

## 研究助成 2015—生活習慣病領域—

## 研究成果報告書(最終) &lt;概要&gt;

所 属	宮崎大学 医学部 内科学講座 循環体液制御学分野
氏 名	永田さやか
研究テーマ	レニン非依存性の組織アンジオテンシン II 生成機構の解明

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- ・ 枚数は 1 ページにまとめること。(図表、写真などの添付を含む)

**【研究目的】**

レニン・アンジオテンシン系(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。そのため RA 系阻害薬は臨床の現場で欠かせないものとなっている。一方で組織中には独自の RA 系(組織 RA 系)が存在することが指摘されてきたが、組織でのアンジオテンシン II (Ang II)生成機構や役割に関しては不明な点が多い。申請者らは、プロアンジオテンシン-12(proang-12)やビッグアンジオテンシン-25(Bang-25)といった新しい RA 系関連ペプチドを発見した事で新しい Ang II 生成経路が予想され、これらの役割や生成機構を解明する事で循環器・腎臓疾患における診断薬や治療薬の開発に発展しようと考えた。そこで研究目的は以下の3点とした。(1) Bang-25 の簡便で特異的な測定系を確立する。(2) Bang-25 の組織内分布と病態生理学的意義を解明する。(3) Bang-25 の生成経路を解明する。以上より 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、循環器・腎臓疾患の臓器障害の新しい診断・治療への応用を目指す。

**【研究手法】**

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。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。さらに組織中でアンジオテンシノーゲン(Aogen)から Bang-25 や Ang II 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 Ang II 生成機構を解明する。

**【研究成果】**

(1) Bang-25 の測定系の開発: Bang-25 の測定系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をビオチン化し、Bang-25 の C 末端に特異的な抗体を Alpha LISA アクセプタービーズに結合して用いた。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決定を行う事で特異的な Bang-25 の Alpha LISA 法を確立する事ができた。

(2) 尿中 Bang-25 の測定意義: Bang-25 の測定系を用いて腎生検を行った患者の尿中 Bang-25 の測定を行った結果、Bang-25 は尿タンパクとは相関しなかったが、eGFR(推定糸球体濾過量)が 60mL/min/1.73m<sup>2</sup> よりも少ない場合に有意に尿中 Bang-25 濃度が高い事が判明した。特にポドサイトの障害が進んでいる病態で尿中 Bang-25 が増加している事が明らかとなった。さらに糖尿病患者と健常人ボランティアの尿中 Bang-25 の測定を行った結果、糖尿病患者は健常人と比較して尿中 Bang-25 が有意に高かった。また、eGFR が 60mL/min/1.73m<sup>2</sup> 以下の患者で、その濃度は有意に上昇していた。一方で尿中 Bang-25 は尿タンパクとは相関せず、尿中アルブミンとの相関も低かった。

(3) Aogen の 14 番目の糖鎖の構造解析: Aogen は 4 つの N 型糖鎖を有した糖タンパクである。14 番目の糖鎖の違いがレニンによる Aogen からの Ang I の生成に重要であると考えられたため、Aogen の糖鎖の構造解析を行った。糖鎖解析の結果、Aogen の 14 番目の糖鎖は少なくとも 3 種類存在し、そのうち 1 つは Bang-25 の糖鎖と同じ構造をしていた。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。



## 様式 4-2②

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>・ 国内外を問わない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2016年12月17日	第20回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、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。
2	2016年11月17日	日本動物学会 第87回 沖縄大会 2016、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。
3	2016年10月2日	第39回日本高血圧学会総会、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。
4	2016年9月27日	The 26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension、Sayaka Nagata, Mariko Tokashiki, Kazuo Kitamura：Structural analysis of glycosyl chain at 14th amino acid of angiotensinogen in human plasma.
5	2016年9月23日	ISH2016 satellite symposium, Renin-angiotensin-aldosterone system、Sayaka Nagata, Kazuo Kitamura：Big angiotensin-25 (Bang-25): a novel glycosylated angiotensin-related peptide isolated from human urine.
6	2016年7月14日	第33回内分泌代謝学サマーセミナー、永田さやか、北村和雄：ビッグアンジオテンシン-25の発見：循環器・腎臓疾患の診断・治療薬開発を目指して。
7	2016年4月22日	第89回日本内分泌学会学術総会、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。
8	2015年12月11日	第19回日本心血管内分泌代謝学会学術集会、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。
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2017年度中	Hypertens Res.
2	2017年度中	J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.
3	2017年12月	第8回ペプチドホルモン研究会
4	2018年2月	Angiotensin Gordon Research Conference
5	2018年3月	第95回日本生理学会 シンポジウム