

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：32413

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860413

研究課題名(和文) In-situマーカーとしての尿中エクソソームを用いた尿路上皮系細胞機能の解明

研究課題名(英文) Urinary exosomes as in-situ biomarker of renal epithelial cells

## 研究代表者

中山 亜紀 (Aki, Nakayama)

文京学院大学・保健医療学部・助手

研究者番号：00599425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：二次元電気泳動法をベースにしたプロテオーム解析によって、健常人尿中エクソソームより、細胞膜、細胞外成分、細胞骨格・代謝酵素を含む、腎・尿路系細胞特異的なタンパク質が同定された。また、健常人の尿中エクソソーム数、長径、およびエクソソーム分画の総タンパク濃度に個人間差を認めなかった。尿中エクソソーム分泌量は単位時間当たり、一定であった。本研究結果は、健常人尿におけるエクソソームタンパク組成と分泌量に関する基礎的情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：We identified urinary exosomal proteins by two dimensional electrophoresis-based proteome analyses which include membranous, extracellular region, and cytoplasm of renal epithelial cells. The numbers, diameters, and concentration of protein of exosomal fraction were consistent between healthy subjects. Furthermore, total protein concentration of urinary exosome fraction was consistent per unit time. This research provides the basic information about protein profile and amount of exosomal production in renal epithelial cell of healthy subjects.

研究分野：病態医科学

キーワード：エクソソーム 尿タンパク質 バイオマーカー 腎機能

## 1. 研究開始当初の背景

尿中タンパク質の大半は、糸球体の破綻により増加した血清からの漏出タンパク質である。アルブミンの分子サイズを閾値とし、それよりも質量の大きいトランスフェリンやIgGが糸球体病変では増加し、尿管上皮細胞での再吸収能が低下すると、低質量のタンパク質も尿中に排泄される。このように、排泄されているタンパク質の質量により、腎傷害部位をおおよそ予測することができる。これまで申請者らは、臨床検査の現場で用いられているセルロースアセテート(以下セ・ア)膜電気泳動法による尿タンパク5分画パターンから腎生検パターンを予測できる事を報告してきた。糸球体傷害パターンでは主バンドがアルブミンとトランスフェリン、尿管傷害パターンでは $\beta_2$ ミクログロブリンとレチノール結合タンパク、というように、尿タンパク質パターンと病理組織像が概ね一致する。この分析方法は、腎生検が唯一の確定診断方法とされているIgA腎症などの各種腎疾患の病態予測に有用であることを示してきた。しかし、腎・尿路系細胞で起こっている変化を特異的なタンパク質レベルでとらえることができれば、真の意味での腎機能マーカーと成り得る。このような直接的に腎機能を反映するいわば‘*in-situ*’の臨床検査項目が、今日、望まれている。

2004年、NHIのPisitkunらは尿の超遠心画分にエキソソームが認められることを明らかにした。エキソソームとは、エンドサイトーシスにより取り込まれた小胞が、細胞質中の多胞体(multivesicular body, MVB)に陥入することで形成される直径40~100nmの細胞膜小胞のことで、最終的にMVBが原形質膜と融合して細胞外に放出される。これまでに血清、腹水、唾液など多くの体液でエキソソームの存在が確認されている。

尿中エキソソームの構成タンパク質を明らかにすれば、腎・尿路上皮系細胞の詳細な情報を得ることができ、腎直接的なバイオマーカーの発見に応用できると期待されているが、詳細については未解明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的を以下の三点とした。

- (1) エキソソームの直接検出法を構築する
- (2) 健常人尿中エキソソームタンパク質プロファイルを完成させ、腎・尿路上皮系細胞の生理代謝を明らかにする
- (3) 健常人尿中エキソソーム分画の個人間差について検討する

以上の点に着目し、以下の研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象

書面にて同意の得られた対象者から提供を受けた尿をプールし(20 $\pm$ 2歳、男女各3名)、防腐剤およびプロテアーゼインヒビター(尿50mLあたり100mmol/Lアジ化ナト

リウム1.67ml、プロテアーゼインヒビターとして125mmol/Lベンジルスルホニル=フルオリド200 $\mu$ l、1mmol/Lロイペプチン50 $\mu$ l)を添加して測定までに-80に保存した。

また、個人間差の検討には、同対象者から、早朝第一尿から翌日の早朝第一尿まで、排尿毎の全量採尿を依頼し、各段階の尿検体からエキソソームを分離した。

### (2) 尿中エキソソーム分離法

Fernandez-Llamaらの方法に準じて二段階超遠心分離法を採用した。はじめに、尿検体を17,000g、37、10分間、高速遠心機(himac CR20G、日立工機、R15Aローター)で遠心し、上清を分離した(上清)。ここで得られた沈渣には、尿中有形成分とともにTHPと結合したエキソソームが存在するため、そこからエキソソームを解離する目的でisolation solution(250mmol/L sucrose、10mmol/L triethanolamine)で溶解後、200g/L dithiothreitol(DTT)を加え37、5分間反応させ、THPのジスルフィド結合を還元した。さらにisolation solutionを加え、再度17,000g、37、10分間、高速遠心した。上清を分離し(上清)上清とを混和した。この上清を200,000g、37、1時間、超遠心機(himac CP70MX、日立工機、P45ATローター)で遠心した。上清は除去し、phosphate buffered saline(PBS)を加えてエキソソームが含まれた沈渣を回収した。

### (3) 透過型電子顕微鏡による尿中エキソソーム表面マーカーの検出及び形態観察

透過型電子顕微鏡を用いてエキソソームの表面マーカーであるCD63、および、尿管細管ヘンレ上行脚に発現するNa-K-Cl cotransporter(NKCC2)の検出を試みた。方法(2)で得たエキソソーム分画を、親水化処理した300-メッシュニッケルグリッド(日清EM)に載せ5分間静置した。次に1% paraformaldehydeで3分間反応させ固定した。その後、0.1mol/L tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl buffer(pH7.4, wash buffer)で3分間洗浄し、液を換えて再度洗浄した。次にwash bufferで10倍に希釈した抗CD63モノクローナル抗体(BD biosciences)、または抗NKCC2モノクローナル抗体(Abnova)と90分間反応後、6回洗浄した。二次抗体には5nm gold goat anti-mouse IgG immune-gold conjugate(BBI Solutions)をwash bufferで100倍に希釈して使用し、60分間反応させた。wash bufferで6回洗浄後、超純水で1分間2回洗浄し、1% uranyl acetateで2分間染色し、透過型電子顕微鏡(H7100、日立ハイテクノロジーズ)を用いて加速電圧75kV、観察倍率80,000倍で観察を行った。エキソソームの直径測定にはImageJ(rsb.info.nih.gov/ij/)を用いた。

### (4) フローサイトメトリー法によるエキソソーム表面マーカーの検出

直径4 $\mu$ mのビーズ(Aldehyde/Sulfate Latex beads、Life Technologies)を用いてエキソソ

ーム表面の CD63 の検出を行った。ビーズを前処理後、抗 CD63 モノクローナル抗体、または、抗 NKCC2 モノクローナル抗体を 25 ng/μg ビーズとなるようにコーティングした。その後、20 μg/μg ビーズとなるようにエキソソームを、ネガティブコントロールには、1% BSA-PBS を入れ 4 時間で一晚反応させた。3,000 g 10 分間遠心して上清を取り除き、100 mmol/L glycine - PBS を入れ室温で 30 分間反応させた。遠心し上清を取り除き、FITC 標識抗 CD63 モノクローナル抗体 (BD Biosciences) を加え遮光して 45 分間反応させた。再度遠心し上清を取り除き、1% BSA、0.1% NaN<sub>3</sub> - PBS で洗浄後、フローサイトメーター (COULTER Epics XL、BECKMAN COULTER) で蛍光強度を測定した。

#### (5) 二次元電気泳動法

検体の前処理として、エキソソームを RIPA buffer (Thermo Scientific) で溶解後、PVDF 膜フィルターで濾過し、2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare) を用いて、説明書に従い、脱塩及び濃縮を行った。調製後の検体を rehydration buffer (6 mol/L urea、2 mol/L thiourea、3% CHAPS、1% triton X-100、0.5% ampholyte (pH3-10) 20 mmol/L DTT) で溶解した (7)。溶解後の検体 155 μL を ZOOM IPGRunner Cassettes (Invitrogen) 内で、pI 3-10 のゲルストリップ (Invitrogen) に一晚膨潤させた。膨潤後、一次元目として等電点電気泳動を 200 V、20 分、450 V、15 分、750 V、15 分、2,000 V、60 分の条件で行った。泳動後のゲルストリップは、sample reducing agent (Invitrogen) で還元し、3 μmol/L iodoacetamide でアルキル化を行った。その後、二次元目は SDS-PAGE 法にて、処理後のゲルストリップを 15% ポリアクリルアミドゲルにのせ、ゲル 1 枚当たり 20 mA で約 120 分間泳動し、銀染色を行った (Silver Stain KANTO、関東化学)。

#### (6) 質量分析法

タンパク質スポットをゲルから切り取り、脱色を行った (Silver Stain KANTO Gel Washing Solution For MS、関東化学)。超純水で洗浄後、acetonitrile でゲル内の銀染色液及びゲル洗浄液を完全に取り除いた。次に、100 mmol/L ammonium hydrogen carbonate に溶解した 10 mmol/L DTT 及び 55 mmol/L iodoacetamide を用いて還元アルキル化を行った後に、50 mmol/L ammonium hydrogen carbonate で溶解した 25 ng/μL trypsin 溶液 (Sequence Grade Modified Trypsin、Promega) を入れ 4、45 分間ゲルに浸透させ、余分な trypsin 溶液を取り除き、50 mmol/L ammonium hydrogen carbonate を入れ 37、16 時間反応させゲル内消化を行った。トリプシン消化後の試料を高速液体クロマトグラフィー・質量分析装置 (Advance-nano UHPLC、AMR Inc.・amaZon ETD、Bruker Daltonics) にて測定した。HPLC のカラムには L-column Micro (0.1×50 mm、L2-C-18、化学物質評価研究機構) を用い、移動相 A は 0.1% trifluoroacetic acid、2%

acetonitrile を、移動相 B には acetonitrile を使用した。グラジエントは 0~20 分 5→45%、20~21 分 45→95%、21~24 分 95% の条件で行った。データベース検索には Mascot Search (Matrix Science) を使用し、タンパク質の同定を行った。最小のペプチドの長さ 5 アミノ酸以上、最大偽陽性率 5%、固有のペプチド 2 個以上を同定基準とした。

## 4. 研究成果

### (1) 尿中エキソソーム直接検出法の確立

エキソソームマーカーである CD63 および、腎マーカーの一つである NKCC2 を、透過型電子顕微鏡法で検出した。また、フローサイトメトリー法によって、CD63 を検出した。電子顕微鏡にて CD63 陽性エキソソームの直径を測定したところ、15 nm~130 nm の範囲であり、30~40 nm が最も多かった。

### (2) 二次元電気泳動像からのタンパク質同定

二次元電気泳動後のゲルスロットから質量分析法にて 89 種類のタンパク質を同定した (同定率 51%)。このうち、40 個 (44%) が細胞質および細胞骨格タンパク質、14 個 (17%) が細胞表面発現タンパク質、9 個 (10%) が charged multivesicular body protein ファミリーや vacuolar protein sorting-associated protein ファミリーなど、多胞体およびエンドサイトーシスに関連するタンパク質であった。

本研究で同定したタンパク質が、エキソソームのデータベースである ExoCarta や、SDS PAGE 法を用いたプロテオーム解析で同定された尿中エキソソームタンパク質データベースである Urinary Exosome Protein Database に掲載されているかを確認したところ、両者に掲載されていないものが 35 種類存在した。また、ExoCarta には掲載されているが、Urinary Exosome Protein Database に掲載されていないものが 15 種類、両者に掲載されていたものが 39 種類あった。新規タンパク質の同定は、2 次元電気泳動法の高分離能の結果であると考えられた。

また、本研究でエキソソームタンパク質として同定された tropomyosin alpha-4 chain は、ヘンレの上行脚に発現し、浸透圧の変化による負荷がかかると他の tropomyosin ファミリーと異なり、発現が上昇するという性質があり、腎機能低下のマーカー候補として期待された。

### (3) 個人間差の検討

6 名の対象者の尿をプールせずに同様の解析を行った結果、早朝第一尿から翌日の早朝第一尿まで、単位時間当たり一定量排出されていることが明らかになった。また、免疫電子顕微鏡法によるエキソソーム長径測定の結果、各対象者間で有意差は認めなかった。つまり、健常人において、一日のエキソソーム分画タンパク量や形状に変化がないことが明らかになった。

### (4) まとめ

本研究では、腎・尿路上皮細胞の各部位特

徴的なマーカーを用いた、エキソソーム直接検出法を検討した。本法を応用すれば、半定量化が可能になり、尿中エキソソームが、より詳細な 'in-situ' の病態変化を捉える臨床検査試料となることが期待できる。また、二次元電気泳動法を用いた健常人尿中エキソソームタンパク質プロテオーム解析によって、これまでに報告の無いタンパク質の同定に至った。腎疾患との関連性が報告されているタンパク質が同定されたことは、エキソソームの病態マーカーとしての有用性を示唆している。また、健常人においては、単位時間当たり、一定の形状で、一定量のタンパク質を保有したエキソソームが分泌されていることが明らかになった。エキソソームが新たなバイオマーカーソースとしての研究が盛んにおこなわれるようになった今日、本研究で得られた基礎的な情報は、エキソソームを介した生理的機能解明に貢献するものと考えられる。

文京学院大学保健医療技術学部臨床検査学科 助手

研究者番号：00599425

#### 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)

1. 中山亜紀 尿検査の未来展望(3) 尿中エキソソーム蛋白質の探索研究 臨床病理 2014;62:684-691.
2. 中山亜紀 腎機能予測マーカー開発を目指した尿蛋白質の網羅的解析 臨床病理 2014; 62:722-726.

[雑誌論文](計 3 件)

1. Nakayama A, Masukawa A, Araki Y, Iijima S  
Simplified protocol for Tamm-Horsfall protein depletion from urinary extra dimensional electrophoresis-based proteome analysis.  
International Society for Extracellular Vesicles April 24, 2014. (Washington DC, USA)
2. 中山 亜紀、荒井 勇輝、増川 陽、御園 生圭太、木明 琢磨、荒木 勇磨、片山 映、鈴木 秀典、飯島 史朗  
健常人尿中エキソソームタンパク質の基礎的解析 3  
第 25 回生物試料分析学会(東京)平成 27 年 2 月 14 日
3. 荒井 勇輝、中山 亜紀、荒木 勇磨、木明 琢磨、片山 映、鈴木 秀典、飯島 史朗  
尿中エキソソームタンパク質解析最適化のための検体処理法の検討  
第 61 回日本臨床検査医学会(福岡)平成 26 年 11 月 24 日

[学会発表](計 9 件)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 亜紀 (Aki Nakayama)