

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860173

研究課題名(和文)高分子量型リポカリン2の糖鎖配列と産生メカニズムの同定

研究課題名(英文) Identification of the glycosylation and generation mechanisms of high-molecular weight type of lipocalin 2

研究代表者

藤原 葉子 (FUJIWARA, Yoko)

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：50392494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：尿中LCN2は腎障害を早期発見するバイオマーカーとして知られ、急性腎障害に高感受性をもつ指標である。しかし、LCN2は全身性に存在し、腎障害と併発する様々な組織障害においても検出される問題がある。本研究では尿特異的に見られる高分子量型LCN2の由来組織、産生機構、および分泌メカニズムの解明を試みた。炎症モデルマウスのLCN2の糖鎖型は尿、血清、腎臓などでは複合型であったが、肝臓などでは混合型であった。また、尿中高分子量型LCN2は血中より高度に糖鎖が付加され、腹腔内炎症で出現することが分かった。このことから、LCN2は多様な糖鎖を持ち、尿中LCN2の分子量は病態により異なることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Urinary glycoprotein lipocalin 2 (LCN2) has been noted as a sensitive biomarker for acute kidney injury. However, LCN2 could be detected in various disorders associated with the nephropathy since LCN2 is expressed in a variety of tissues. Here we try to identify high-molecular weight LCN2-producing tissues and clarify synthesis and secretion mechanisms of urine specific high-molecular weight LCN2. LCN2 was identified as complex-type glycan in urine, serum, and kidney in inflammatory model mice. On the other hand, hybrid-type glycosylated LCN2 was detected in liver. In addition, high-molecular weight LCN2 in urine was more glycosylated than that in serum and was appeared under intraperitoneal inflammation. These results indicate that LCN2 has a variety of glycosylation and the molecular weight of urinary LCN2 could differ among diseases.

研究分野：内分泌学

キーワード：腎障害 バイオマーカー 糖鎖 細胞極性 疾患動物モデル

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害は罹患すると死亡率の高い疾患である。以前より、腎障害診断の指標として血中クレアチニン値、尿素窒素値の上昇が用いられていたが、いずれも症状が進んでから検出可能となることから、これらに代わる腎障害早期発見バイオマーカーの開発が行われてきた。そして近年、いくつかの早期発見マーカー候補が同定されつつあり、その中の一つにLipocalin 2 (LCN2)が見出された。LCN2自身は鉄含有小胞シテロフォアに結合することで細胞内へ鉄を運搬し、細菌感染などから細胞を保護する役割を果たすと考えられている。その発現部位は好中球他、腎臓、肺、肝臓を含む多くの末梢組織で報告されている。血中LCN2は低分子ゆえに腎糸球体濾過を通過するが、近位尿細管からスカベンジャー受容体メガリンを介してほぼすべて再吸収され、正常状態では尿中で検出されない。尿中LCN2が検出されるには、受容体(メガリン)の競合阻害や細胞崩壊による近位尿細管での再吸収阻害や、腎組織から直接尿中に排出されることが原因であると考えられている。しかしながら、LCN2は細菌感染や炎症反応によっても発現が上昇し、血中や尿中で検出されるため、腎障害に対する特異性に欠けることが懸念されている。

これまで、申請者らは薬物性腎障害モデル動物を用いて組織障害を早期発見するバイオマーカーの探索に携わっており、尿には血清や腎臓に見られるものと同じ22 kDaのLCN2以外に、24 kDaの尿特異的な高分子量型のLCN2が存在することに着目した。尿中LCN2の分子量の違いはN型結合糖鎖の分子量の差に起因するものと考えられるが、その存在意義についての詳細な検討はない。高分子量型LCN2は血清中では検出できないことから、その由来には腎臓から腎後性組織が関係し、血清由来と腎由来を含む22 kDaの尿中LCN2よりも組織障害を示すバイオマーカーとしての有用性が高いことが示唆される。従って、尿特異的に検出される高分子量型LCN2が存在する背景を明らかにすることで、薬物開発や臨床応用に貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、高分子量型LCN2の糖鎖構造を調べることで、高分子量型LCN2の産生機構と分泌メカニズムを明らかにすることを目標とする。従って、研究試料は細胞から動物個体レベルの範囲を想定して研究を行い、申請期間中、以下の項目を遂行する。高分子量型LCN2が出現する疾患の適用範囲について、疾患動物モデルを作成して調べる。LCN2の糖鎖配列を予測し、それを基として由来組織を同定する。培養細胞を用いてLCN2の分泌と糖鎖修飾

との関係を解明する。

3. 研究の方法

(1)モデル動物の作成：雄8週齢のBALB/cマウス(日本SLCより購入)にLipopolysaccharide (LPS)を腹腔内に1 mg/kgで投与し、6時間後に随時尿を採取した。その後、採血を行い、肺、肝臓、腎臓、尿管、膀胱を抽出した。LPS投与マウスと尿中LCN2の出現を比較するため、片側尿管結紮モデル(UUO)を作成した。右側の尿管を結紮した後、3日間回復させたUUOマウスの腎盂に蓄積する尿(腎盂尿)および膀胱尿を採取した。また、炎症惹起とLCN2との関係を検討するため、LPS投与1時間前にDexamethasone (DEX)を5 mg/kgで腹腔内投与し、ステロイドによる炎症抑制による尿中LCN2タンパクの変動を検討した。

(2)LCN2の糖鎖型の解析：採取した末梢組織、血清、および尿試料について、ほぼ全ての型のN型糖鎖を切断するPNgaseF、hybridまたはhigh mannose型のN型糖鎖を切断するEndoglycosidase H、そして糖鎖側鎖末端のシアル酸のみを切断するNeuraminidaseの3種の糖鎖切断酵素で処理した。その後、SDS-PAGEでタンパク質を分離し、ウエスタンブロッティングによりLCN2特異的なバンドを検出して、各末梢組織と血中、尿中LCN2の分子量の差異を調べた。

(3)培養細胞を使ったLCN2分泌実験系の構築：LCN2分泌機構の培養細胞モデル構築を目的としてイヌ腎尿細管上皮由来MDCK細胞株をインサートフィルター上で3日間培養し、層状の細胞を形成して細胞に極性を持たせた。極性形成はヒトCD59由来グリコシルフォスファチジルイノシトール(GPI)アンカー配列とGFPタンパクを融合し、MDCK細胞に発現させてGPI蛍光タンパクが管腔側へ局在することで確認した。この細胞にマウスLCN2の形質導入を行い、上層あるいは下層培養液中に分泌されたLCN2の濃度を測定した。

4. 研究成果

(1)炎症モデル動物でのLCN2タンパク出現とステロイドの効果：2種類の炎症モデル動物を解析した結果、糖鎖型の異なる尿中LCN2を出現させることに成功した。LPS投与マウスの肺、肝臓、腎臓、尿管、膀胱、血清、随時尿を採取し、LCN2の誘導をウエスタンブロッティングにて解析すると、24 kDaのLCN2は尿中のみ明確に出現した。一方、血清中に見られる22 kDaのLCN2は採取した試料全てで検出された。即ち、LPS投与マウスでは尿中LCN2には22 kDaと24 kDaの2種類が

存在した。一方、UUO マウスでは、腎盂尿には 22 kDa の LCN2 が顕著に現れ、膀胱尿には 24 kDa の LCN2 が検出される傾向にあった。DEX の前投与は LPS 投与による炎症惹起性サイトカイン Interleukin 1- β の上昇を抑えたが、血中および尿中 LCN2 上昇には影響を与えなかった。これらのことから、特に高分子量型の 24 kDa の LCN2 は腹腔内炎症に敏感に反応して尿中に現れる可能性があることが示唆された。また、尿中 LCN2 の上昇は炎症惹起性サイトカイン以外の因子に制御されていることが推測された。

(2) LCN2 糖鎖型の同定：糖鎖切断酵素による糖鎖型の予測を行った結果、LCN2 は尿、血清、組織間で異なる糖鎖型を持つことを明らかにした。尿中の高分子量 LCN2 の由来を予測するため、LPS 投与マウス尿中 LCN2 と末梢組織中の LCN2 について、各種糖鎖分解酵素に対する感受性を調べた。2 種類の尿中 LCN2 は PNGase F 処理により糖鎖付加を受けない 20 kDa の LCN2 単体となり、Endoglycosidase H では糖鎖を切断することはできなかった。また、Neuraminidase は 2 種の尿中 LCN2 のシアル酸を除去することができた。血清、肺、腎臓 LCN2 は尿中 LCN2 と同様の感受性を示し、これらはすべて複合型糖鎖を持つことが分かった。一方、肝臓、尿管 LCN2 の糖鎖は Endoglycosidase H により切断されると同時に、Neuraminidase の影響を受けなかったことから、これらは混合型糖鎖を持つことが明らかとなった。24 kDa の尿中高分子量型 LCN2 は、今回採取されたいずれの組織でも検出することはできず、由来の特定は今後の課題となった。しかしながら、これらの結果から、LCN2 は組織により異なる糖鎖付加を受けることが示され、病態により異なる糖鎖型を持って尿中に出現する可能性があり、臓器障害を分別するバイオマーカーとして適用が広がる可能性が示唆された。

(3) LCN2 分泌メカニズムの解析：上皮細胞 MDCK 細胞株を用いて LCN2 の極性分泌メカニズムを調べる実験系を構築し、LCN2 が apical (尿細管) 側へ分泌する条件を確立した。尿中への LCN2 分泌メカニズムと糖鎖修飾の関係を解析するため、研究当初は LCN2 が腎障害マーカーとして注目されていたことから、腎組織由来細胞株へ LCN2 を形質導入し培養上清を得た。しかしながら、22 kDa の糖鎖付加型の LCN2 のみが見られ、24 kDa の LCN2 は細胞体や培養上清中いずれにも検出されなかった。従って、LCN2 の糖鎖付加と分泌に関する課題を進める上で、モデルとなる培養細胞株の見直しが必要と考えられた。そこで、イヌ腎尿細管上皮細胞由来 MDCK

細胞に LCN2 を形質導入した後極性化させ、LCN2 の分泌を検討した。正常状態では、LCN2 は apical 側の培養上清に分泌される傾向にあった。この実験系により、今後 LCN2 の細胞内外の局在や分泌、および糖鎖配列との関わりを解析でき、尿中に出現する高分子量の LCN2 が存在する機序が予測でき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 5 件)

Fujiwara Y, Tsuchiya H, Sakai N, Shibata K, Fujimura A, Koshimizu TA. Lipopolysaccharide-induced inflammation or unilateral ureteral obstruction yielded multiple types of glycosylated Lipocalin 2. *J Inflamm (Lond)*. 2016. 13:7. doi: 10.1186/s12950-016-0116-5. 査読有.

Tsuchiya H, Hohjoh H, Fujiwara Y, Sugimoto Y, Koshimizu TA. Prostaglandin D2 elicits the reversible neurite retraction in hypothalamic cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016. 470:804-810. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.091. 査読有.

Sakai N, Saito Y, Fujiwara Y, Shiraki T, Imanishi Y, Koshimizu TA, Shibata K. Identification of protein arginine N-methyltransferase 5 (PRMT5) as a novel interacting protein with the tumor suppressor protein RASSF1A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015. 467:778-84. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.065. 査読有.

Kashiwazaki A, Fujiwara Y, Tsuchiya H, Sakai N, Shibata K, Koshimizu TA. Subcellular localization and internalization of the vasopressin V1B receptor. *Eur J Pharmacol*. 2015. 765:291-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.08.043. 査読有.

Arai K, Kashiwazaki A, Fujiwara Y, Tsuchiya H, Sakai N, Shibata K, Koshimizu TA. Pharmacological lineage analysis revealed the binding affinity of broad-spectrum substance P antagonists to receptors for gonadotropin-releasing peptide. *Eur J Pharmacol*. 2015. 749:98-106. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.01.001. 査読有.

[学会発表](計 10 件)

土屋裕義、藤村昭太、藤村昭夫、藤原葉子、輿水崇鏡：パゾプレッシン V1a 受容体とマウスの生殖機能. 第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 17 日、

長崎ブリックホール、長崎新聞文化ホール（長崎県長崎市）
土屋裕義、北條寛典、杉本幸彦、Ngamlertwong Nuttawadee、藤原葉子、奥水崇鏡：マウス視床下部神経細胞の突起形成へのプロスタグランジン D2 の作用。第 32 回日本下垂体研究会学術集会、2017 年 8 月 4 日、鬼怒川グランドホテル（栃木県日光市）
奥水崇鏡、柏崎亜樹、藤原葉子、土屋裕義、谷口淳一：バソプレッシン V1b 受容体の細胞内局在とナトリウムイオン感受性に関する研究。第 89 回日本薬理学会年会 2016 年 3 月 11 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
土屋裕義、藤村昭太、藤村昭夫、藤原葉子、奥水崇鏡：バソプレッシン V1a 受容体欠損マウスで観察される雌性生殖機能異常。第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 26 日、仙台国際センター / 東北大学川内北キャンパス（宮城県仙台市）
藤原葉子、土屋裕義、藤村昭夫、奥水崇鏡：尿中で検出可能な炎症性マーカー高分子型量 Lipocalin 2 の同定。第 134 回日本薬理学会関東部会、2016 年 7 月 9 日、国際医療福祉大学（栃木県大田原市）
奥水崇鏡、柏崎亜樹、藤原葉子、土屋裕義、谷口淳一：バソプレッシン V1b 受容体刺激と内在化における外液イオン感受性。第 26 回バソプレッシン研究会 2016 年 1 月 9 日、慶應義塾大学（東京都新宿区）
Koshimizu T, Kashiwazaki A, Fujiwara Y, Tsuchiya H, Taniguchi J.: Extracellular sodium ion is essential for internalization of vasopressin V1B receptors. International Symposium on Pituitary Gland and Its Related Systems: 2016 年 9 月 2 日, Hawaii (USA)
土屋裕義、藤原葉子、奥水崇鏡：PGD₂ による視床下部神経細胞の突起退縮。第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 18 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）
藤原葉子、土屋裕義、奥水崇鏡：炎症および尿管閉塞における尿中高グリコシル化リポカリン 2。第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 20 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）
柏崎亜樹、藤原葉子、土屋裕義、奥水崇鏡：V1b バソプレッシン受容体内在化機構の解明と制御。第 130 回日本薬理学会関東部会、2014 年 7 月 5 日、星薬科大学（東京都品川区）

(1) 研究代表者
藤原 葉子 (FUJIWARA, Yoko)
自治医科大学・医学部・ポストドクター
研究者番号：50392494