

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659414

研究課題名(和文)尿バイオマーカーによるネフロン障害部位診断法の開発

研究課題名(英文)Detection of injured nephron segments using brand-new urinary biomarkers

研究代表者

藤中 秀彦(FUJINAKA, HIDEHIKO)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：20447642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：尿蛋白質のうち血漿に由来しないものを選定し、ネフロン障害部位診断のバイオマーカーとすることを目的に検討した。ヒト尿プロテオームデータベースに免疫染色(the Human Protein Atlas)と腎臓マイクロアレイの情報を組み合わせることにより、50個の近位尿細管由来蛋白質、14個の遠位尿細管由来蛋白質、10個以上の既知および未知の糸球体由来蛋白質、間質由来蛋白質をリストアップできた。なかでも遠位尿細管特異的に発現するCa結合蛋白質(CALB1)は、ラットにおいて腎内発現と尿中排泄が遠位尿細管傷害に伴い減少、ヒトでも同様の傾向が確認できた。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study is to discover urinary biomarkers which identify the kidney injured sites as distal or proximal tubules, glomeruli, and interstitium. The proteome-transcriptome-combined database was completed with 3 databases; the Human Protein Atlas (immunohistochemistry), the microarray database of human kidney, and the urinary proteome database. As a result, 14 proteins were defined as distal originated urinary proteins, and 50 proteins were proximal. In rat UUO kidneys, mRNA expressions of 8 of 14 distal proteins such as ANXA3 were up-regulated while 3 of 14 distal proteins such as CALB1 were down-regulated. Urinary CALB1 were shown reduced in anti-GBM GN rats with significant distal tubule cells injury, and in some IgA nephropathy patients with tubulointerstitial injury. Our proteome-transcriptome-combined database may be a good tool to discover new urinary biomarkers which identify the injured sites as distal or proximal tubules.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：遠位尿細管 近位尿細管 Calbindin 1 the human protein atlas microarray Western blotting

1. 研究開始当初の背景

尿バイオマーカーとして近年注目されている一つに尿中NGALがある。これが急性腎障害の際に血清クレアチニン上昇に先立ち上昇し、また治療後に尿中β2MGやNAGより早く低下するという報告もある。ただ尿中NGALは必ずしも障害された腎臓内の特定のネフロン部位に由来するものでないし、腎臓局所で生理的に重要な作用を有しているわけでもない。尿中NGALには血漿由来のものも含まれるし、またNGALは通常、腎臓では主に近位尿細管細胞で産生されるが、障害時にはヘンレ上行脚や遠位尿細管、集合管に発現が誘導されることが動物実験で示されている(Nature Med, 2011)。

尿中NGALは何らかの急性腎障害発生を検知するバイオマーカーとしては有用だが、ネフロン障害の部位や程度を特定する目的には別のバイオマーカーも探索されるべきであると考えた。我々は理想の尿バイオマーカーとして、その尿中排泄動態を見ることにより、腎臓内の特定のネフロン部位の状態が分かること、および特定の機能障害が推察できることとして、そのようなバイオマーカー候補を複数リストアップできることを目的にした。

2. 研究の目的

新たな尿バイオマーカーを、血漿に由来しない、腎臓内での機能が既知の蛋白質であり、かつ腎臓内の特定のネフロン部位の細胞と確定できたものの中から複数選定することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 腎臓に由来する尿蛋白質のヒト腎臓内発現部位の決定(データベース利用)
データベースはWEBで既に公開されているものを組み合わせて利用した(The human protein atlas; <http://www.proteinatlas.org/>) (The urinary proteome database; <http://www.proteinatlas.org/>) (The

microarray database; Fujinaka H et al. Nephrology (Carlton) 2010; 15: 700-709)

- (2) 各蛋白質の免疫染色(または *in situ* hybridization); 病変のあるヒト腎組織とない腎組織での比較。
- (3) ラット腎障害モデルでの確認(抗糸球体基底膜腎炎 anti-GBM GN および一側尿管尿管結紮 UUO)。
- (4) 選別された蛋白質について尿中排泄の検討(Western blotting または ELISA, RT-PCR)。

4. 研究成果

ヒト尿プロテオームデータベースに免疫染色(the Human Protein Atlas)と腎臓マイクロアレイの情報を組み合わせることにより、50個の近位尿細管由来蛋白質、14個の遠位尿細管由来蛋白質、10個以上の既知および未知の糸球体由来蛋白質、および間質由来蛋白質をリストアップできた。尿細管由来蛋白質について、腎臓内遺伝子発現をRealtime PCRで検討した。ラットにUUOを作成、近位~遠位までの尿細管全般の傷害を起こし、反対側腎臓との遺伝子発現と比較した。14個の遠位尿細管蛋白質のうち3個で遺伝子発現低下、CALB1でもっとも著明で、SLC12A1も低下していた。一方GSTM3, CAPG, ANXA3など8個の遺伝子発現は増加していた。また50個の近位尿細管蛋白質のうちFBLN5など7個の遺伝子発現が増加、ALDOBなど12個の遺伝子発現は低下していた。これらの遺伝子発現の変動はラットanti-GBM GN腎臓(糸球体腎炎に続発する尿細管障害)でもほぼ同様の傾向で確認され、また蛋白質発現についても同様に、発現尿細管部位において増加または低下することが、これらいくつかの蛋白質について免疫染色で確認された。これらのうち、遠位尿細管特異的に発現し、その傷害でもっとも著明に遺

伝子・蛋白質発現が低下した Ca 結合蛋白質 CALB1 につき検討した。anti-GBM GN ラットにおいて遠位尿細管傷害が進展するにつれて腎内発現低下が確認され、それと尿中排泄量低下が並行することが腎臓と尿の Western blotting で確認された。またこの時、尿 Ca 排泄増加も見られ、CALB1 が Ca 結合蛋白質であり、その腎臓内発現低下が Ca 尿中排泄増加を来す想定と矛盾しない結果が得られた。また、ヒト IgA 腎症患者においても、傷害された遠位尿細管における発現低下が免疫染色で確認され、さらに患者における尿中排泄にも低下の傾向が見られた。

遠位尿細管蛋白質 ANXA3 については、ラット尿中で腎障害早期に上昇が確認されたが、ヒトでは同じ傾向が確認されなかった。

近位尿細管蛋白質 FBN1, ALDOB については、ヒト腎障害における腎臓内での発現変化を尿で検知することができなかった。

間質 COL6A1 については、間質繊維化のある腎臓内での発現増加が確認され、一部の患者で尿中排泄増加が確認された。

これらを複数組み合わせることで、腎臓の全体としての状態を、尿中排泄から推察できるようになることが期待された。

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2件)

1. Fujinaka H, Iida T, Yamamoto T. The proteome-transcriptome-combined database of specific nephron segment proteins for novel urinary biomarker discovery. J Clin Nephrol Res. 2014; 1, 1014. 査読有.

<http://www.jscimedcentral.com/Nephrology/nephrology-1-1014.pdf>

2. Iida T, Fujinaka H, Xu B, Zhang Y, Magdeldin S, Nameta M, Liu Z, Yoshida Y, Yaoita E, Tomizawa S, Saito A, Yamamoto T. Decreased urinary calbindin 1 levels in proteinuric rats and humans with distal nephron segment injuries. Clin Exp Nephrol. 2014; 18, 432-443. 査読有.
doi: 10.1007/s10157-013-0835-3.

[学会発表](計6件)

1. 藤中 秀彦: "尿中 COL6A1 は腎臓間質線維化病変を反映するか" 第 57 回日本腎臓学会学術総会. (2014.07.04-2014.07.06). パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
2. 藤中 秀彦: "尿中 ANXA3 は遠位尿細管傷害を反映するか" 第 49 回日本小児腎臓病学会. (2014.06.05-2014.06.07). 秋田ビューホテル (秋田県秋田市)
3. Hidehiko Fujinaka: "The proteome-transcriptome-combined database of kidney distal tubular proteins for novel urinary biomarker discovery " The ASN Kidney Week 2013 Annual Meeting. (2013.11.07-2013.11.10). Atlanta, GA (米国)
4. 藤中 秀彦: "遠位ネフロン傷害を反映する新規尿バイオマーカー同定の試み" 第 56 回日本腎臓学会学術総会. (2013.05.10-2013.05.12). 東京国際フォーラム (東京都千代田区)
5. Hidehiko Fujinaka: "The Atlas Database of Kidney Tubular Proteins Is Refined with the Gene Expression Information for New Urinary Biomarkers Discovery" The ASN Kidney Week 2012 Annual Meeting. (2012.11.01-2012.11.04). San

Diego, CA (米国)

6. 藤中 秀彦: "免疫染色による尿細管蛋白質発現データベースの検討" 第 55 回日本腎臓学会学術総会 . (2012.06.01-2012.06.03). パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔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 :
出願年月日 :
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

藤中 秀彦 (FUJINAKA, hidehiko)
新潟大学・医歯学総合研究科・非常勤講師
研究者番号 : 20447642

(2)研究分担者

山本 格 (YAMAMOTO, tadashi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号 : 30092737