

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780287

研究課題名(和文)尿中エクソソームアクアポリン1およびアクアポリン2排泄の生理的調節機構の基礎研究

研究課題名(英文) Research of physiological regulatory mechanism on excretion of urinary exosomal aquaporin-1 and -2

研究代表者

園田 紘子 (Sonoda, Hiroko)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：60608272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は尿中エクソソームに含まれる水チャネルアクアポリン1(AQP1)およびAQP2タンパク質に関して、生理的な排泄調節機構を解明することを目的とし、ラットを用いて検討した。尿中エクソソームAQP1およびAQP2タンパク質の日内変動を検討したところ、有意な変化は見られなかった。酸性化薬および塩基性化薬による体液の酸-塩基平衡の変化は尿中エクソソームAQP1およびAQP2タンパク質排泄量が有意に変化させた。高血圧自然発症ラットにおける血圧上昇は、尿中エクソソームAQP1およびAQP2タンパク質排泄量に影響を与えなかった。本研究成果は今後の尿中エクソソームAQPの研究において重要な情報となり得る。

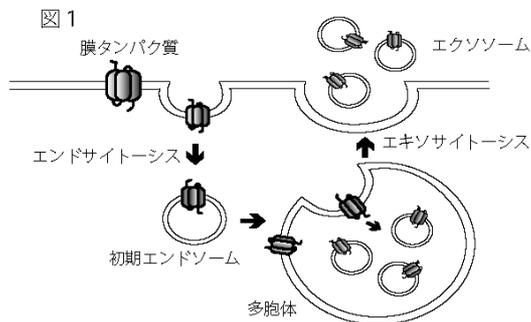
研究成果の概要(英文)：In this study, fundamental research was performed to understand the physiological regulatory mechanism on excretion of urinary exosomal water channel protein, aquaporin-1 (AQP1) and AQP2. The circadian changes of urinary exosomal AQP1 and AQP2 excretion levels were not observed in rats. In addition, it was examined whether the changes of pH in blood and urine affected the excretion levels of urinary exosomal AQP1 and AQP2 protein in rats. The administration of acidifying or alkaline agent affected urinary abundance of exosomal AQP1 and AQP2. Furthermore, the urinary exosomal AQP1 and AQP2 protein excretion levels in spontaneously hypertensive rats were evaluated. No effects of elevated blood pressure on urinary exosomal AQP1 and AQP2 protein levels were observed. These findings will give important information to studies on urinary exosomal AQPs.

研究分野：獣医薬理

キーワード：バイオマーカー エクソソーム aquaporin

## 1. 研究開始当初の背景

エクソソームは様々な細胞から分泌される直径 100 nm 以下の小胞で、血液、尿、乳汁、唾液、涙などの体液中に存在する。エクソソームの形成経路は以下のように考えられている。細胞膜がエンドサイトーシスによって細胞質内に取り込まれて初期エンドソームが形成される。初期エンドソームは輸送されて多胞体膜と融合する。さらにその多胞体膜が多胞体内に陥入して小胞として蓄えられる。そして、多胞体膜が細胞膜とエキソサイトーシスによって融合し、多胞体内のエクソソーム小胞が細胞外に放出される(図1)。



エクソソームには、細胞由来のチャネルなどの膜タンパク質や熱ショックタンパク質などの細胞質内タンパク質、さらに miRNA や mRNA が含まれている。エクソソーム排泄はエネルギー依存性の膜輸送機構によって行われるため、エクソソームタンパク質および RNA 排泄量の変化は、その由来細胞の状態を反映していることが考えられる。したがって、エクソソームに含まれるタンパク質および RNA は、特定の細胞の障害を反映した診断マーカーとして有用である可能性がある。尿は採血やバイオプシーなどと比べ患者への負担が軽く非侵襲的に得ることのできる診断材料である。以上の特徴から、尿中エクソソームタンパク質および RNA は腎疾患の非侵襲的バイオマーカーのソースとしての期待が高まっている。

水チャネルであるアクアポリン (AQP)

は、腎において近位尿細管に AQP1、7、11 が、ヘンレの下行脚に AQP1 が、集合管に AQP2、3、4、6 がそれぞれ部位特異的に発現しており、各部位で水の再吸収に参与している。これらの AQP 分子種のうち、AQP1 および AQP2 タンパク質はエクソソームに含まれて尿中に排泄されることが報告されている【Pisitkun T et al., 2004】。

急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) は、早期診断方法が確立されていないために死亡率の高い疾患である。申請者はこれまでに尿中エクソソーム AQP タンパク質に着目して、その AKI 診断マーカーとしての有用性を検討してきた。その結果、尿中エクソソーム AQP1 は虚血性 AKI における早期診断マーカーとして【Sonoda H, et al. 2009】また、AQP2 は腎毒性薬物 cisplatin 性 AKI の早期診断マーカーとして有用である可能性を示した【2010 年アメリカ腎臓学会で発表、論文準備中】。さらに、この AKI における尿中エクソソーム AQP タンパク質量の減少が腎における AQP タンパク質発現量の保持に参与する可能性も見出した。また、申請者はヒトの尿中エクソソーム中に AQP1 および AQP2 mRNA が存在することも RT-PCR 法によって明らかにしており、これらの排泄量も AKI によって影響を受ける可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

尿中エクソソーム AQP タンパク質および mRNA を診断バイオマーカーとして利用するためには、診断の科学的根拠を明確にしなければならない。しかしながら、尿中エクソソーム AQP タンパク質および mRNA 排泄の生理的調節については不明なままであるため、本研究ではこれらの点について解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

#### (1) 尿中エクソソーム AQP 排泄の日内変動

本実験では、ラットの活動が活発な暗期中および活動の弱い明期中にそれぞれ 6 時間採尿を行った。採取した尿から、尿中エクソソーム分画を段階的遠心法によって分離した。イムノプロット法および RT-PCR 法を用いて尿中エクソソーム AQP タンパク質および mRNA 排泄量をそれぞれ解析した。

#### (2) 体液の酸-塩基平衡の変化による尿中エクソソーム AQP 排泄への影響

酸化薬である塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2 mmol/rat, p.o.) および塩基性化薬である炭酸水素ナトリウム ( $\text{NaHCO}_3$ , 3 mmol/rat p.o.) を用いて、血液、尿を酸性化あるいは塩基性化したラットモデルを作製した。コントロールラットには同量の生理食塩水を投与した。それぞれのラットから 2 時間の蓄尿を行い、採尿直後に腎を摘出した。採取した尿から、尿中エクソソーム分画を段階的遠心法によって分離した。イムノプロット法を用いて尿中エクソソーム AQP タンパク質を解析した。また、血中抗利尿ホルモン (AVP) については ELISA キットを用いて測定した。AVP 受容体拮抗薬投与実験では pH 変化薬投与 15 分前に OPC-31260 (10mg/kg, s.c.) を投与した。

#### (3) 血圧の変化による尿中エクソソーム AQP タンパク質排泄への影響

高血圧自然発症ラット (SHR ラット) および遺伝的コントロールである WKY ラットを用いて解析した。3 週齢から 7 週齢にかけて非観血的血圧計を用いて血圧をモニターしながら、経時的に採血・採尿を行った。また、高血圧は腎障害のリスクの一つであるため、腎機能については血中クレアチニン濃度によって評価した。

採取した尿から、尿中エクソソーム分画

を段階的遠心法によって分離した。イムノプロット法を用いて尿中エクソソーム AQP タンパク質排泄量を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 尿中エクソソーム AQP 排泄の日内変動

ラットの活動期にあたる暗期では、明期と比較して尿中エクソソーム AQP1 の排泄量が約半分の量であったが、有意性はみられなかったため今後例数を増やして検討して見る必要がある。一方、尿中エクソソーム AQP2 排泄量は明期と暗期で変化は認められなかった。申請者のこれまでの研究で AQP1 タンパク質の尿中排泄量の減少によって腎での AQP1 タンパク質発現量が保持されることが示唆されている。したがって、活動期の腎では AQP1 タンパク質排泄量を減少させることで尿管上皮細胞での AQP1 タンパク質発現量を保持する傾向があることが考えられた。

段階的遠心法によって得た尿エクソソーム分画から QIAGEN 社の RNA 分離キットを用いて、エクソソーム RNA を抽出した。その結果、平均約 63 ng (n = 4) の total RNA が抽出された。その後、逆転写処理を行い、AQP1 および AQP2 の全長を増幅するプライマーを用いて PCR を行った。しかしながら、どちらも増幅がみられず、ラットの尿中エクソソーム RNA 中には全長の AQP1 および AQP2 の全長 mRNA は含まれないことが示唆された。しかしながら、尿中エクソソーム RNA 自体は一定量抽出できたことから、断片的な mRNA が存在する可能性がある。また、尿中エクソソーム中には micro RNA が存在することも知られているため、これらの分子について今後検討していく必要がある。

以上のようにラットの尿中エクソソーム中に全長の AQP1 および AQP2 の mRNA

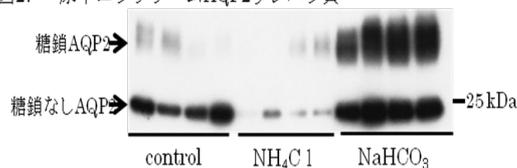
が存在しなかったため、以降の実験ではタンパク質に主軸をおいて検討を行った。

## (2) 体液の酸-塩基平衡の変化による尿中エクソソーム AQP 排泄への影響

pH 変化薬投与後 2 時間の血中 pH は、コントロール群では pH 7.30 であったが、NH<sub>4</sub>Cl 投与群では pH 7.26 と酸性に、NaHCO<sub>3</sub> 投与群では pH 7.36 と塩基性にそれぞれ変化していた。投与後 2 時間蓄尿をした尿サンプルの pH については、生理食塩水投与群では pH 7.53 であったが、NH<sub>4</sub>Cl 投与群では pH 5.69 と酸性に、NaHCO<sub>3</sub> 投与群では pH 8.55 と塩基性にそれぞれ変化していた。

これらの尿における尿中エクソソーム AQP1 排泄量は、酸性化薬および塩基性化薬投与のどちらの群でもコントロール群と比較して有意な減少がみとめられた。一方、尿中エクソソーム AQP2 排泄量は、コントロール群(生理食塩水投与群)と比較して、NH<sub>4</sub>Cl 投与群では有意に減少し、その一方で NaHCO<sub>3</sub> 投与群では有意に増加していた(図 2)。このことから、体液の酸-塩基平衡が変化すると、尿中エクソソーム AQP1 および AQP2 タンパク質排泄量が変化することが示された。

図2. 尿中エクソソーム AQP2 タンパク質



AQP2 の発現量は抗利尿ホルモン (AVP) に調節されていることから、血中の AVP 濃度を測定したところ、血液 pH の変化による血中 AVP 濃度の変化はみられなかった。しかしながら、AVP 受容体拮抗薬 OPC-31260 を NH<sub>4</sub>Cl および NaHCO<sub>3</sub> と共投与したところ、尿中エクソソーム AQP2 排泄量の酸性化でみられた減少および塩基性化でみられた増加がそれぞれ一部抑制さ

れた。このことから、体液の酸-塩基平衡の変化による尿中エクソソーム AQP2 タンパク質排泄量の変化には AVP が一部関与していることが示唆された。

## (3) 血圧の変化による尿中エクソソーム AQP タンパク質排泄への影響

SHR ラットおよび遺伝的コントロールである WKY ラットを用いて、3~7 週齢にわたって、経時的に血圧を測定した。SHR ラットの収縮期血圧は 4 週齢まで WKY ラットとの差は見られなかったが、5 週齢以降で有意な上昇が認められた。平均血圧については、6 週齢以降で SHR ラットでの有意な上昇がみられた。腎機能の指標である血中クレアチニン濃度については、全ての週齢で WKY ラットと SHR ラットで有意な差はみられなかった。SHR ラットにおける尿中エクソソーム AQP1 および AQP2 タンパク質排泄量は、全週齢で WKY ラットと比較して有意な差はみられなかった。

以上の結果から、腎機能に影響しないレベルでの血圧上昇は尿中エクソソーム AQP1 および AQP2 タンパク質排泄量に影響を与えないことが示唆された。

## (4) まとめ

以上の研究成果から、尿中エクソソーム AQP1 および AQP2 タンパク質排泄の生理的調節機構についていくつかの知見が得られた。これらの知見から、AQP1 および AQP2 タンパク質の腎疾患バイオマーカーとしての有用性を検討する際の留意点として以下のことが考えられた。

尿中エクソソーム AQP1 タンパク質について

日内変動で活動期よりも休息期に排泄量が増加する可能性があるため、コントロールを設定する際は同じ時間帯に採取した尿サンプルを使用する。

アシドーシス、アルカローシスを示すような疾患では、排泄量が減少する可能性がある

ため、体液の pH に留意する。

高血圧については、腎機能に影響しないレベルの変化であれば留意しなくてよい。

尿中エクソソーム AQP2 タンパク質について

日内変動の影響はうけないため、時間帯に留意せずに解析できる。

アシドーシスでは排泄量が減少し、アルカローシスでは排泄量が増加する可能性があるため、体液の pH に留意する。

高血圧については、腎機能に影響しないレベルの変化であれば留意しなくてよい。

(5) 得られた成果の国内外での位置づけとインパクト

これまでに、尿中エクソソーム AQP1 タンパク質について、虚血性 AKI【[Sonoda H, et al. 2009](#)】や腎盂尿管移行部狭窄症【[Li ZZ, et al. 2012](#)】におけるバイオマーカーとしての有用性が報告されている。また、尿中エクソソーム AQP2 タンパク質に関しては、アメリカ皮膚リ－シュマニア症【[Oliveira RA, et al. 2011](#)】やゲンタマイシン投与による腎障害【[Abdeen A, \[Sonoda H\]\(#\), et al. 2014](#)】においてバイオマーカーとしての有用性が報告されている。

AKI における早期診断マーカーとして有用な尿中エクソソームタンパク質として申請者が報告した AQP1 以外に fetuin-A【[Zhou H, et al. 2006](#)】や Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type 3【[du Cheyron D, et al. 2003](#)】といったタンパク質の報告がある。Salih ら【2014】の総説の中で、持続性、疾患特異性の観点からこれらのマーカー候補の中でも AQP1 タンパク質に有益性が高いことが述べられている。以上のように、尿中エクソソーム AQP1 および AQP2 タンパク質の腎関連の疾患におけるバイオマーカーとしての有用性は着目されており、今後関連報告が増えることが考えられる。

申請者は本研究で、尿中エクソソーム

AQP1 および AQP2 タンパク質排泄の生理的調節機構について基礎的検討を行った。これまでに疾患モデルを用いずに、尿中エクソソームタンパク質排泄の生理的調節に関する検討を行った報告はない。本研究で得られた知見は、尿中エクソソーム AQP タンパク質の疾患バイオマーカーとしての有用性を検討していく上で重要な情報となる。

#### 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 3 件)

Ahmed Abdeen、[Hiroko Sonoda](#)、Ragab El-Shawarby、Saki Takahashi、Masahiro Ikeda、Urinary excretion pattern of aquaporin-2 in rats that received gentamicin, *Am J Physiol Renal Physiol.*、査読有、307 巻、2014、pp. F1227-F1237、doi: 10.1152/ajprenal.00140.2014.

Yoshiki Higashijima、[Hiroko Sonoda](#)、Saki Takahashi、Hiroaki Kondo、Kanako Shigemura、Masahiro Ikeda、Excretion of urinary exosomal AQP2 in rats is regulated by vasopressin and urinary pH. *Am J Physiol Renal Physiol.*、査読有、305 巻、2013、pp. F1412-1421、doi: 10.1152/ajprenal.00249.2013.

〔学会発表〕(計 8 件)

[園田紘子](#)、虚血再灌流による腎線維化モデルにおける尿中 exosome アクアポリン 2 タンパク質排泄量の変化についての検討、第 67 回日本薬理学会西南部会、2014 年 11 月 23 日、産業医科大学(福岡県・北九州市)

[園田紘子](#)、The decreased excretion of urinary exosomal aquaporin-2 during gentamicin-induced urine concentrating defect in rats、*Kidney Week 2014*、2014 年 11 月 11 日～16 日、Philadelphia (USA)

園田紘子、タンパク尿モデルラットにおける尿中 exosome タンパク質排泄量の変化についての検討、第 66 回日本薬理学会西南部会、2013 年 11 月 16 日、福岡大学薬学部(福岡県・福岡市)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：急性腎障害に起因する多臓器不全の予防又は治療薬

発明者：池田正浩、園田紘子、北村和雄、加藤丈司

権利者：宮崎大学

種類：特許

番号：特願 2014-036815 号

出願年月日：平成 26 年 2 月 27 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

園田 紘子 (SONODA, Hiroko)

宮崎大学・農学部獣医学科・助教

研究者番号：60608272