

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659062

研究課題名(和文)尿毒症物質とバイオマーカー探索におけるジレンマの解消

研究課題名(英文)Biomarkers for ischemia and renal failure

研究代表者

阿部 高明 (ABE, Takaaki)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：80292209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：網羅的一斉メタボローム解析の発展はバイオマーカー探索概念のパラダイムシフトをおこし、有望な新しい候補分子の発見が相次いでいる。メタボローム解析は高く多数のサンプルを処理できず多数の臨床サンプルを用いた大規模な検証実験や実用化には向かない。そこで本研究では慢性腎不全患者のメタボローム解析から見いだした1-メチルアデノシンの高感度ELISA系を立ち上げた。1-メチルアデノシンの測定は早期に腎機能のダメージを検出できること、また一般住民1000名の測定から血中濃度が高い一般住民7年後には死亡率が約7倍も高い事が確認され生命予後のマーカーでもあることが明らかとなり新たなバイオマーカーと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Tissue damage by oxidative stress is a key pathogenic mechanism in various diseases including acute kidney injury and chronic kidney disease. Its early detection is important. Using a tRNA-specific modified nucleoside 1-methyladenosine (m1A) antibody, we demonstrate oxidative stress induces direct conformational change in tRNA structure and the change promotes subsequent tRNA fragmentation. Such tRNA changes occur much earlier than DNA damage. By various types of tissue damage model (ischemic reperfusion, toxic injury), the circulating tRNA-derivative levels are increased and the increase is more rapid than the known damage markers. In humans, the circulating tRNA-derivatives also increase under renal ischemia conditions. It also correlates with mortality in the general population (n=1,033 for 6.7 year follow up). Therefore, tRNA damage reflects early oxidative stress damage and its detection is a useful tool for identifying organ damages and forming a clinical prognosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：1-メチルアデノシン 修飾核酸 急性虚血 腎機能障害 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

近年、増加の一途をたどる透析導入患者は医療費増加の大きな原因となり臨床においては新たな尿毒症物質排泄システムの構築と腎不全進行阻止が緊急課題となっている。透析も炎症を惹起するが、慢性炎症という形で片付けられており、その本態は突き詰められておらず、また治療法はない。

創傷過程では自身の細胞損傷によって、自然免疫を活性化する内在性の「ダメージ」関連分子が放出される。敗血症に似た全身性炎症反応症候群 (SIRS) では自然免疫細胞が活性化されている。また心筋や腎臓の虚血/再灌流傷害の形成や虚血性腸疾患では炎症性サイトカイン TNF- α が NF- κ B の活性化を介して接着因子やケモカインが発現し、炎症細胞浸潤を誘導して再灌流時の臓器障害を形成していることが知られていた。さらに虚血状態が起こるとまずミトコンドリアが、次に解糖系が障害を受ける。ミトコンドリア呼吸鎖における重要な酵素であるチトクローム c の細胞質への漏出はアポトーシスにおいて重要な役割を果たしている。近年、tRNA がミトコンドリアダメージの際に放出されたチトクローム c と直接結合してチトクローム c が apaf1 と結合してカスパーゼ活性化のアポトーシスの経路を阻害することが知られてきた。しかしこの tRNA の cytochrome c 結合のメカニズムやその制御のメカニズムについては殆ど知られてなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では我々が慢性腎不全患者のメタボローム解析から見いだした腎不全時に蓄積する尿毒症物質 1-メチルアデノシンに対する特異抗体や MS 測定系を立ち上げ大量解析を行いプロテオーム情報と臨床を結びつける新たな診断方法確立を目指した。

3. 研究の方法

試薬

(1) マウスモノクローナル抗 m1A 抗体 (クローン名, AMA-2, IgG サブクラス, 2b) は申請者のグループと静岡県立大学で樹立した (特願 2011-184506)。

(2) 抗体を用いたノーザンブロッティング
抽出後 DDW に溶解した total RNA を等量の 2x サンプルバッファー (90mM Tris, 90mM ホウ酸, 8M 尿素, 2mM EDTA, 10%スクロース, 0.05%プロモフェノールブルー、0.05%キシレンシアノール) と混合し 65 °C で 10 分間加熱後、氷上で 2 分間静置した。その後、サンプルは 8M 尿素 12%ポリアクリルアミド変性ゲルにて 0.5xTBE バッファー (45mM Tris, 45mM ホウ酸, 1mM EDTA) 内で泳動を行った。泳動条件は 250V で 35-40 分間行った。転写はセミドライ法にて行い、ブロッティングバッファーとして 0.5xTBE バッファーを使用し、ナイロンメンブレン (Hybond N+, GE

healthcare) に転写した。その後、UV クロスリンカー (Stratagene) を用いて 1200J の UV 照射にてメンブレンと RNA をクロスリンクした。ブロッキング液として TBS-T (20mM Tris pH7.6, 140mM NaCl, Tween-20 0.05%) に 3% ブロックエース (DS ファーマ) を加えたものを使用して室温で 30 分間ブロッキングした。一次抗体として抗 m1A 抗体を Can get signal 1 (Toyobo) で 200 倍希釈し 4 °C で一晩反応させた。二次抗体は anti-mouse IgG-HRP-conjugated secondary antibody (Pierce) を Can get signal 2 (Toyobo) で 1000 倍希釈して 4 °C で一晩反応させた。発色は ECL Plus (GE healthcare) を用い、LAS-4000mini (Fujifilm) にて撮影を行った。

(3) tRNA の免疫沈降法

免疫沈降には、PBS で平衡化した Protein G アガロースビーズ (GE healthcare) 10 μ l と抗 m1A 抗体 1mg を detergent バッファー 300 μ l (50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, TritonX-100 1%) に加え、室温で 1 時間回転培養を行った。コントロール群としては、抗体の代わりに等量の正常マウス IgG (Abcam) を使用した群を用いた。抗体と結合させたビーズは detergent バッファーで洗浄後、refold-もしくは unfolded- tRNA 5 μ g と免疫沈降バッファー 300 μ l (50mM Tris-HCl pH7.5, 130mM NaCl, 10mM MgCl₂, 0.05% NP-40) を加え、室温で 1 時間回転培養を行った。その後、免疫沈降バッファーで 3 回洗浄を行い残ビーズ 10 μ l に Tripure 500 μ l と クロロホルム 100 μ l を加え、RNeasy を用いて免疫沈降された RNA を抽出した。

(4) 抗 m1A 抗体を用いた ELISA による tRNA 由来物の測定

構成成分として m1A を含む血中 tRNA 由来物の測定は抗 m1A 抗体を用いた ELISA で測定した。測定する血漿サンプルは前処理として、フィルターユニット (Amicon Ultra4 -50K, Millipore) を用いて 4 °C、7,500 xg、90 分間遠心分離して限外濾過を行った。m1A-ウシ血清アルブミン (BSA) conjugate 溶液 (m1A として 125 ng/ml) を、96 ウェルプレート (Corning) に各ウェルあたり 50 μ l を加え、4 °C で一晩放置し固相化した。溶液を除いた後 PBS+1% BSA を各ウェルあたり 100 μ l 加え、37 °C で 1 時間ブロッキングを行った。溶液を除去後、m1A 標準品溶液 (Sigma) (500 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 1 ng/ml) または測定検体を各ウェルあたり 25 μ l 加えた。さらに抗 m1A 抗体溶液 (20 ng/ml) を各ウェルあたり 25 μ l 加え、4 °C で 1 時間反応させた。反応終了後、PBS+0.05% Tween20 を 1 ウェルあたり 120 μ l 加えて、プレートミキサー (Micro plate mixer MPX-96, Scinics) を用いて 1 分間振盪した後に溶液を除く操作を 5 回行った。PBS+0.05% Tween20 にて 500 倍希釈したアルカリホスファターゼ

標識 rabbit anti-mouse IgG Fc(Jackson Immuno Research) を1ウェルあたり 50 μ l 加え、37、1時間反応させた。再度ウェルを上記と同様の手順で洗浄した後、基質として p-ニトロフェニルリン酸(Sigma)を1mg/ml で含む1M ジエタノールアミン緩衝液(pH 9.8)を1ウェルあたり 50 μ l 加えた。発色は37 で15分行い、405nmにおける吸光度を Model 680 Microplate Reader (Bio-rad)を用いて測定した。

(5)動物実験およびヒトに関する実験

全ての動物実験は東北大学動物実験センターの承認を受け、東北大学における動物実験等に関する規程を遵守し行った。ヒトに関する実験は東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認の基に行われた。

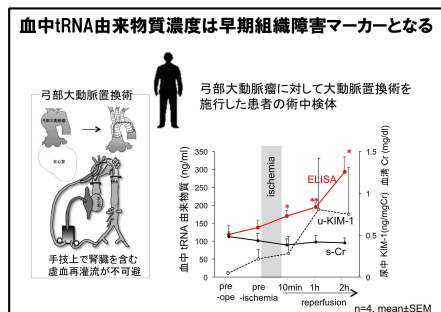
4. 研究成果

多くの物質が水溶性の低分子(分子量500Da以下)であるため特異的抗体作製は容易では無いが、m1Aに対するモノクローナル抗体はKHLコンジュゲートしたm1Aを用いて作製された。作製された抗体はm1Aに特異的で他の修飾核酸である6-ethyladenosine、1-methylinosine、1-methylguanosine、2-methylguanosine、7-methylguanosineとは反応せずこの抗体は1位のメチル基と6位のアミノ基を認識することが明らかになった。また我々の開発したELISA法は競合法である。この方法は直接吸着法における微量タンパク質の定量性の低さを改善し、抗原に対して一種類の抗体で高感度に検出できる方法であるが、LC-MSでの測定に比較して特異度は申し分なかった。

組織障害時において血中に存在するtRNA由来物質の濃度の変化を検討した。腎虚血再灌流障害モデル(ラット、ブタ)、シスプラチン腎障害モデル、組織障害では血中tRNA由来物質の濃度が上昇することが明らかとなった。虚血再灌流組織を用いたm1A抗体による免疫染色の検討から、虚血組織障害時に生じる細胞内tRNAの立体構造の変化はtRNAの分解やDNAの断片化(TUNEL染色)など既存の組織障害ステップよりも早期の段階に起きていることを明らかにした。

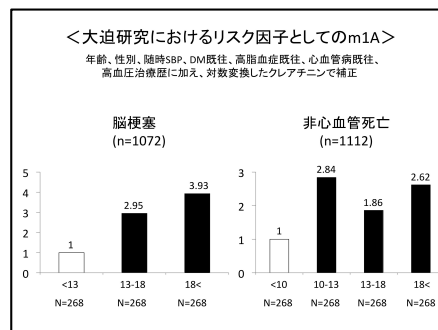
ヒト心臓外科患者術検体を用いた検討

ヒトにおける組織障害と血中tRNA由来物質濃度の関係について検討した。心臓血管外科において、体外補助循環を用いて大動脈弓部置換術を施行した患者の術中検体をサンプルとした。その結果、ELISAで検知しうる血中tRNA由来物質濃度の増加は、再灌流後早期に濃度上昇を認め、またその増加は現在早期腎不全マーカーといわれている尿中KIM-1の増加よりも早期に認めた。一方、血清クレアチンは測定した術中には濃度変化を認めなかった。



一般住民コホート1100人における血中m1A濃度と予後の関係

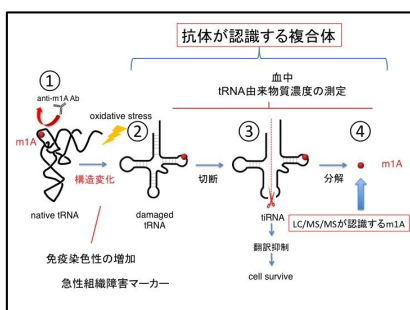
以上の組織障害時に血中tRNA由来物質が上昇するというデータを踏まえ、慢性的に血中tRNA由来物質濃度が高い人は酸化ストレスや組織障害が存在しており予後が悪いのではないかという仮説を考えた。この仮説を検証するため一般住民1100人を対象とした大迫地域(現岩手県花巻市)のコホート研究調査において採取した血液の血清中m1A濃度を測定し、予後との関係について検討した。その結果、m1A血中濃度が高い一般住民7年後には血圧や腎機能、その他の要因に関係なく死亡率が約7倍も高い事が確認され、m1Aは生命予後のマーカーでもあることが明らかとなった。



細胞障害時には

- 1, 酸化ストレスにより細胞内tRNAの高次構造が変化すること。
- 2, 構造変化が起きると抗体がアクセスできるようになり染色性、認識性が出現する
- 3, 構造変化が起き傷んだtRNAはRNA酵素により切断されその断片が転写を抑制して細胞の保護を図る
- 4, RNA酵素により切断されたtRNAはさらに分解酵素で1つの核酸にまで分解される。この分解された1つの核酸としてのm1Aが尿に出てくる。またLC/MS/MSではこれのみを測定している。すなわち抗m1A抗体では認識できるがLC/MS/MSの測定系では検知していないものとしてはtiRNA以外にもモノヌクレオシドまで分解が完了してないオリゴヌクレオシド状態のRNAや、リン酸が結合したままの「ヌクレオチド」の状態のm1A、またはタンパク質と結合してフリーの状態ではないm1Aなどが挙げら

れ、このようなtRNA由来物質も血中に存在して障害時に増加していると考えられる



我々は虚血性傷害の病態において組織細胞障害によるtRNAの変性・分解により修飾核酸の細胞外への逸脱が惹起されている普遍的な概念を見いだした。またその血中・尿中濃度は組織障害を早期に検知する新規バイオマーカーとして非常に有用である。

申請したアイデアならびに抗体は我々が独自に開発したものであり、ハイブリドーマは既に特許生物寄託センターに寄託されており東北大学と静岡県立大学と共同で特許申請済みである(特願2011-184506)。

本研究により高感度ELISA系が立ち上げられ、心臓血管外科手術において早期に腎機能のダメージを検出できること、また一般住民のコホート研究から血中濃度が高い一般住民7年後には血圧や腎機能、その他の要因に関係なく死亡率が約7倍も高い事が確認され生命予後のマーカーでもあることが明らかとなったことは本研究の目標が達成されたと考えられる。さらに今後日本発の新たなバイオマーカーと測定系の創出という新たな診断技術の創出につながると考えられた

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3件)

- Mishima E., Inoue C., Saigusa D., Inoue R., Ito K., Ito S., Tomioka Y., Itoh K. and Abe T. Conformational Change in tRNA is an Early Indicator of Acute Cellular Damage with Prognostic Significance. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014 May 15. pii: ASN. 2013091001. [Epub ahead of print](査読有り)
- Akiyama Y., Kikuchi K., Saigusa D., Suzuki T., Takeuchi Y., Mishima E., Yamamoto Y., Ishida A., Sugawara D., Shima H., Toyohara T., Suzuki C., Souma T., Moriguchi T., Tomioka Y., Ito S. and Abe T. Indoxyl sulfate down-regulates SLC4C1 transporter through up-regulation of GATA. *Plos One* 8: e66518, 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0066518.(査読有り)

- Hurd TW, Edgar A. Otto EA, Mishima E, Gee HY, Inoue H., Inazu M., Yamada H., Halbritter J., Seki, G., Konishi M., Zhou W., Yamane T., Murakami S., Caridi G., Ghiggeri G., Abe T., and Hildebrandt F. Mutation of the Mg²⁺ Transporter SLC41A1 Results in a Nephronophthisis-Like Phenotype. *J. Am. Soc. Nephrol.* 24: 967-977, 2013 doi: 10.1681/ASN.2012101034 (査読有り)

[学会発表](計4件)

- 秋山 泰利
CE-MS を用いた透析患者の病態に特有な尿毒症物質の同定
第56回日本腎臓学会学術総会
2013年05月12日
東京国際フォーラム
- 佐原 利人
エリスロポエチン産生を増強させる化合物群の探索と同定(その1)
第56回日本腎臓学会学術総会
2013年05月12日
東京国際フォーラム
- 鈴木 雄介
エリスロポエチン産生を増強させる化合物群の探索と同定(その2)
第56回日本腎臓学会学術総会
2013年05月12日
東京国際フォーラム
- 三島 英換
tRNAの挙動検知はDNAダメージよりも早期の虚血組織障害マーカーとなる
第56回日本腎臓学会学術総会
2013年05月10日
東京国際フォーラム

[産業財産権]

出願状況(計2件)
名称: 腎機能障害の予防又は改善剤
発明者: 阿部 高明
権利者: 同上
種類: 特許、
番号: 2013-209539
出願年月日: 2013年10月04日
国内外の別: 国内

名称: エリスロポエチン産生促進剤
発明者: 阿部 高明
権利者: 同上
種類: 特許、
番号: JP2013/006916
出願年月日: 2013年11月25日
国内外の別: 外国

[その他]

ホームページ等
<http://plaza.umin.ac.jp/~takaabe/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

阿部 高明 (ABE, TAKAAKI)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号：80292209