

平成30年6月20日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293191

研究課題名(和文) Big angiotensin-25の生体内での役割と診断薬としての可能性

研究課題名(英文) Possibility as diagnostic agent and the role in vivo of Big angiotensin-25

研究代表者

北村 和雄 (Kitamura, Kazuo)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：50204912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：Bang-25の測定系を確立し、尿中のBang-25を測定した。ヒト尿中Bang-25は、糸球体濾過量と負の相関が見られたが、尿タンパクとは相関しなかった。さらに糖尿病患者についても尿中Bang-25が高い事が分かった。つまり、尿中Bang-25は腎障害の程度を反映しているおり、また糖尿病と関連していると考えられた。

さらにAogenの14番目の糖鎖の解析を行った結果、Aogenの糖鎖のうちの1つはBang-25と同じ事から、糖鎖の違いによってAogenからBang-25もしくはAng Iなど生成されるアンジオテンシン関連ペプチドの種類が変化する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We developed assay of Big angiotensin-25 (Bang-25) and measured urinary Bang-25. Human urinary Bang-25 had negative correlation with estimated glomerulus filtration rate, but did not correlate with the urine protein. Furthermore, when compared with diabetes mellitus patients, the urinary Bang-25 was higher than healthy volunteer. These results show that urinary Bang-25 is associated with kidney injury and diabetes mellitus. Next, we analyzed the 14th glycosyl chain of Angiotensinogen (Aogen). One of the glycosyl chains of Aogen is same as Bang-25. The possibility that produce of angiotensin-related peptide including Bang-25 or Ang I was changed by the difference of the glycosyl chain of Aogen.

研究分野：循環器内科学

キーワード：Bang-25 アンジオテンシン バイオマーカー 糖鎖ペプチド 生合成酵素 抗Bang-25抗体

1. 研究開始当初の背景

レニン・アンジオテンシン(RA)系は、血圧・体液量の調節および循環器・腎臓疾患の発症進展において極めて重要な役割を有している。血中 RA 系においては、レニンの作用によりアンジオテンシノーゲン(Aogen)からアンジオテンシン I(AngI)が生成され、次にアンジオテンシン変換酵素(ACE)によってアンジオテンシン I I(AngII)に変換され作用を発揮する。一方、血中 RA 系と同様に組織 RA 系の重要性が指摘されてきたが、その生成機構や役割に関して未だ不明な点が多い。

研究代表者らは、組織 AngII の生合成機構や生体内での役割を明確にするために、AngII の N 末を特異的に認識する抗体を作製し、ラジオイムノアッセイ(RIA)を確立した。本測定系を用いて、ラット組織での系統的検索を行い、ラット小腸よりプロアンジオテンシン-12(proang-12)を主要なアンジオテンシン関連ペプチドとして単離同定した。proang-12 は ACE により速やかに AngII に変換され作用を発揮し、組織中では AngI や AngII の濃度より高濃度で存在していることから、組織アンジオテンシン産生系を構成する主要な因子であることが想定されている。一方、ヒト組織においてはラット proang-12 に相当するヒト proang-12 はごく微量しか存在せず、分子量約 5,000 のペプチドとして、ヒト組織や尿中に主要なアンジオテンシン関連ペプチドとして存在することが明らかとなった。本ペプチドの最終的な構造決定にごく最近成功した。本ペプチドは N 末にアンジオテンシン構造を有し、25 個のアミノ酸からなるペプチドで、14 番目の Asn が糖鎖修飾を受けている特色あるペプチドであり、Big angiotensin-25(Bang-25)と命名した。本ペプチドにキマーゼを作用させると速やかに AngII が生成されるのに対し、レニンには抵抗性があった。また、Bang-25 の C 末認識抗体を利用して免疫染色による分布を検討したところ、心臓や副腎髄質、腎臓のポドサイトをはじめ生体内に幅広く分布していることが明らかになった。以上の結果、Bang-25 はヒト RA 系の新たな構成要素と考えられ、循環調節や循環器・腎疾患の病態に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究ではごく最近研究代表者等が発見した RA 系の新たな構成要素と考えられる Bang-25 の生体内での役割を検討することで、新たな循環調節機構を明らかにし、さらに Bang-25 の測定系を確立・利用して、臨床診断学的意義を検証する。具体的には次の 5 つのサブテーマで研究を推進する。

【サブテーマ 1】Bang-25 の生体内の分布

【サブテーマ 2】RA 系構成因子としての Bang-25 の意義

【サブテーマ 3】合成 Bang-25 を用いた生理

学的・薬理学的作用

【サブテーマ 4】Bang-25 を生合成する酵素

【サブテーマ 5】Bang-25 の測定系の臨床診断学的応用の可能性

3. 研究の方法

本研究では研究代表者等が独自に単離・構造決定した RA 系の主要な構成因子と考えられる Bang-25 の生体内での役割を明らかにすることで、Bang-25 による新たな循環調節機構を明らかにするとともに、診断薬としての可能性についても評価する。具体的には次の 5 つのサブテーマで研究を推進するが、初年度はまず Bang-25 の測定系の開発と抗体と測定系を用いた分布の検討を実施する。また、合成 Bang-25 を用いた薬理学的・生理学的作用の検索を初年度は循環器系に対する作用を中心に検討し、他の作用に関しては 2 年目以降に検討する。Bang-25 が結合する組織や細胞の検討も初年度に実施する。Bang-25 を生合成する酵素に関しては、Bang-25 の存在量が多い組織に酵素が存在すると考えられるので、生体内分布や Bang-25 を産生している細胞を同定した後に実施する。臨床診断学的な応用の可能性の検討に関しては、初年度は測定系の確立を実施し、平成 27 年度目以降に臨床研究を実施する。

【サブテーマ 1】Bang-25 の抗体を用いて、ラジオイムノアッセイ(RIA)による測定系を確立する。本 RIA を用いて、Bang-25 の組織分布を明らかにする。また、免疫染色により、Bang-25 の局在を明確にする。さらに、正常組織に加えて、病的な組織での検討も行う。

【サブテーマ 2】Bang-25 はキマーゼにより、速やかに AngII に変換される。ヒト組織や培養細胞において、Bang-25 がレニンやキマーゼにより、AngI や AngII に変換されるかを検討する。また、各種培養細胞からの Bang-25 の分泌を検討する。

【サブテーマ 3】Bang-25 が AngII に変換して作用する可能性以外に、Bang-25 自体がホルモンとして作用している可能性も考えられる。実験動物に合成 Bang-25 を急性あるいは慢性投与し、循環動態の変化や各種循環調節因子の変動を明らかにする。また、125I でラベルした Bang-25 を動物に投与し、結合部位を明らかにする。結合した組織や細胞に対して、合成 Bang-25 を用いて作用を検討する。

【サブテーマ 4】Bang-25 は前駆体蛋白のアンジオテンシノーゲンより、プロテアーゼでプロセッシングを受けて生合成されると考えられる。【サブテーマ 1】で確立した Bang-25 の測定系を利用して、Bang-25 生合成酵素のアッセイ系を確立し、アンジオテンシノーゲンより Bang-25 を生合成する酵素を明らかにし、精製とクローニングをめざす。

【サブテーマ 5】Bang-25 の高感度測定系を

確立し、循環器疾患や腎疾患の患者の血中および尿中の Bang-25 の測定を実施し、各種の臨床パラメーターとの関連を検討することで、循環器・腎疾患における病態生理学的意義を考察するとともに、臨床診断薬としての可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) Bang-25 の測定法の確立

Bang-25 の測定系としてラジオイムノアッセイ (RIA) やサンドウィッチ ELISA の系の確立を試みた。しかしながら、高感度の測定系を確立する事ができなかった。そこで Bang-25 の測定法の確立にはパーキンエルマー社の Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay (Alpha) LISA 法を利用した。その際に Ang II の N 末端に特異的な抗体と Bang-25 の C 末端に特異的な抗体を用いた。その結果 N 末端抗体をビオチン化し、C 末端抗体を Alpha LISA アクセプターに結合させる組み合わせがより高感度である事が明らかとなった。その後、アッセイバッファーの選択とビオチン化抗体の濃度を決定する事で Bang-25 の Alpha LISA 法を確立する事ができた。Alpha LISA 法は、Ang I のような Bang-25 よりも短いアンジオテンシンペプチド、また Aogen のような長いアンジオテンシンペプチドを認識せず、特異性の高い測定系であると考えられた。

(2) Bang-25 の生体内の分布

確立した Bang-25 の測定系を用いてヒトの尿・血液・組織中の Bang-25 濃度を測定した結果、尿中の Bang-25 が血中よりも数十倍多い事が明らかとなった。さらに胎盤組織抽出液からも Bang-25 が測定可能であった。尿中 Bang-25 は Ang I や Ang II よりも高濃度で存在しており、また胎盤組織中には Ang I は低濃度であるにもかかわらず Bang-25 と Ang II が多く存在している事から、レニン非依存性の RA 系の存在が示唆された。

(3) Bang-25 の測定系の臨床診断学的応用の可能性

腎臓疾患患者を含むおよそ 200 検体のヒト尿中 Bang-25 を測定した結果、糸球体濾過量 (eGFR) と負の相関が見られたが、尿タンパクとは相関していなかった。また、糖尿病患者についても尿中 Bang-25 を測定したところ糖尿病患者の尿中 Bang-25 が健常コントロールよりも高い事が分かった。加えて尿中アルブミンとは別の病勢を反映している可能性が示唆された。つまり、尿中 Bang-25 は腎疾患における腎障害の程度を反映しているおり、また糖尿病と関連していると考えられた。

(4) Bang-25 の生成・変換経路の解明

さらに Bang-25 の生成・変換機構を明らかにするために作用酵素の特異性を決定していると考えらる Aogen の糖鎖の構造解析を行った。方法は、ヒト血漿由来の 200 μ g の Aogen をリシルエンドペプチダーゼによっ

て消化後、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) で 14 番目糖鎖のみを含む断片を精製し、ジスルフィド結合を切断したのちに RP-HPLC で精製を行った。精製後、3D マッピング法により糖鎖の構造を決定した。精製にはアンジオテンシン関連ペプチドをすべて認識できるような Ang II の N 末を認識する RIA で活性を確認しながら行った。その結果、Aogen の 14 番目の糖鎖を含む断片のみをおよそ 3 μ g 精製する事ができた。糖鎖解析の結果、Aogen の 14 番目の糖鎖は少なくとも 3 種類、存在する事が明らかとなった。Aogen の 3 種類の糖鎖のうちの 1 つは Bang-25 と同じ事から、Bang-25 の糖鎖は Aogen 由来であると考えられた。また Bang-25 はレニンによる Ang I 生成に抵抗性を示すが Aogen は 14 番目の糖鎖がないとレニンによって Ang I を生成する事ができないという報告がある事から、14 番目の糖鎖の種類によって Aogen から Bang-25 もしくは Ang I など生成されるアンジオテンシン関連ペプチドの種類が変化する可能性が示唆された。

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 5 件)

Nagata S, Yamasaki M, Kitamura K, : Anti-Inflammatory Effects of PEGylated Human Adrenomedullin in a Mouse DSS-Induced Colitis Model. Drug Dev Res, 査読有, 78(3-4), 129-134, 2017.

永田さやか, 北村和雄: 新規アンジオテンシンペプチドの同定と機能解析: ビッグアンジオテンシン-25, Angiotensin Research, 査読無, 12(2): 24-30 (2015)
永田さやか, 北村和雄: 新規アンジオテンシンペプチドであるビッグアンジオテンシン-25 と組織レニン・アンジオテンシン系, 比較内分泌学会誌, 査読無, 41(156): 105-110 (2015)

永田さやか, 北村和雄: レニン・アンジオテンシン系の新展開: ヒト尿中の主要なアンジオテンシン関連ペプチド「ビッグアンジオテンシン-25」の発見, 血管, 査読無, 37(2): 21-27 (2014)

永田さやか, 北村和雄: レニン・アンジオテンシン・アルドステロン (RAA) 系 2. ビッグアンジオテンシン-25: ヒト尿中の主要なアンジオテンシン関連ペプチド, 最新医学 高血圧をめぐる最新の話題, 査読無, 69(11): 80-90 (2014)

[学会発表](計 24 件)

【国内学会】

永田さやか, 山崎基生, 北村和雄: 学習・記憶障害に対する持続性アドレノメデュ

リン誘導体の効果.第 91 回日本内分泌学会学術総会、フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎県・宮崎市)(2018 年 4 月 28 日)

Nagata S, Kitamura K: Big angiotensin-25 (Bang-25): a novel glycosylated angiotensin-related peptide isolated from human urine. 第 95 回日本生理学会大会、サンポートホール高松(香川県・高松市)(2018 年 3 月 28 日)

永田さやか、山崎基生、北村和雄: 高血圧発症を抑制する持続性アドレノメデュリン誘導体の創製.第 40 回日本高血圧学会総会、ひめぎんホール(愛媛県・松山市)(2017 年 10 月 20 日)

永田さやか、山崎基生、北村和雄: 持続性アドレノメデュリン誘導体の創製.第 21 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)(2017 年 12 月 10 日)

山崎基生、永田さやか、北村和雄: 炎症性腸疾患モデルにおけるアドレノメデュリン投与の効果:平成 29 年度日本生化学会九州支部例会、宮日会館(宮崎県・宮崎市)(2017 年 5 月 13 日)

永田さやか、北村和雄: アンジオテンシノーゲンの糖鎖構造解析.第 89 回日本内分泌学会学術総会、国立京都国際会館(京都府・京都市左京区)(2016 年 4 月 22 日)

永田さやか、北村和雄: ビッグアンジオテンシン-25: ヒト尿中の主要なアンジオテンシン関連ペプチド.第 33 回内分泌代謝学サマーセミナー、久山温泉 ホテル夢家(福岡県・久山町)(2016 年 7 月 14 日) 口頭発表

永田さやか、北村和雄: アドレノメデュリンの医薬品としての研究開発.第 7 回ペプチド・ホルモン研究会、久留米ホテル エスプリ(福岡県・久留米市)(2016 年 9 月 17 日)

永田さやか、福田顕弘、佐藤祐二、長友優尚、油屋順子、藤元昭一、北村和雄: 糖尿病患者における尿中ビッグアンジオテンシン-25.第 39 回日本高血圧学会総会、仙台国際センター(宮城県・仙台市)(2016 年 10 月 2 日)

永田さやか、北村和雄: 組織アンジオテンシン II 生成における新規ペプチドの単離.日本動物学会 第 87 回 沖縄大会 2016、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)(2016 年 11 月 17 日) シンポジウム

永田さやか、福田顕弘、佐藤祐二、長友優尚、油屋順子、藤元昭一、北村和雄: 尿中ビッグアンジオテンシン-25 測定法の開発.第 20 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、東京コンベンションホール(東京都・中央区京橋)(2016 年 12 月

17 日)

永田さやか、北村和雄: 新たなアンジオテンシン関連ペプチド: ビッグアンジオテンシン-25.第 88 回日本内分泌学会学術総会、ホテルニューオータニ(東京都・千代田区)(2015 年 4 月 24 日)

永田さやか、北村和雄: ビッグアンジオテンシン-25: ヒト尿中の主要なアンジオテンシン関連ペプチド.第 33 回内分泌代謝学サマーセミナー、柳川藩主立花邸御花(福岡県・柳川市)(2015 年 7 月 9 日)

永田さやか、福田顕弘、佐藤祐二、藤元昭一、井田隆徳、桑迫健二、渡嘉敷真理子、北村和雄: 新たな尿中アンジオテンシン関連ペプチドであるビッグアンジオテンシン-25 の測定系の確立.第 38 回日本高血圧学会総会、ひめぎんホール(愛媛県・松山市)(2015 年 10 月 9 日)

永田さやか、福田顕弘、佐藤祐二、藤元昭一、井田隆徳、桑迫健二、渡嘉敷真理子、北村和雄: 新たな尿中アンジオテンシン関連ペプチドであるビッグアンジオテンシン-25 の測定系の確立.第 19 回日本心血管内分泌代謝学会学術集会、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)(2015 年 12 月 11 日)

永田さやか、北村和雄: Big angiotensin-25: ヒト尿中の主要なアンジオテンシン関連ペプチドの発見.第 35 回日本循環制御医学会総会、九州大学医学部百年講堂(福岡県・福岡市)(2014 年 7 月 4 日)

永田さやか、北村和雄: アンジオテンシノーゲンの 14 番目アミノ酸に結合する N 型糖鎖の構造解析.第 37 回日本高血圧学会総会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)(2014 年 10 月 18 日)

【国際学会】

Nagata S, Kitamura K: Big angiotensin-25: a novel component of the renin angiotensin system. Angiotensin Gordon Research Conference. Four Points Sheraton / Holiday Inn Express, (Ventura, CA, USA)(2018 年 2 月 19 日)

Nagata S, Yamasaki M, Kitamura K: Anti-inflammatory effects of PEGylated human adrenomedullin on DSS-induced colitis in mice. CGRP Family Peptides Conference 2018. Hilton Santa Fe Historic Plaza, (Santa Fe, NM, USA)(2018 年 2 月 13 日)

Nagata S, Yamasaki M, Kitamura K: Persistent adrenomedullin derivative inhibits development of hypertension. AHA Council on Hypertension 2017. Hyatt Regency San Francisco (San Francisco, USA)(2017 年 9 月 15 日)

Nagata S, Kitamura K: Big

angiotensin-25 (Bang-25): a novel glycosylated angiotensin-related peptide isolated from human urine. ISH2016 satellite symposium, Renin-angiotensin-aldosterone system, コンGRESスクエア日本橋(東京・中央区日本橋)(2016年9月23日)

Nagata S, Tokashiki M, Kitamura K : Structural analysis of glycosyl chain at 14th amino acid of angiotensinogen in human plasma. The 26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Coex (Seoul, Korea) (2016年9月27日)

Nagata S, Tokashiki M, Kitamura K : Structural analysis of glycosyl chain at 14th amino acid of human angiotensinogen in plasma. Council on Hypertension 2015, OMNI SHOREHAM (Washington DC, USA) (2015年9月18日)

Nagata S, Kitamura K : Big angiotensin-25: a novel glycosylated angiotensin-related peptide isolated from human urine . The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014、京都グランヴィアホテル(京都府・京都市)(2014年9月10日)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 和雄 (Kitamura, Kazuo)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：50204912

(2) 研究分担者

鶴田 敏博 (Tsuruda, Toshihiro)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：10389570

加藤 丈司 (Kato, Johji)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合セン

ター・教授

研究者番号：20274780

桑迫 健二 (Kuwasako, Kenji)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合セン

ター・准教授

研究者番号：20381098