

尿中エキソゾーム分画中レドックス制御タンパクの臨床的意義につ

いての研究

研究代表者：糟野 健司（医学部 助教）

電話：0776-61-8478、メールアドレス：kasuno@u-fukui-u.ac.jp

共同研究者：吉田 治義（医学部 教授） 信川 泰成（医学部 助教）

概 要	臨床尿検体で可溶分画中及び尿中エキソゾーム分画中で尿中 TRX(thioredoxin-1)を測定し、急性腎障害の診断に有用かどうか検討した。
尿中可溶分画 TRX は急性腎障害で正常対照の 10 倍以上の有意な上昇を示した。他の腎疾患では有意な上昇を認めなかった。尿中 TRX レベルの推移が速やかにベースラインまで回復する症例は腎予後が良好であった。分画別測定では正常対照では TRX がエキソゾーム分画特異的にモノマーとして存在することが分かった。急性腎障害では TRX が沈査分画・エキソゾーム分画・上清分画のすべての分画に存在し、かつ TRX 結合蛋白のひとつである MIF(macrophage migration inhibitory factor)とヘテロマルチマーを形成している可能性が示唆された。このことから尿中 TRX は急性腎障害の診断に特異的で予後予測可能なマーカーであり、今後、プロテオーム解析等を行うことで病態解明につながる発展が期待される。	
関連キーワード	急性腎障害、尿、エキソゾーム、チオレドキシン、マクロファージ遊走阻止因子

研究の背景

臨床医学の急速な進歩にもかかわらず、現在も周術期急性腎不全患者の死亡率が 50 年前と変わらず 50%を上回り生命予後が不良であることが大きな問題となっている。これを克服するために、血清クレアチニンよりもリアルタイムに動く鋭敏なバイオマーカーを見出すことが急性腎不全患者の生命予後を改善するために必要とされている。研

究代表者は以前、マウス腎での虚血再還流実験にて、虚血後 12 時間の第一尿でチオレドキシン(TRX)が虚血前に比べ約 100 倍の濃度にまで増加し、72 時間後には虚血前の値まで減少することを始めて報告し、国際的に高く評価されている (*Kidney International*, Vol. 64 (2003), pp. 1273-1282)。

研究の目的

今回の研究では、実際の臨床尿検体で尿中 TRX を測定し急性腎障害の診断に有用かどうか検討し、さらに細胞から遊離、分泌された尿中エキソゾーム分画中の蛋白として TRX を測定するもので、これまで検出不可能であった微量の蛋白を高感度で細胞機能異常との関連で検出できる。エキソゾーム (exosome) は蛋白質代謝の研究から見つかった分泌小胞で、腎尿細管上皮細胞では管腔側の膜蛋白が被覆小嚢の細胞内陥入によりエンドソームに取り込まれ、エンドソームは融合して後期エンドソームあるいは巨大腔胞(multivesicularbody; MVB)を形成、細胞内で新たに合成された蛋白もゴルジ体をへて MVB に蓄えられ、そして MVB 内部に蓄えられた蛋白はエキソゾームといわれる直径 20-80nm の小胞膜に入った形で頂端部から尿流の中へ分泌されることが指摘されている。TRX の可溶性分画尿中レベルは急性尿細管障害の疾患マーカーになりうるものとして検討をすすめているが TRX や TRX 結合蛋白をエキソゾーム分画として検出することは、疾患の早期発見と病態解析に役立つと考えられる。本研究では、尿中エキソゾーム分画中レドックス制御タ

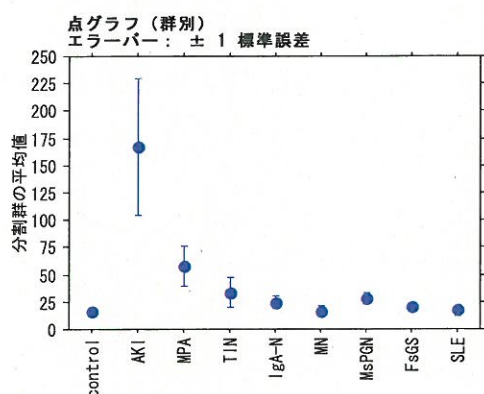
ンパクが臨床現場で急性腎障害のバイオマーカーとして有用であることを示し、早期診断による急性腎障害の予後改善に寄与することを目的とする。

研究の成果

当院入院患者 10 例と研究者（正常対照）を対象に可溶分画およびエキソゾーム分画の尿中チオレドキシンを ELISA・超遠心とウエスタンブロット法で測定を行った。

エキソゾーム分画を含む分画別測定には超遠心とウエスタンブロット法を用いた測定を行った。可溶分画での ELISA 法、エキソゾーム分画を含む分画別測定での超遠心とウエスタンブロット法はいずれも臨床検体を試料としてアッセイが成立することが分かった。

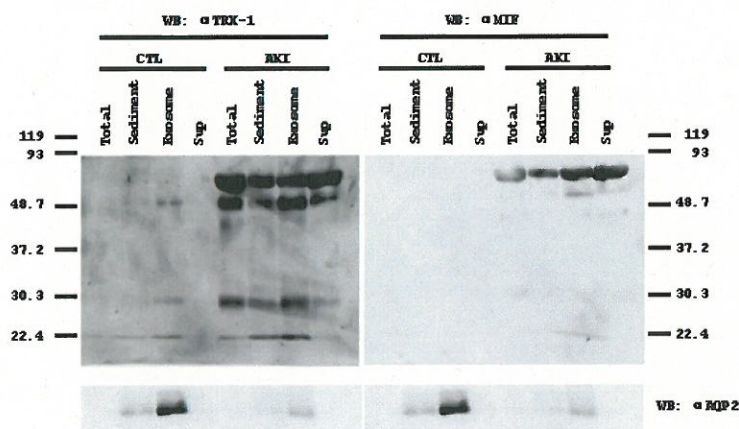
尿中可溶分画 TRX は急性腎障害で正常対照の 10 倍以上の有意な上昇を示した。他の腎疾患では有意な上昇を認めなかった。



尿中 TRX は急性腎障害発症初日にピークを示し、その後、急速に低下して低値を維持した。ピーク後の尿中 TRX がベースラインまで回復する症例は腎予後が良好であった。

分画別測定では正常対照では TRX (12kDa) がエキソゾーム分画に特異的にモノマーとして存在することが分かった。急性腎障害では TRX が沈査分画・エキソゾーム分画・上清分画のすべてに存在し、かつホモマルチマーまたはヘテロマルチマーとして存在する可能性が示唆された。TRX 結合蛋白のひとつである

MIF (macrophage migration inhibitory factor; 12kDa) を同様にウエスタンブロット法で測定したところ TRX と同じ高さに観察され、尿中 MIF が尿中 TRX とヘテロマルチマーを形成している可能性が示唆された。



マルチマー化は当初予想しなかった観察結果であり、今後、プロテオーム解析等を行うことで病態解明を含めた初期計画以上の成果につながる発展が期待される。

特記事項・発表論文など

「特記事項」途中経過を国際腎臓学会 ISN NEXUS
KYOT2010 で発表の予定。

「本研究に関わる発表論文」未発表