

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893209

研究課題名(和文)組織アンジオテンシンII生成におけるビッグアンジオテンシン-25の役割の解明

研究課題名(英文)Clarification of the role of Big angiotensin-25 in the tissue angiotensin II generation.

研究代表者

永田 さやか(NAGATA, SAYAKA)

宮崎大学・医学部・研究員(特任助教)

研究者番号：00452920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ビッグアンジオテンシン-25(Bang-25)の測定系を確立し、ヒト尿中のBang-25を測定した。腎臓疾患患者の尿中Bang-25濃度は、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ていなかった。糖尿病患者では、尿中Bang-25濃度が健常人よりも高かった。以上より、尿中Bang-25は腎障害の程度を反映していると考えられた。また、アンジオテンシノーゲン(Aogen)の14番目の糖鎖解析の結果、糖鎖は少なくとも3種類存在する事が明らかとなり、糖鎖の違いによってAogenからBang-25もしくはアンジオテンシンIなど生成される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 an assay of big angiotensin-25 (Bang-25) and measured human urinary Bang-25. Negative correlation between the estimated glomerular filtration rate and urinary Bang-25 was found, but did not relate to the urine protein in patients with the kidney disease. When compared with diabetes mellitus patients, the urinary Bang-25 was significantly higher than healthy volunteer. These results suggest that urinary Bang-25 concentration may reflect the extent of kidney injury. In addition, we found that plasma Angiotensinogen (Aogen) has three types of glycosyl chain at position 14th amino acid. One glycosyl chain structure is identical to Bang-25 in urine. The structure of the glycosyl chain at position 14th amino acid of the human Aogen may be involved in the substrate specificity for renin or chymase.

研究分野：循環器内科

キーワード：ビッグアンジオテンシン-25 レニン・アンジオテンシン系 生理活性ペプチド バイオマーカー 循環器疾患 腎臓疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) レニン・アンジオテンシン系(RA系)：循環器・腎臓疾患患者数は年々、増加傾向にある。これらの疾患に関連している RA 系の研究は、国内外で幅広く行われており、RA 系の阻害薬は臨床の現場で欠かせないものとなっている。血中においては、循環血液中のアンジオテンシノーゲン(Aogen)が、レニンの作用によりアンジオテンシンⅠ(AngⅠ)に変換され、さらにアンジオテンシン変換酵素(ACE)によって AngⅡ となり RA 系の主要な作用が発揮される(血中 RA 系)。一方、組織中には独自の RA 系(組織 RA 系)が存在することが指摘されており、臓器障害に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、組織での AngⅡ の生成機構や役割に関しては不明な点が多い。

(2) プロアンジオテンシン-12(proang-12)の発見：研究代表者らは、組織 AngⅡ の合成機構や役割を明確にするために AngⅡ の N 末端を特異的に認識する抗体を作製し、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ラジオイムノアッセイ(RIA)を確立した。この RIA を用いてラット組織中のアンジオテンシン関連ペプチドの系統的探索を行ったところ、ラット小腸より AngⅠ の C 末に 2 個のアミノ酸が付加したペプチドを発見し、proang-12 と命名した。proang-12 は、ACE によって速やかに AngⅡ に変換され作用を発揮し、多くの組織で AngⅠ、AngⅡ よりも高濃度に存在していることから、組織 RA 系関連ペプチドであると考えられた。

(3) ビッグアンジオテンシン-25(Bang-25)の発見：proang-12 を発見した同じ方法論を用いてヒトでもアンジオテンシン関連ペプチドの系統的探索を行ったところ、ヒト組織においては分子量約 5000 のペプチドが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。2013 年に研究代表者らは本ペプチドの構造決定に成功し、Bang-25 と命名した。Bang-25 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る。ヒト Aogen はレニンの基質として速やかに AngⅠ を生成したが、合成 Bang-25 からのレニンによる AngⅠ 産生は遅いことが判明した。一方、キマーゼは Aogen に作用しないのに対し、合成 Bang-25 からはキマーゼにより速やかに AngⅡ が生産される事が明らかとなった。また、Bang-25 の C 末認識抗体を利用して免疫染色による Bang-25 の組織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。

これまでの研究により 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・腎臓疾患の病態に関与している可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

RA 系は、循環器・腎臓疾患の発症や進展において重要な役割を果たしている。しかしながら、組織中の AngⅡ 生成機構に関しては未だに不明な点が多い。Bang-25 は 2013 年に研究代表者らが発見したヒト尿中に存在する主要なアンジオテンシン関連ペプチドであり、組織 AngⅡ 生成機構に関与している可能性が高いと考えられる。つまり Bang-25 を含む RA 系関連ペプチドの組織内での作用機序と病態生理学的役割を明らかにすることで、心血管系の臓器障害の新しい診断・治療への応用が期待できる。そこで本研究の目的は(1) Bang-25 の測定系を確立し、(2) Bang-25 の組織内の分布と病態生理学的意義の解明および(3) Bang-25 の生成機構を解明する事で組織 AngⅡ 生成における Bang-25 の役割を解明したい。本研究を進める事で将来的な循環器・腎臓疾患における診断薬・治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

研究目的(1)の達成後に目的(2)(3)の研究を行い本研究の達成を目指す。すなわち、はじめに Bang-25 の全体を認識する抗体を作製し、簡便で特異的な測定系を確立する。また腎生検や剖検、手術時に得られたヒト組織もしくは疾患モデル動物の組織を Bang-25 の特異的な抗体を用いて免疫組織染色を行い Bang-25 の局在を明らかにする。その後、作製した測定系を用いて循環器・腎臓疾患患者の尿中や血中の Bang-25 濃度を各種臨床パラメータと比較する事によって Bang-25 の病態生理学的意義を明確にしていく。さらに組織中で Aogen から Bang-25 や AngⅡ が生成される機序について明確にするために Aogen の糖鎖構造を決定し、Aogen と作用酵素の関連を明らかにする。また、ヒト培養細胞や血液、疾患モデル動物を用いて Bang-25 生成酵素と阻害剤の探索を行い、組織 AngⅡ 生成機構を解明する。

4. 研究成果

(1) 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 AngⅡ 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 アクセプタビーズ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。

(2) 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。また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。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。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と考えられた。

(3) 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れる Aogen の糖鎖の構造解析を行った。方法は、ヒト血漿由来の 200 µg 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 末を認識するラジオイムノアッセイ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 µg 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 6 件)

Kuwasako K, Sekiguchi T, Nagata S, Danfeng Z, Hayashi H, Murakami M, Hattori Y, Kitamura K, Johji K: Inhibitory effects of two G protein-coupled receptor kinases on the cell surface expression and signaling of the human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun.* 470(4):894-899 (2016) 査読あり
DOI:10.1016/j.bbrc.2016.01.138.

Nagata S, Hikosaka T, Kitamura K: Effect of adrenomedullin administration in two rat models of experimental inflammatory bowel disease. *American Journal of Life Sciences.* 3(3-2):39-42 (2015) 査読あり
DOI:10.11648/j.ajls.s.2015030302.17.
Nagata S, Varagic J, Kon ND, Wang H,

Groban L, Simington SW, Ahmad S, Dell'Italia LJ, VonCannon JL, Deal D, Ferrario CM: Differential expression of the angiotensin-(1-12)/chymase axis in human atrial tissue. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 9(4):168-180 (2015) 査読あり
DOI:10.1177/1753944715589717.

Ahmad S, Varagic J, Groban L, Dell'Italia LJ, Nagata S, Kon ND, Ferrario CM: Angiotensin-(1-12): A Chymase-Mediated Cellular Angiotensin II Substrate. *Curr Hypertens Rep.* 16(5):429-436 (2014) 査読あり
DOI:10.1007/s11906-014-0429-9.

Varagic J, Ahmad S, Nagata S, Ferrario CM: ACE2: Angiotensin II/Angiotensin-(1-7) Balance in Cardiac and Renal Injury. *Curr Hypertens Rep.* 16(3):420-428 (2014) 査読あり
DOI:10.1007/s11906-014-0420-5.

Ferrario CM, Ahmad S, Nagata S, Simington SW, Varagic J, Kon N, Dell'Italia LJ: An evolving story of angiotensin-II-forming pathways in rodents and humans. *Clin Sci.* 126(7):461-469 (2014) 査読あり
DOI:10.1042/CS20130400.

[学会発表](計 17 件)

永田さやか、北村和雄：循環器・腎臓疾患の診断薬・治療薬開発を目指して：ビッグアンジオテンシン-25 の発見。Cardiovascular Translational Research Conference 第 12 回学術集会、グランドハイアット福岡 (福岡県・福岡市) (2016 年 1 月 30 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、Carlos M. Ferrario、北村和雄：ヒト心臓組織中におけるレニン・アンジオテンシン系。第 6 回ペプチド・ホルモン研究会、ホテルのときんぶら、金沢大学臨海実験施設 (石川県・能登町) (2015 年 10 月 17 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)

VonCannon JL, Varagic J, Nagata S, Ahmad S, Locke A, Wang H, Groban L, Kon ND, Ferrario CM: Age and angiotensin-(1-12) expression in human atrial tissue of

patients with left heart disease. Council on Hypertension 2015, Washington DC (USA) (2015年9月17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, Washington DC (USA) (2015年9月18日)
永田さやか、北村和雄: 新たな循環器・腎臓疾患の診断薬・治療薬開発を目指したビッグアンジオテンシン-25 の役割解明. Vascular Biology Innovation に関する研究助成 第 10 回研究発表会、ホテル椿山荘東京 (東京都・文京区関口) (2015年8月23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、北村和雄: アンジオテンシン関連ペプチドの系統的探索: ビッグアンジオテンシン-25 の単離・同定. 第 12 回 GPCR 研究会、日本科学未来館 (東京都・江東区青海) (2015年5月16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・千代田区紀尾井町) (2015年4月24日)
永田さやか、北村和雄: 新しい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 20 回アンジオテンシンカンファレンス、都市センターホテル (東京都・千代田区平河町) (2015年2月7日)
永田さやか、北村和雄: ビッグアンジオテンシン-25: 新しいアンジオテンシン関連ペプチドの発見. Cardiovascular Translational Research Conference 第 11 回学術集会、グランドハイアット福岡 (福岡県・福岡市) (2015年1月10日)
永田さやか、北村和雄: 循環器・腎臓疾患の診断・治療薬開発を目指したペプチド探索. 第 5 回ペプチド・ホルモン研究会、旭川医科大学 (北海道・旭川市) (2014年12月13日)
永田さやか: 循環器・腎臓疾患の診断・治療薬開発を目指したペプチド探索. 東京大学招待講演、東京大学先端科学技術研究センター (東京都・目黒区駒場) (2014年12月1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17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・京都市下京区) (2014年9月11日)

〔その他〕

○総説 (計 4 件)

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, 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, 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, 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 69 (11): 80-90 (2014)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 さやか (NAGATA, Sayaka)
宮崎大学・医学部・研究員 (特任助教)
研究者番号: 00452920