

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590686

研究課題名(和文) レドックス生体応答反応を利用した新規のベッドサイド迅速酸化ストレス診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a redox biological reaction-based diagnostic method at bedside for oxidative stress

研究代表者

糟野 健司 (KASUNO, Kenji)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：60455243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎症マーカー蛋白の研究から尿中チオレドキシンが急性腎障害で特異的に高値を示すことを発見し、これを用いた診断法を開発した。尿中に検出されるメカニズムとして、健状下で血中チオレドキシンが過剰吸収され尿細管細胞内に蓄えられ、腎障害時には酸化ストレスにより酸化型となって分泌され尿中に増加すると考えられた。この現象を応用し、化学発光酵素免疫測定法を用いた新規の迅速レドックス診断システムを開発した。診断は15分で完了し、急性腎障害に対する診断能力は、カットオフ値43.0  $\mu\text{g/gCre}$ にてAUC0.94、感度0.88、特異度0.88とNgal、KIM-1、L-FABPと同等に優れていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We found that urinary thioredoxin (TRX) levels were markedly higher in patients with acute kidney injury (AKI) than in those with chronic kidney disease or in healthy subjects. In a steady state, TRX in blood is filtered and reabsorbed by renal tubular cells. During kidney injury, tubular cells excrete TRX in an oxidative form in response to oxidative stress. With using this unique phenomenon, we developed a redox biological reaction-based diagnostic method at bedside for oxidative stress. This method employed chemiluminescent immuno assay, and completed within 15 minutes. For the differentiation between AKI and other renal diseases, the area under the curve for urinary TRX was 0.94 (95% confidence interval, 0.90-0.98) in a receiver operating characteristic curve analysis, and the sensitivity and specificity were 0.88 and 0.88, respectively, at the optimal cutoff value of 43.0  $\mu\text{g/g}$  creatinine. This diagnostic ability is comparable to established AKI markers NGAL, KIM-1, and L-FABP.

研究分野：酸化ストレス

キーワード：酸化ストレス 急性腎障害 尿中チオレドキシン

### 1. 研究開始当初の背景

日本人の死亡原因の上位を占める急性腎障害(AKI: Acute Kidney Injury)、急性心筋梗塞、脳梗塞などの虚血性疾患は酸化ストレスが重要な基盤病態と考えられている。ところが、現在の臨床現場では、酸化ストレスを定量的に測定するツールが存在しないことからこれら疾患の早期診断や予防対策を講じることが不可能である。AKIは重症例の死亡率が50%を上回る予後不良の疾患で、現在は古典的な血清クレアチニンにより診断されている。クレアチニンは腎不全が完成して2~3日後にようやく変化が現れる遅い指標でAKIの治療開始には手遅れとなってしまうことが予後改善の障壁となっている。申請者らはこれまでレドックス制御蛋白チオレドキシシン(TRX)の血中濃度が心筋梗塞や心不全などの酸化ストレスや虚血性疾患において上昇し、疾患の活動性や予後と相関することから酸化ストレスマーカーとしての有用性を発見・報告してきた。尿中のTRXについては報告例がなかったため、平成22年度に採択された挑戦的萌芽研究課題「新規尿検査としての尿中エキソゾーム分画中腎症マーカー蛋白の検出」において検討したところ、尿中TRXはAKIで特異的に高値を示すことが分かってきた。

### 2. 研究の目的

本研究ではこれまで研究代表者らが発見したAKIでの尿中TRXの上昇という生体レドックス反応を応用発展させ、酸化ストレスに特異的でリアルタイムに動き、簡便でベッドサイドで利用可能な新規の迅速レドックス診断法を開発し、虚血・酸化ストレス関連疾患の早期診断や危険因子の早期発見・予防により、上記の虚血性疾患の死亡率改善のためのツール開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

これまでTRXが酸化ストレス関連疾患で上昇するという報告は多数あるが感度、特異度、定量性、カットオフ値を正確に調べた報告が無い。現在、TRXの測定は市販のELISAキットを用いて行っているため測定に8時間程度かかっており、手技が多く、測定に大型のプレートリーダーが必要なため、専門の検査室で、専門の検査技師が分析を行う必要がある。しかしながら、小規模病院や診療所、地方の医療機関ではスペース、導入コスト、雇用の点から、検査を外部の専門業者へ委託することが多く、検体搬送の時間なども含め結果が得られるまでに1-2日を要してしまう。このため超早期に上昇する酸化ストレスマーカーというTRXの特徴を生かせないことが危惧される。そこで今回の研究期間では、尿中TRX上昇の虚血・酸化ストレス特異性と定量性を

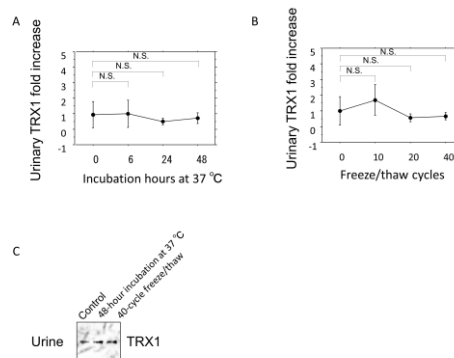
確認しカットオフ値を決定する。レドックス生体応答反応を利用した新規の迅速酸化ストレス診断法を開発する。の二点に焦点を絞り研究開発を行った。

### 4. 研究成果

#### <尿中TRXの測定安定性>

様々な保存状態の臨床検体での測定を想定して試料の分解変性について調べた。尿サンプル、血液サンプル、リコンビナントチオレドキシシンを48時間37°Cで加温したり、凍結融解を40回繰り返して尿中TRXが検出感度以上に存在するかどうかをELISAとWestern blotで測定した。尿中TRXは長時間加温(図1A)や凍結融解処理(図1B)をしなかった比較試料とほぼ同じ濃度で検出され、Western blotでスミアを引くことなく、シングルバンドとして検出された(図1C)。

図1



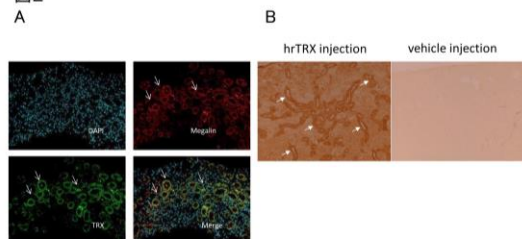
また臨床現場での尿検体は、赤血球や白血球、上皮細胞、細菌などいろいろな沈殿物(尿沈渣)を含み、これらの細胞質の中には多くのTRXが含まれることが報告されている。これらの沈殿物が測定値に影響を及ぼす可能性があるため尿沈渣が測定に与える影響を調べた。遠心により沈渣を取り除いた尿中TRX濃度は、遠心せずに測定した尿中TRX濃度とよく一致した( $r=0.975$ ,  $p<0.0001$ )。また臨床現場の尿検体はpHがバラついており、TRX自身が酸化還元に関与する分子であるためpHのバラつきが測定値に影響を及ぼすことが懸念される。このためpHが尿中TRX測定に及ぼす影響を調べた。その結果、pH5からpH8までの生理的なpHの変動範囲内では尿中TRXの測定値は安定していた。pH4や9、10といった非生理的状況下でのみ測定値がpH7.4で測定した基準値より高く逸れた。これらのデータから、尿中TRXは糖尿症、糖尿、酸性尿症などの場合にも安定に測定出来ることが分かった。

### <尿中 TRX の由来>

血清アルブミン (66.6 kDa) の一部は尿細管の megalin により再吸収されることが知られている。血中の TRX は 12 kDa であることから糸球体でろ過され得るサイズであり、健康な腎臓では megalin により再吸収される可能性が高い。このため血清中の TRX が尿細管で再吸収される可能性について実験を行った。megalin と TRX の蛍光二重染色を行った結果、megalin と TRX は同一の尿細管に染色を認め、両者が同一局在を示すことが観察された (図 2A)。

さらにマウスにヒトリコンビナントチオレドキシシ (hrTRX) を静脈内注射し、マウス TRX と交差認識しない抗ヒトモノクローナル抗体で腎の免疫組織染色を行った。Vehicle 投与マウスの腎を同じ抗体で染色した標本と比較して、静脈投与したヒト TRX がマウス腎尿細管に沿って観察された (図 2B)。以上の結果から定常状態では血中の TRX は糸球体でろ過され、megalin により尿細管に再吸収されることが示唆された。

図2



次に AKI の際に増加する尿中 TRX の由来を調べるため虚血・再循環操作を行ったマウスの腎臓で TRX の免疫染色を行った。正常対照マウスでは尿細管上皮細胞の細胞質にびまん性かつ均質に染色を認めたのに対し、虚血再循環操作を加えて経時的に観察すると、虚血 15 分より、尿細管上皮細胞の TRX の染色性が低下し、尿細管の刷子縁付近、や尿管腔内に強く染色を認めた。腎での TRX の染色が陽性の尿細管は酸化ストレスマーカー 8-OHdG の染色も陽性で両者の局在が一致していた。TRX スーパーファミリーに属するレドックス制御タンパクであるグルタレドキシシ (GRX) も同様に染色したが GRX は虚血再循環による局在の変化は見られなかった。Western Blotting 法を用い、虚血再循環モデルマウスで腎実質の TRX タンパク量を定量した結果、腎実質の TRX タンパク量は虚血再循環によって減少することが観察された。さらに尿中 TRX

は虚血再灌流の 6 時間後から増加し 12 時間後にピークに達し、その後虚血前のレベルまで減少することを観察した。血中 TRX は連動した動きを示さなかった。腎組織での in situ hybridization、Northern Blotting にて TRX mRNA は局在も発現量も変化しなかった。これらの結果から、定常状態下で糸球体でろ過され megalin を介して再吸収されたり、尿細管で合成された TRX が腎障害の際に酸化ストレスに応じて皮質部近位尿細管細胞から分泌され尿中に検出される可能性が高いと考えられた。

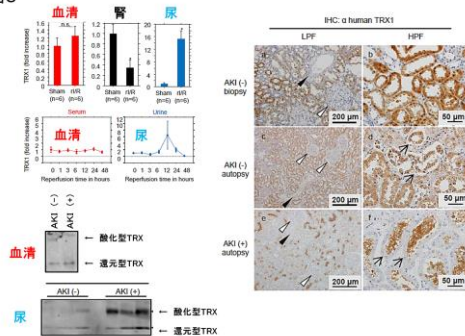
### <酸化型/還元型 TRX と尿中 TRX 由来>

TRX タンパクの活性中心には 2 つのシステイン残基があり、そのシステイン残基間の dithiol/disulfide 交換反応により基質タンパクのコンフォメーションを制御する。dithiol/disulfide 交換反応で酸化された TRX は TRX 還元酵素により再び還元型となる。細胞が酸化ストレスを受け TRX を還元する能力を失うと酸化された TRX は分子間 disulfide 結合を形成し多量体 (酸化型 TRX) となって細胞外へ放出される。

腎障害の際に上昇する尿中 TRX が還元型か酸化型かを調べるために虚血再灌流モデルマウスや AKI 患者の血清と尿を Native Western Blot で観察した。マウス虚血再灌流モデルマウスの尿とヒト腎障害の尿も同様に酸化型 TRX の増加が認められたが、血中 TRX は酸化型の増加を認めなかった。この実験結果から TRX の還元型から酸化型への変化は尿中 TRX に特異的な現象であり、血清 TRX では見られないことが分かった。

尚、コントロールとして用いたリコンビナント TRX+還元剤 DTT はさらに下方にもバンドが検出され、リコンビナント TRX+酸化剤 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ではさらに上方にもバンドが検出されるためここで言う酸化型/還元型は血中 TRX から見た相対的な酸化/還元状態を意味する。

図3

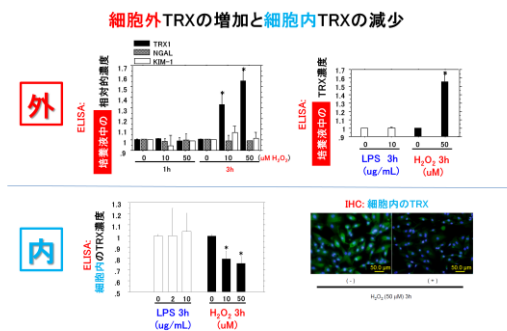


AKIの際に血中と尿中でTRXの酸化型/還元型の割合が同じならば尿中TRXの上昇はmegalin再吸収メカニズムの破綻による血中からの尿への漏出が要因と考えられるが、TRXの酸化型/還元型の割合が血中と尿中で異なることからmegalin再吸収メカニズムの破綻ではなく酸化ストレスを受けた尿細管からの分泌が主要要因であると考えられた。

#### <尿中TRXの酸化ストレス特異性>

尿中のTRX酸化ストレス特異性を調べるため、培養尿細管細胞に過酸化水素水やリポポリサッカライドを加えて培養液中と細胞内のTRX、AKIマーカーであるNGAL、KIM-1をELISAと免疫染色にて測定した。培養液中のTRXは過酸化水素水の添加により用量依存的にTRXの上昇を認め、リポポリサッカライドの添加では上昇を認めなかった。NGAL、KIM-1は過酸化水素水の添加による上昇を認めなかった(図4外)。逆に、細胞内のTRXは過酸化水素水の添加により用量依存的に減少した(図4内)。TRX mRNAは過酸化水素水の添加により12時間までは変化がなかった。以上の結果から12時間以内に起こる培養液中のTRXの上昇はmRNAの合成を介さない酸化ストレス特異的な刺激による尿細管細胞からの分泌であることが示唆された。

図4 ヒト近位尿細管細胞に酸化ストレスを加えた時の



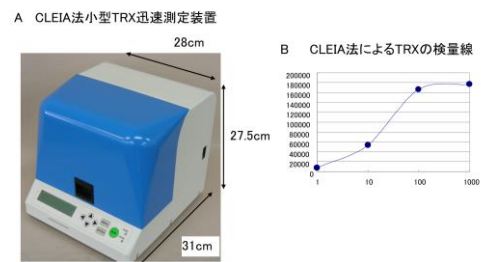
これらの結果を統合すると血中TRXは健康正常状態下では糸球体ろ過され、megalinにより再吸収され尿細管細胞内に蓄えられており、腎障害時には酸化ストレスにより酸化型TRXとして細胞外(尿中)に分泌され尿中に増加すると考えられた。

#### <迅速測定システムの開発>

新規の迅速レドックス診断法として、アルカリフォスファターゼ(ALP)標識抗TRX抗体とビオチン標識抗TRX抗体を用いたサンドイッチアッセイによって固相フィルター上にTRX抗原をトラップする化学発光酵素免疫測

定法を用いた新たな測定システムを東洋紡株式会社と共同開発した(図5A)。ALPの基質である発光基質を固相フィルターに添加することによって得られる発光シグナルを光電子倍增管(PMT)を用いて検出し、予め得られた検量線と比較することによって、TRX量を算出することが出来た。これまで8時間かかっていた測定が迅速アッセイ法により15分程度で測定が出来た(図5B)。

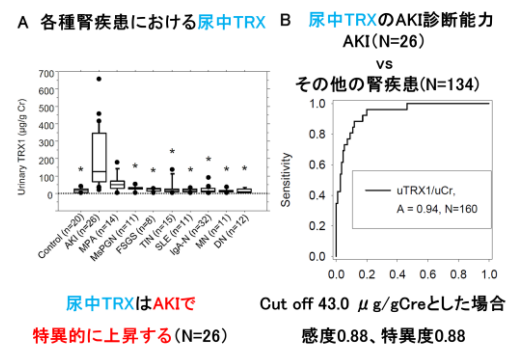
図5



#### <カットオフ値の設定>

尿中TRXを正常健康人、AKI、顕微鏡的多発血管炎、メサングウム増殖性腎炎、巣状糸球体硬化症、間質性腎炎、ループス腎炎、IgA腎症、膜性腎症、糖尿病性腎症の患者で測定したところ尿中TRXはAKIで有意に上昇していた(図6A)。尿中TRXを用いてAKIとAKI以外の腎疾患を鑑別する診断能力は、カットオフ値43.0 μg/gCreにてROC曲線下面積は0.94(95%信頼区間0.90-0.98)、感度0.88、特異度0.88とNgal、KIM-1、L-FABPと同等に優れていることが分かった(図6B)。

図6



今後、このレドックス迅速診断システムを用いたAKIを含む虚血・酸化ストレス性疾患の病態解明と病態特異的治療法の開発により、これらの疾患の予後改善が期待される。

## 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)

「主な発表論文等」

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Tobino K, Muso E, Iwasaki Y, Yonemoto S, Kasuno K, Tsukamoto T, Nakamura H, Tomino Y. Gender- and disease-specific urinary thioredoxin in chronic kidney disease patients with or without type 2 diabetic nephropathy. *Nephrology* (Carlton) 20:368-374, 2015 査読有  
doi: 10.1111/nep.12403.
2. Kasuno K, Shirakawa K, Yoshida H, Mori K, Kimura H, Takahashi N, Nobukawa Y, Shigemi K, Tanabe S, Yamada N, Koshiji T, Nogaki F, Kusano H, Ono T, Uno K, Nakamura H, Yodoi J, Muso E, Iwano M. Renal redox dysregulation in AKI: application for oxidative stress marker of AKI. *Am J Physiol Renal Physiol*. 307:F1342-1351, 2014 査読有  
doi: 10.1152/ajprenal.00381.2013.
3. Kimura H, Mikami D, Kamiyama K, Sugimoto H, Kasuno K, Takahashi N, Yoshida H, Iwano M. Telmisartan, a possible PPAR- $\delta$  agonist, reduces TNF- $\alpha$ -stimulated VEGF-C production by inhibiting the p38MAPK/HSP27 pathway in human proximal renal tubular cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 454:320-7. 査読有  
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.077.
4. Mikami D, Kimura H, Kamiyama K, Torii K, Kasuno K, Takahashi N, Yoshida H, Iwano M. Telmisartan activates endogenous peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta$  and may have anti-fibrotic effects in human mesangial cells. *Hypertens Res*. 2014 37:422-31. 査読有  
doi: 10.1038/hr.2013.157.

[学会発表] (計 3 件)

1. 糟野健司 腎不全の診療トピックス 第 65 回 (平成 27 年) 北陸支部生涯教育講演会 (招待講演) 2015.6.21 吉田郡
2. 糟野健司 新規尿中バイオマーカー 第 58 回 (平成 27 年) 日本腎臓学会学術総会 (招待講演) 2015.6.5 名古屋市
3. 糟野健司 レドックス生体応答を利用した酸化ストレス特異的 AKI 迅速診断法の開発 第 10 回腎と循環くずりゅうセミナー (招待講演) 2014.10.29 福井市

[図書] (計 1 件)

1. 糟野健司 レドックス UPDATE (医学のあゆみ別冊) 医歯薬出版 2015.6 発行

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://jinnai.labos.ac/ja>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

糟野 健司 (KASUNO, Kenji)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号: 60455243

(2) 研究分担者

岩野 正之 (IWANO, Masayuki)

福井大学・医学部・教授

研究者番号: 20275324

木村 秀樹 (KIMURA, Hideki)

福井大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 20283137

高橋 直生 (TKAHASHI, Naoki)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30377460

中村 肇 (NAKAMURA, Hajime)

公益財団法人田附興風会・医学研究所第 8 研究部・研究員

研究者番号: 70303914