

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660241

研究課題名(和文) エクソソームバイオマーカーによる腎小胞体ストレス検出技術の確立

研究課題名(英文) The detection of renal ER stress by a urinary exosomal protein

研究代表者

池田 正浩 (IKEDA, Masahiro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：60281218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、腎疾患の発症が小胞体ストレスと関連していることに着目して、尿中に排泄されるエクソソームに含まれるタンパク質の中から、腎小胞体ストレスを検出できるバイオマーカーを明確にし、その科学的根拠を明らかにすることを目的として実施した。その結果、小胞体ストレスを腎に誘導すると尿中エクソソームによる水チャネルタンパク質排泄が特異的に減少することを確認した。さらにこの減少メカニズムを検討したところ、遺伝子発現が減少することによってもたらされることも観察した。以上の成果から、腎小胞体ストレスを検出する新規のバイオマーカーを明らかにでき、当初の目的を達成できたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Several previous reports have indicated that endoplasmic reticulum (ER) stress is related to renal diseases. In order to find a new biomarker for ER stress in the kidney, we pharmacologically examined the urinary exosomal proteins in rats and cultured cells. Among proteins tested in this study, only the urinary exosomal release of AQP1 was markedly decreased by the treatment with tunicamycin (an ER stress inducer). Tunicamycin also decreased the level of AQP1 mRNA in the kidney. When either tunicamycin or thapsigargin (another ER stress inducer) was added to cultured renal proximal tubule cells, down-regulation of AQP1 mRNA was observed. These findings indicate that ER stress decreases the urinary exosomal excretion of AQP1 protein and the underlying mechanism is mediated by lowering the level of renal AQP1 mRNA, suggesting that urinary exosomal AQP1 is a possible biomarker for detection of ER stress in the kidney.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：エクソソーム 小胞体ストレス 腎疾患 アクアポリン

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内小器官の一つである小胞体は、膜タンパク質などを合成する機能を持つ。この小胞体において、膜タンパク質が折りたたみ不全となるなど異常タンパク質が蓄積した状態を小胞体ストレスと呼ぶ。これまでの研究成果から、程度および持続時間に依存して、小胞体ストレスは腎にアポトーシスを発症することが知られている(文献)。従って、腎臓の小胞体ストレスを的確に捉える方法を確立できれば、腎疾患の早期診断につながる。しかし現在までに、腎の小胞体ストレスを検出する方法は確立されていない。

細胞外小胞の一種であるエクソソームは直径 100 nm 以下の小胞で、2004 年に尿中に発見された(文献)。その後の研究から、尿中エクソソームは、1) その由来する細胞が明瞭である、2) 腎の再吸収や分泌を直接担う細胞膜タンパク質に富んでいる、3) 由来細胞の状態に依存して生成されるなどの特徴を持つことが明らかにされている。これらの特徴から尿中エクソソームが腎疾患バイオマーカーソースとして有用であることが考えられる(文献)。

我々はこれまでに、疾患モデルの尿中エクソソーム排泄を解析して、虚血性急性腎障害の細胞診断マーカーを見出した(文献)実績を持っている。この研究および小胞体ストレスの特徴から、尿中エクソソームの中から小胞体ストレスを検出できるバイオマーカーを発見できる可能性は高く、それを見出すことができれば、満足の行く診断を実施できていない腎疾患の早期診断方法の開発につながるのではないかと考えて、本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、本研究では、腎特異的に小胞体ストレスを誘導した個体から尿中エクソソームを分離・解析して、そのエクソソームに含まれるタンパク質の中から小胞体ストレスを検出できるバイオマーカーを発見すること、そして発見した場合には、その尿中排泄の分子基盤を明らかにすることを目的として実施した。

## 3. 研究の方法

本研究目的達成のための研究項目は、(1) 小胞体ストレスバイオマーカーの同定、(2) 同定した分子のバイオマーカーとしての分子基盤の解明の2項目である。

### (1) 小胞体ストレスバイオマーカーの同定

まず、ラット腎の包膜下に小胞体ストレスを誘導する薬剤を投与して、腎特異的に小胞体ストレスを誘導した。この腎小胞体ストレス誘導ラットから、尿中エクソソームタンパク

質を分離し、タンパク質解析技術(個別分子に着目した解析や網羅的解析)によりバイオマーカーとして有用な分子の同定実験を行った。尿中エクソソームの分離には、段階的遠心法を用いた。

### (2) 同定した分子のバイオマーカーとしての分子基盤の解明

新規候補分子のバイオマーカーとしての分子基盤を解明するために以下の実験を行った。まず、候補分子の遺伝子やタンパク質の腎における発現量をリアルタイムPCR、ウェスタンブロット法、免疫組織化学法などにより解析した。また、in vivo の実験の進捗に合わせて、培養細胞を用いた in vitro の系を用いて、候補分子の遺伝子やタンパク質について解析した。

以上の2つの研究項目を実施することを通して、腎で特異的に小胞体ストレス負荷が生じたことを診断できる有用なエクソソームバイオマーカー候補分子とその診断の科学的根拠を明らかにできるものと考えた。

## 4. 研究成果

### (1) 小胞体ストレスバイオマーカーの同定

まず、我々の方法により腎に小胞体ストレスが誘導されているかどうかについて、タンパク質の糖鎖修飾を阻害することによって小胞体ストレスを誘導する tunicamycin (TM, 0.3 mg/kg) を投与して調べた(文献)。その結果、小胞体ストレスマーカータンパク質である GRP78 および CHOP mRNAs 発現量が TM 投与によって増加することを観察した(髄質外帯部(OM)においてコントロール群に比べて約 22 倍の増加, n = 8)。また、GRP78 タンパク質発現量についてもウェスタンブロット法および免疫組織化学によって調べたところ、タンパク質レベルで増加することを確認した(OMにおいてコントロール群に比べて約 3.3 倍の増加, n = 8)。以上から、今回の手法により、腎に小胞体ストレスを誘導でき、モデルとして成立していることを確認できた。

次にモデル動物から尿中エクソソームを分離して、タンパク質排泄量について調べた。その結果、TM の投与量依存的に、尿中エクソソーム中の aquaporin-1 (AQP1) タンパク質排泄量が減少することを観察した(コントロール群に比べて 0.1 mg/kg 投与群で 50% の減少, n = 6, 0.3 mg/kg 投与群で 64% の減少, n = 8)。それ以外のタンパク質についても検討を行ったが、TM 投与によって変化するタンパク質を確認できなかった。以上から、尿中エクソソーム中 AQP1 を腎小胞体ストレス誘導のバイオマーカーとして選別し、以後、その減少メカニズムについて

検討を進めた。

(2) 同定した分子のバイオマーカーとしての分子基盤の解明

腎を皮質 (Cortex), OM, 内層 (IM) の3つの部位に分けて, TM 投与による AQP1 mRNA 発現量に対する影響について, リアルタイム PCR 法を用いて解析した。3 部位の中で OM においてのみコントロール群と比較して, TM 投与群で AQP1 mRNA 発現量が有意に減少していた (コントロール群に比べて約 80% の減少,  $n = 8$ )。一方, Cortex および IM においては AQP1 mRNA 発現量の有意な変化は認められなかった。

次に, 腎の AQP1 タンパク質発現量について, ウェスタンブロット法を用いて調べた。その結果, Cortex および OM においてコントロール群と比較して TM 投与群で AQP1 タンパク質発現量の有意な減少が認められた (コントロール群に比べて Cortex で 47% の減少, OM で 51% の減少, 各  $n = 8$ )。この結果を検証するために, 抗 AQP1 抗体を用いて腎組織を免疫染色した。その結果, TM 投与群で Cortex および OM の近位尿細管細胞において AQP1 タンパク質発現量の減少が認められ, ウェスタンブロットの結果が支持された。

in vivo の実験において, 小胞体ストレスにより近位尿細管細胞において AQP1 タンパク質発現量の減少が認められたため, 次に in vitro の実験系により検討した。この検討には, 腎近位尿細管培養細胞として NRK-52E 細胞を用い, 小胞体ストレス誘導剤として, TM に加えて, 小胞体膜上に発現する  $Ca^{2+}$  ポンプを阻害して, 小胞体内における  $Ca^{2+}$  の恒常性を破綻させることによってタンパク質の正常な折り畳みを阻害して小胞体ストレスを誘導することが報告されている thapsigargin (TG) を用いた (文献)。まず, 小胞体ストレス誘導剤処置時の NRK-52E 細胞における小胞体ストレスマーカー (GRP78, CHOP) および AQP1 mRNA 発現量について, リアルタイム PCR 法を用いて解析した。コントロール群と比較して TM および TG 処置群において, GRP78 および CHOP mRNAs 発現量の有意な増加が観察された (コントロール群に比べて TM 群の GRP78 mRNA で 13 倍の増加, TM 群の CHOP mRNA で 27 倍の増加, TG 群の GRP78 mRNA で 16 倍の増加, TG 群の CHOP mRNA で 36 倍の増加,  $n = 3 - 4$ )。この結果から, 今回の条件によって NRK-52E 細胞に小胞体ストレスが生じていることが確認された。次に AQP1 mRNA 発現量について検討したところ, コントロール群と比較して TM および TG 処置群それぞれにおいて有意な減少が確認された (コントロール群に比べて TM 群で 60% の減少, TG 群で 96% の減少,  $n = 3 - 4$ )。以上の結果は, in vitro の条件でも in vivo の結果が再現されたことを

示しており, in vivo で見られた現象は, 間接的なものではなく, 小胞体ストレスが腎の近位尿細管細胞に直接働きかけて生じているものと考えられた。

次に, 小胞体ストレス誘導による AQP1 タンパク質発現量減少が, 細胞機能に反映されるかどうかについて検討した。まず, 細胞の水透過性について調べた。水透過性は細胞外液を低浸透圧にしたときの細胞体積の変化速度から Pf 値を算出して評価した。その結果, コントロール群の細胞の Pf 値は  $90 \pm 16 \times 10^{-4}$  cm/sec ( $n = 12$ ), TM 処置群では  $25 \pm 6 \times 10^{-4}$  cm/sec ( $n = 12$ ), および TG 処置群では  $14 \pm 5 \times 10^{-4}$  cm/sec ( $n = 12$ ) であった。以上から小胞体ストレス誘導によって細胞の水透過性が抑制されていることが考えられた。

AQP1 は細胞内へ水を流入させることによって, 細胞遊走を促進することが報告されている。そこで, 小胞体ストレス誘導薬処置 24 時間後にスクラッチアッセイを行ない, NRK52E 細胞の遊走活性について調べた。その結果, コントロール群においてはスクラッチ後, 顕著な細胞遊走が観察されたが, TM 処置および TG 処置群では細胞遊走は顕著に抑制されていた (コントロール群に比べて TM 群で 84% の減少, TG 群で 73% の減少,  $n = 3$ )。

以上の研究成果から, 尿中 exosome AQP1 の減少が腎での小胞体ストレス誘導の検出に有効であること, そしてこの減少には, 腎における AQP1 mRNA 発現量および AQP1 タンパク質発現量の減少が関与することが考えられた (図)。本研究実施中において, 患者数が多いことから問題となっている慢性腎臓病においても小胞体ストレスが病因として重要であることが報告された (文献)。今後小胞体ストレスが誘導される腎疾患において, 尿中 exosome AQP1 排泄量が減少するかどうかなどを患者や患者を対象に調べて行くことによって, 今回見出したバイオマーカーの臨床的有用性が一層明確になっていくものと考えられる。

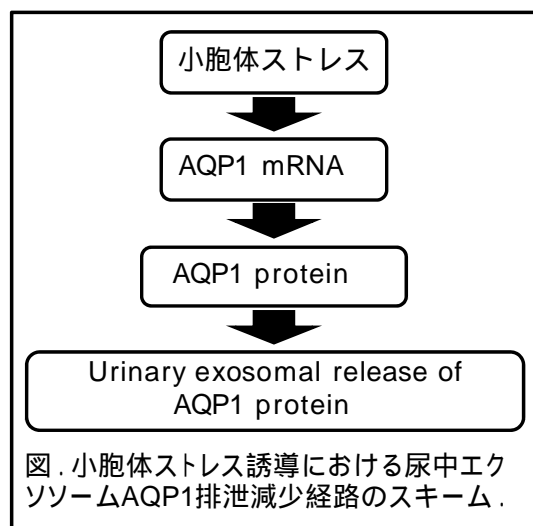


図. 小胞体ストレス誘導における尿中エクソソーム AQP1 排泄減少経路のスキーム。

<引用文献>

Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 15: 3066-3077, 2004.

Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13368-13373, 2004.

園田紘子, 池田正浩. エクソソームと腎疾患. *血管医学* 16: 149-157, 2015.

Sonoda H, Yokota-Ikeda N, Oshikawa S, Kanno Y, Yoshinaga K, Uchida K, Ueda Y, Kimiya K, Uezono S, Ueda A, Ito K, **Ikeda M**. Decreased abundance of urinary exosomal aquaporin-1 in renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F1006-F1016, 2009.

Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J* 274: 630-658, 2007.

El Karoui K, Viau A, Dellis O, Bagattin A, Nguyen C, Baron W, Burtin M, Broueilh M, Heidet L, Mollet G, Druilhe A, Antignac C, Knebelmann B, Friedlander G, Bienaimé F, Gallazzini M, Terzi F. Endoplasmic reticulum stress drives proteinuria-induced kidney lesions via Lipocalin 2. *Nat Commun* (2016, in press), doi: 10.1038/ncomms10330.

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6件)

Abdeen A, Sonoda H, Oshikawa S, Hoshino Y, Kondo H, **Ikeda M**. Acetazolamide enhances the release of urinary exosomal aquaporin-1. *Nephrol Dial Transplant*, (2016, in press). doi: 10.1093/ndt/gfw03. 査読有

園田紘子, 池田正浩. エクソソームと腎疾患. *血管医学* 16: 149-157, 2015. 査読無

**Ikeda M**, Matsuzaki T. Regulation of aquaporins by vasopressin in the kidney. *Vitam Horm* 98: 307-337, 2015. 査読無

池田正浩, 園田紘子. 腎疾患におけるエクソソーム. *Bio Clinica* 29: 540-543, 2014. 査読無

Abdeen A, Sonoda H, El-Shawarby R, Takahashi S, **Ikeda M**. Urinary excretion pattern of exosomal aquaporin-2 in rats that received gentamicin. *Am J Physiol Renal Physiol* 307: F1227-F1237, 2014. 査読有

Higashijima Y, Sonoda H, Takahashi S, Kondo H, Shigemura K, **Ikeda M**. Excretion of urinary exosomal AQP2 in rats is regulated by vasopressin and urinary pH. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F1412-F1421, 2013. 査読有

[学会発表](計8件)

園田紘子, Asvapromtada, Siree, 木内みな美, 高橋早樹, 池田正浩: 腎線維化モデルラットにおける尿中 exosome 目抜きタンパク質排泄パターンについての検討. 第89回日本薬理学会, 2016年3月11日, 横浜.

池田正浩, 三小田伸之, 押川さやか, 園田紘子, 松崎利行: ネフロン瘻モデル動物におけるアクアポリン2の腎発現および尿中排泄動態解析. 第26回バゾプレシン研究会, 2016年1月9日, 東京.

三小田伸之, 園田紘子, 星野雄也, 押川さやか, 本部杏奈, 古賀萌子, 池田正浩: pcy マウス腎における aquaporin-2 発現パターンについての解析. 第158回日本獣医学会, 2015年9月8日, 十和田.

園田紘子, 加藤綾華, 重村可南子, 高橋早樹, 池田正浩: 小胞体ストレス負荷時のアクアポリン1遺伝子発現変化メカニズムの検討. 第7回トランスポーター研究会九州部会, 2014年11月22日, 北九州.

Ayaka Kato, Hiroko Sonoda, Kanako Shigemura, Saki Takahashi, **Masahiro Ikeda**: Negative transcriptional regulation of aquaporin-1 by unfolded protein response. American Society of Nephrology 47th Annual Meeting, Nov. 15, 2014, Philadelphia, PA.

池田正浩, 園田紘子: 腎疾患バイオマーカーとしての尿中エクソソーム AQP. 日本薬学会第134回年会, 2014年3月28日, 熊本. (シンポジウム)

池田正浩, 東島佳毅, 園田紘子: エクソソームを介したアクアポリン-2尿中排泄のバゾプレシンおよび尿中 pH による調節作用. 第24回バゾプレシン研究会, 2014年1月11日, 東京.

Ayaha Kaito, Hiroko Sonoda, Saki Takahashi, **Masahiro Ikeda**: Changes in the excretion of urinary exosomal AQP1 and AQP2 in rats with PAN-induced nephrotic syndrome. American Society of Nephrology 46th Annual Meeting, Nov. 17, 2013, Atlanta, GA.

[図書](計1件)

池田正浩, 園田紘子(2016), 急性腎障害動物モデル, 宮崎大学動物実験プロトコール編集委員会(編), 大・中・小動物実験プロトコール, 宮日文化情報センター, pp.80-82.

(総146ページ)

〔その他〕

ホームページ

( <http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/VetPharmacol/index.html> )

6 . 研究組織

( 1 ) 研究代表者

池田 正浩 ( IKEDA, Masahiro )

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号 : 60281218

( 2 ) 研究協力者

松崎 利行 ( MATSUZAKI, Toshiyuki ),

園田 紘子 ( SONODA, Hiroko ),

高橋 早樹 ( TAKAHASHI, Saki ),

東島 佳毅 ( HIGASHIJIMA, Yoshiki ),

重村 可南子 ( SHIGEMURA, Kanako ),

海藤 文葉 ( KAITO, Ayaha ),

加藤 綾華 ( KATO, Ayaka ),

木内 みな美 ( KINOUCHI, Minami ),

星野 雄也 ( HOSHINO, Yuya ),

古賀 萌子 ( KOGA, Moeko ),

三小田 伸之 ( MIKODA, Nobuyuki ),

ASVAPROMTADA, Siree

押川 さやか ( OSHIKAWA, Sayaka ),

本部 杏奈 ( HONBU, Anna ),

ABDEEN, Ahmed .