012, Los Angeles, USA.

8. Nakayama A, Kubota R, Nishimaki J, Odake J, Sakatsume M, Iijima S, Shiba K. Development of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for urinary Tamm-Horsfall protein and its usefulness in diagnosing renal dysfunction. Association for Clinical Chemistry Annual meeting 2012, July 18, 2012, Los Angeles, USA.
9. 中山亜紀 ワークショップ I : 基礎から臨床へ (1) 尿中エキソソーム成分から臨床検査診断薬開発へ、第63回日本電気泳動学会総会 平成24年8月20日、宜野湾市
10. Nakayama A, Kubota R, Arai Y, Katayama A, Suzuki H, Shiba K, Iijima S. Identification of urinary exosomal proteins by two dimensional gel electrophoresis. Human Proteome Organization 11th Annual World Congress, September 10, 2012, Boston, USA.
11. 君野舞、中山亜紀、坂爪実、笠間健嗣、芝紀代子、飯島史朗 セルロースアセテート膜電気泳動法を用いた IgA 腎症患者尿中タンパク分画の多様性の解析、第59回日本臨床検査医学会学術集会、平成24年11月29日
12. Nakayama A, Kubota R, Sakatsume M, Iijima S, Kiyoko Shiba. Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay for urinary Tamm-Horsfall protein. 12th meeting of the Asian Society of Clinical pathology and Laboratory Medicine, November 30, 2012, Kyoto, Japan.
13. 中山亜紀、荒井勇輝、久保田亮、片山映、鈴木秀典、飯島史朗、芝紀代子 健常人尿中エキソソームタンパク質の基礎的解析2、生物試料分析学会 第23回年次学術集会、平成25年2月10日、大阪市
14. 酒井伸枝、久保田亮、中山亜紀、吉越和江、北川優、松本二郎 妊婦の尿中蛋白解析 -Tamm-Horsfall 蛋白 (THP) -生物試料分析学会 第23回年次学術集会、平成25年2月10日、大阪市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中山 亜紀 (Aki Nakayama)

文京学院大学・保健医療技術学部・臨床検査学科・助手

研究者番号：00599425