

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860633

研究課題名(和文)心腎連関における細胞外小胞Exosomesの役割と、心予後予測因子の開発

研究課題名(英文)The roles of exosomes in cardio-renal syndrome and development of new biomarker

## 研究代表者

加藤 規利(Kato, Noritoshi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：90716052

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)：心腎連関の機序には不明な点が多い。Exosomesは、細胞間情報伝達手段として注目を浴びており、腎線維芽細胞由来のExosomesが、遠隔臓器へ与える影響を検証した。腎線維芽細胞初代培養由来Exosomesをマウスに投与したところ、全身に広く取り込みが認められた。活性化線維芽細胞株由来Exosomesは、血管内皮細胞の接着分子の発現を抑制した。一方でPIGF発現を増強し、ABCA1を抑制した。

Exosomesによって、血管内皮の遺伝子発現が変化することがわかった。PIGF、ABCA1発現は実際の腎疾患患者に見られる変化と一致したが、接着分子の発現様式は血管保護的に働く可能性があった。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are small membrane vesicles, which have roles in intracellular communication. It is well known that CKD patients are at risk of cardiovascular diseases, but the mechanism is not fully understood. Under the hypothesis that exosomes are involved in cardio-renal syndrome, the aim of this study is to explore the role of exosomes from kidney fibroblasts on endothelial cells.

Labeled exosomes from kidney fibroblast distributed mainly in lung. Endothelial cells stimulated with exosomes from kidney fibroblast showed high expression of PIGF and low expression of Flt-1, ABCA1. This expression pattern was compatible with change in CKD patients. But, endothelial cells showed reduced expression of adhesion molecules, which was unmatched with known changes in CKD patients. We speculated that exosomes from activated kidney fibroblasts have ambivalent roles in atherosclerotic change by modulating the expression of adhesion molecules, metabolic factor, and VEGF system on endothelial cells.

研究分野：腎臓病

キーワード：核酸 循環器・高血圧 慢性腎臓病 エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

2007年に、細胞外小胞である Exosomes が、単に細胞内の不要な物質を細胞外に放出しているだけでなく、内部に mRNA, miRNA, 蛋白、DNA を含むことで、細胞間の情報伝達手段としての役割を持つことが明らかとなり、各分野において Exosomes 研究が盛んとなった。現在までに Exosomes 研究は、以下の広がりを見せている。(1) 疾患の病因論の解明 (2) 癌を含む疾患バイオマーカーへの応用 (3) Drug delivery system (DDS) への応用。

中でも (1) 病因論に関して、癌や免疫の領域での進歩は著しい物があるものの、腎臓領域での報告は乏しく、特に腎臓と、多臓器との臓器連関 (心腎連関) に関する報告は認めなかった。実際、慢性腎臓病 (CKD) 患者には、心血管病 (CVD) 合併が多く、CKD 患者にとって末期腎不全で透析療法を必要とする率よりも、CVD 等による死亡のリスクのほうが高いとさえ言われている。なぜ腎疾患を認める患者に、心臓、脳など遠隔臓器に障害の影響が及ぶのかに関しては、未知の部分が多い。また腎疾患、及び CVD は患者の日常生活レベルを著しく阻害する要因となりうるもので、疾患罹患率は社会的損失を意味するものとして捉えられる。

昨今注目を浴びる Exosomes が、その臓器連環の一端を担うのであれば、心腎連関の病因論の解明のみならず、CKD 患者の血中 Exosomes を調べることで、心疾患リスク診断のバイオマーカーとしても役立つ事が考えられる。

## 2. 研究の目的

CKD 患者の腎臓では、原疾患の如何によらず、従来のネフロン (尿細管、糸球体構造) は、コラーゲンなど細胞外マトリックスや、それらを産生する線維芽細胞へと置き換えられてゆく。この腎線維芽細胞は、その昨日

の違いから通常の線維芽細胞とは区別され、活性化腎線維芽細胞と呼ばれる。この患者腎臓で活発に増殖を続ける腎活性化線維芽細胞由来の Exosomes が、どのように全身の臓器に到達しているかを、遺伝子によってマーキングした Exosomes を追跡することで明らかにする。

活性化腎線維芽細胞由来 Exosomes が、心血管系、特に血管内皮細胞に及ぼす影響に関し、in vitro において血管障害に働く遺伝子群の発現の評価を行う。

患者血液から採取した Exosomes は、当然腎臓由来のものだけではなく、内皮、上皮細胞、さらには採血後の血小板が凝集する際にも放出されるため、産生細胞としては heterogeneous な物となる。腎臓由来の Exosomes をより選択的に回収するため、超遠心法と、免疫沈降法を組み合わせる事により選択的に回収。腎疾患のバイオマーカーとしての可能性を探る。

## 3. 研究の方法

(1) マウス腎臓線維芽細胞の初代培養と Exosome の抽出; 正常マウスと腎線維化モデルである片側尿管結紮 (UUO) マウスから腎臓を摘出し、腎線維芽細胞の初代培養を行った。

(2) Exosome の評価; 抽出した Exosome を Nano sight, 電子顕微鏡にてその形態、量を評価。質的評価としては western blot による表面マーカーの検出、また内包する RNA に関しては、Bioanalyzer による検証を行った。

(3) Exosomes の追跡; 線虫由来の遺伝子を Electroporation 法にて、UUO 腎由来のマウス線維芽細胞初代培養上清から抽出した Exosomes へ導入し、マウスへ尾静注した。どの臓器に取り込まれやすかったかを qPCR 法にて解析した。

(4) in vitro 血管内皮細胞刺激実験; ラット腎線維芽細胞株 (NRK-49f) を TGF- $\beta$  にて線

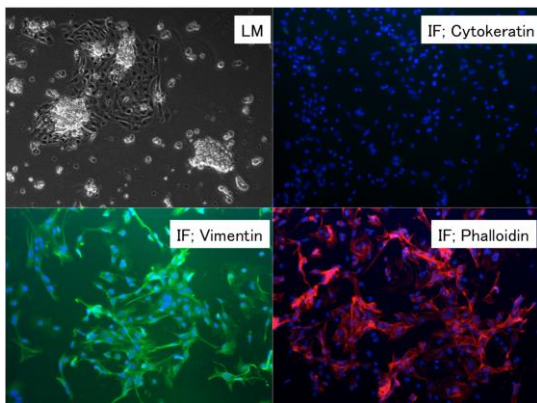
維芽細胞活性化刺激を行い、得られた Exosomes をラット大動脈血管内皮細胞 (RAOEC) と共培養し、qPCR 法にて動脈硬化に係る遺伝子群の発現を評価した。

(5)腎由来 Exosomes の特異的回収法の開発; マウスメサングウム細胞の表面抗原に対する抗体を、磁気ビーズに予め固相化し、患者由来血漿と incubation し、腎臓由来の Exosomes をある程度の特異度をもって回収した。回収した Exosomes の評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1)Exosomes の回収

マウス UUO モデルにて実験的な線維化腎を作成。まずは病腎より線維芽細胞の初代培養を行い、その細胞の表面マーカーを蛍光抗体法にて染色。Cytokeratin 陰性かつ、Vimentin, Phalloidin 陽性にて、線維芽細胞としてのキャラクターを確認した。(下図) また、 $\alpha$ -SMA 染色も行い、線維芽細胞の活性化状態についても評価し、UUO 腎からは活性化線維芽細胞が主体である事がわかった。



LM: Light Microscopy, IF: Immunofluorescence

次に、現在までに様々な Exosomes の回収法が報告されてきているが、我々は超遠心法を用いた conventional な手法にて、マウス腎線維芽細胞初代培養、およびヒト血漿からの Exosomes を回収した。電子顕微鏡にて観察し、形態が適切であること、また昨今 Exosomes 確認法として一般的になりつつある NanoSight にてサイズの確認を行い、十分に評価に値する Exosomes が回収出来ている

ことを確認した。(図1)その他にも、Western Blot による Exosomes 表面マーカー、Bioanalyzer にて内包する RNA の質的評価も含め、多角的に Exosomes を評価し、妥当な結果を得た。

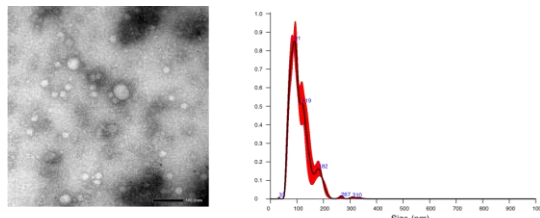
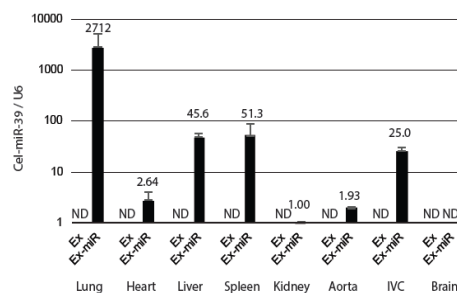


図1 ヒト血漿由来Exosomesの電子顕微鏡、Nano sightによる評価

##### (2)Exosomes の追跡

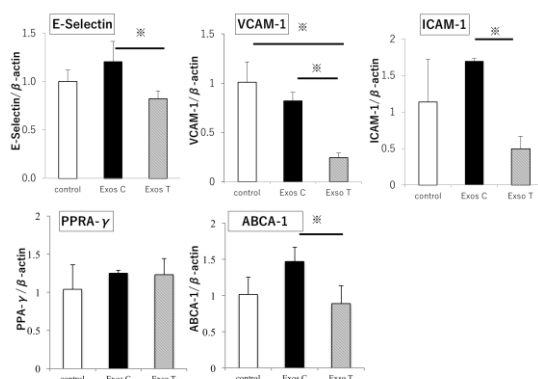
生体内で、腎組織由来の Exosomes がどの臓器に取り込まれやすいかについては、過去に報告はないが、臓器連関を読み解くに当たり、非常に重要な情報と考えられる。我々は、本来哺乳類の生体内に存在しない線虫由来の miRNA (Cel-miR-39) を、腎線維芽細胞初代培養上清由来の Exosomes に Electroporation 法にて導入し、マウスに経静脈的投与。各臓器への Cel-miR-39 の取り込みを評価するという、過去に報告のない、独創的な発想にて Exosomes の分布を評価した。結果、コントロールのマウスでは全く取り込みが見られなかったのに対し、線虫由来の miRNA を Exosomes とともに投与した群では、肺を第一に、網内系、血管に一定の取り込みが見られた。一方で Cel-miR-39 を単独で投与した際には、各臓器での取り込みは見られなかった。

(下グラフ) 腎線維芽細胞由来の Exosomes は、血液中で RNA を守り、各臓器へある程度の嗜好性を持って運搬されている事が証明された。



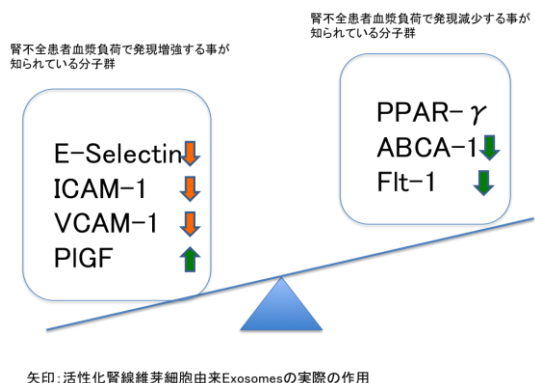
### (3) 腎活性化線維芽細胞由来 Exosomes の遺伝子発現調節効果

次に、体内で取り込まれた活性化腎線維芽細胞由来 Exosomes によって、受け手側の細胞にどのような影響が見られるのか、in vitro の系を用いて検証した。一般的に線維芽細胞と、活性化線維芽細胞は生体内における役割が異なるとされ、その活性化刺激として TGF- $\beta$  が広く認知されている。Exosomes 由来の遺伝子が、各臓器に取り込まれた時、まずは血管内皮細胞に影響が及ぶと仮定し、RAOEC を NRK-49f 由来 (Exos C)、及び TGF- $\beta$  にて活性化した NRK-49f 由来 Exosomes (Exos T) にて刺激し、RAOEC における遺伝子発現の変化を比較した。



結果は上記グラフに示したように、動脈硬化促進的に働くと言われる接着分子群 (selectin, integrin) の発現を負に調節し、血管保護的に働いているように見えた。一方で、血管保護因子である ABCA-1 の発現は、実際の CKD 患者に見られるケースと同じく、発現が抑制されていた。その他、PIGF の発現を増強し、Flt-1 の発現が抑制された事も、CKD 患者と類似した結果と言えた。つまり、活性化腎線維芽細胞由来の Exosomes は、一方で血管保護的に、もう一方で障害性に働くといった両価的な役割を持っていると想定された。従来心腎連関は、尿毒症物質、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系、体液量の変化等によってもたらされていると推定されており、その中で一部 Exosomes も

心腎連関に見られる変化において、両価的な役割を持っていることが推定された。(下図)



### (4) 腎細胞由来 Exosomes の特異的回収法

ほぼ全ての細胞が Exosomes を放出すると言われており、腎疾患バイオマーカーとして Exosomes を利用すると考えた場合、全ての血中の Exosomes から腎由来 Exosomes の微細な変化を捉えるよりも、判定をしたい腎細胞 (尿細管、メサンギウム細胞等) 由来の Exosomes を選択的に回収できることが望ましいとされる。バイオマーカー分野に関しては、腎線維芽細胞を、他の線維芽細胞と分けて回収することは困難で、腎メサンギウム細胞に着目をした。文献的な考察、および in vitro の結果からメサンギウム細胞表面マーカーを同定し、その分子に対する抗体 (抗体 X) を固相化した磁気ビーズを作成。メサンギウム細胞由来の Exosomes を in vitro にて、またヒト血中より同じビーズを用いて Exosomes の回収が正しくできたことを、電子顕微鏡を用いた観察で確認した。(図2) また更に、得られたビーズから、付着した Exosomes 由来の RNA を回収し、Bionanalyzer にて収量や RNA の品質を確認した。

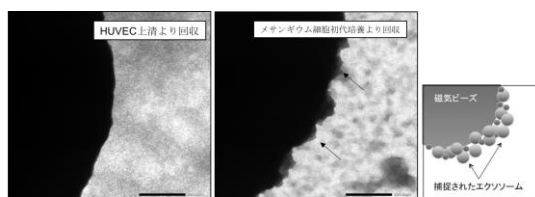


図2 磁気ビーズによるExosomesの捕捉  
培養メサンギウム細胞由来Exosomesを選択的に回収している

## 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)

[学会発表] (計3件)

1. 加藤規利, 西尾文利、丸山彰一、松尾清一、腎疾患診断に適した新規エクソソーム採取法, 第58回日本腎臓学会学術総会, 2015/6/6, 愛知県名古屋市, 名古屋国際会議場
2. Noritoshi Kato, Fumitoshi Nishio, Takuji Ishimoto, Tomoki Kosugi, Naotake Tsuboi, Shoichi Maruyama, Seiichi Matsuo, A new method to capture exosomes for diagnosis of glomerulopathy, 52<sup>nd</sup> ERA-EDTA congress, 2015/5/29, London, UK
3. Noritoshi Kato, Fumitoshi Nishio, Takuji Ishimoto, Tomoki Kosugi, Naotake Tsuboi, Shoichi Maruyama, Seiichi Matsuo, A new method to capture exosomes for diagnosis of glomerular diseases, International Society for Extracellular Vesicles 2015 Annual meeting, 2015/4/23, Bethesda, MD, USA

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 腎疾患診断のためのエクソソーム回収法

発明者: 加藤規利

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 2015-196263

出願年月日: 2015年10月1日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 規利 (KATO, Noritoshi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号: 90716052

(2)研究分担者

なし