

生活習慣病、腎尿路系疾患におけるマーカーとしてのIRAP/AT4 の意義

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2013-01-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 此下, 忠志, 横山, 修, 宮森, 勇, 牧野, 耕和 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/7023

生活習慣病、腎尿路系疾患におけるマーカーとしての IRAP/AT4 の意義

研究代表者： 此下 忠志（医学部・准教授）、

横山 修（医学部・教授）

共同研究者： 宮森 勇（医学部・教授）、

牧野 耕和（医学部・大学院生）

概 要
<p>DNAチップを用いたトランスクリプトーム解析により、高血圧や糖尿病に特有な発現変動遺伝子群をクラスター解析し、C9orf3、ACE2、IRAP/AT4 など、レニン-アンジオテンシン系遺伝子群が抽出された。RT-PCR を用いた解析で、IRAP/AT4 の発現低下が示唆された。IRAP/AT4 は受容体型アミノペプチダーゼであり、遺伝子の構造から約 800 アミノ酸配列分が Soluble Form となると想定された。3 か所の抗体作製イデオタイプ部位を設定し抗体を作成した。標準品をもちいて検量線の作製を試みたところ、ELISA としての測定系が成立することが確認され、さらに実際の血漿標本で測定し、測定感度以内に反応の確認される標本のあることが確認された。</p> <p>以上の通り、この測定系がほぼ完成したと考えられ、今後臨床症例の検体として血漿、尿での濃度を測定し、バイオマーカーとしての検討を進める。</p>
関連キーワード
網羅的発現遺伝子解析、レニン-アンジオテンシン系、AT4、IRAP、ENPEP

研究の背景

これまで我々は生活習慣病に関連し、レニン遺伝子転写調節 *cis*-element (*Kidney Int* 1996, *J Cell Biochem* 2004, *J Cell Biochem* 2007)、RAS 遺伝子型と累積腎生存率の関係 (*Clin Nephrol* 1998, *AJKD* 2001)、腎症組織の RAS 亢進を見出した (*Diabetes Care* 2006, *Endocrinology* 2007)。また全国規模のコホートを構築し、薬剤介入と RAS の関係を明らかにした (*Diabetes Care* 2009, *J Hypertens* 2010)。

これまで我々は、腎生検標本の RNA を用い、55,000 遺伝子転写物の網羅的解析により、糖尿病/高血圧など生活習慣病・腎尿路系疾患で特異的に変動するクラスターを抽出した。特異的に発現低下を示す遺伝子クラスター No 11 の Gene Ontology 解析と Pathway 解析によりアンジオテンシン II 消去系遺伝子群である C9orf3、ACE2、IRAP/AT4 などが抽出された (図 1)。

抽出された個別の遺伝子について RT-PCR 法を用いより正確に評価し (図 2)、糖尿病/高血圧において IRAP/AT4 (インスリン調節性アミノペプチダーゼ、別名、アンジオテンシン II 4 型受容体) の発現低下が強く示唆された。

正常腎と糖尿病/高血圧腎のクラスター解析

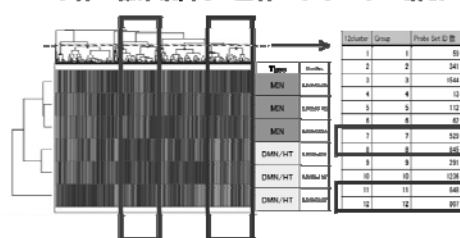


図 1

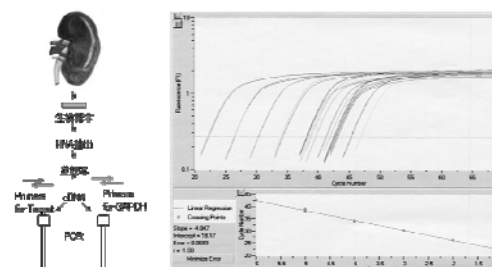


図 2

研究の目的

トランスクリプトーム解析により、高血圧や糖尿病に特有な発現変動遺伝子群をクラスター検索

し抽出された C9orf3、ACE2、IRAP/AT4 などのうち、発現低下が確認されている IRAP/AT4 につ

いて、測定系を確立し、臨床症例の検体として血清、尿での濃度を測定し、疾患の有無や病期にお

けるバイオマーカーとしての意義を検討する。バイオマーカーとしての可能性を検討する。

研究の成果

IRAP/AT4 は受容体型アミノペプチダーゼである。遺伝子の構造から Phe154 と Ala155 の間で分解され、約 800 アミノ酸配列分が Soluble Form となると想定される (図 3)。

可溶性部分のアミノ酸配列 3 か所の抗体作製イデオタイプ部位を各 19 残基で設定し (図 4)、ウサギを免疫し、3 イデオタイプの抗体を作成した。

作製された抗体を用い、標準品をもちいて検量線の作製を試みたところ、ELISA としての測定系

が成立することが確認された (図 5)。

さらに、実際の血漿標本で測定したところ、測定感度以内で、反応の確認される標本のあることが確認された (図 6)。

今回、トランスクリプトーム解析により得られたバイオマーカー候補である IRAP/AT4 について、測定系がほぼ完成した。今後、臨床症例の検体として血清、尿での濃度を測定し、バイオマーカーとしての意義を検討する。

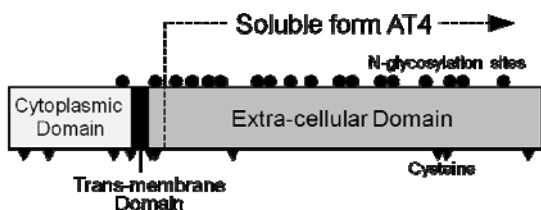


図 3

LNPEP(611)No.1/LNPEP(276)No.2

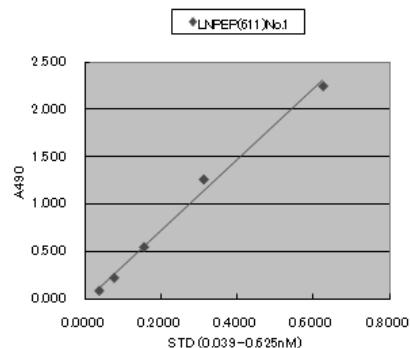


図 5

```

1 MEPTDWRDLQ LRRNTRISM FEEEPDVLAKKPCUHPLE PDENENEPKQ SLLVYKGLGE
61 HENEEDEEDY EBSNMLGMS FRRNRKQLN SATGTQSPD GAGSYPART MYCMTYVY
121 AKSNIVTYL LKPCITNEK3 CHHMOSEL IDPFRMLK FRRNRKQLT ANPLREYS
181 L-PHLISMTF RGSVTRVCA LQYVWML4 SICHHSRYT FRRNRKQEK QAELEWYH
241 GQANAFEA LLAGNHYLK IEYSANBS YSPYQSYT DEHNSKTA AIDPEFLAR
301 SAFPCEPA RKAIRIKI RDEQYALSN IYKSSVALD DGLVQDFSE SVMSYVLA
361 TNGCMBNLG GAVNGTWSI YAPQKQV IYALCTVNL LQYVWML4 QYFLKDLV
421 AFDPEAZMI ENWGLTFRE ETLLYSIS3 SMDRQVTK IAHLEHQRV PGNLYTMMW
481 NQUNLNEGRF TRNEYRLEK IRKELSSYED FLDHFRKTK IDSLNESHV SSSVQSECI
541 EGMFUSLYF KSSSLLMLK TYLSELPFH AVYULHNS YAKSGLDWH DSRFETWJ
601 LQVQSNMKTW TLQKSEFLI YKSKSEKELI QSERFLNKK PEGSDQSY WYHPLSYV
661 EGRVYKQYS VSLXQSQV NLTZYLVY KYNRMSYV MYVQDQNE ALHHLKIP
721 YVLSNDSBM UNIFELQ LKVPKRAF QUNYLMEN HIRATELF QITULYMLE
781 KLSYVQLAGR JYTRVRLQ HQQQQVWD ESTRNGELR SALLEPCTI NLSGOSTAN
841 KLFDDVWASN GTCSLPTDVI TTYRVGAKT DQVNGFLK YSKGEAK NQLEALSS
901 EDVRLYLM KSLNENFR TQNLSPRT VGRHFOHL ANDFKENVH MLKQVPLGS
961 YTDWVAGS TYLSTVTL SEVQFFBQ SEATRLRQY QAELEWML KQMEINLKS
1021 LTWAL
    
```

図 4

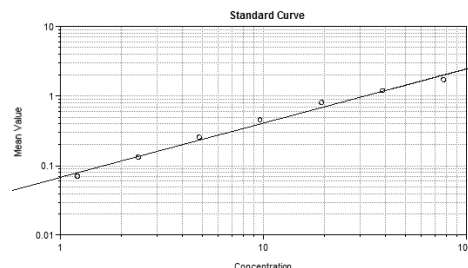


図 6

特記事項・発表論文など

「本研究に関わる発表論文」

Konoshita T* et al. A new generation N/L type calcium channel blocker leads to less activation of the renin-angiotensin system compared with conventional L type calcium channel blocker. *J Hypertens* 28: 2156-2160, 2010

Konoshita T*, et al. Genetic variant of the renin-angiotensin system and diabetes influences blood pressure response to angiotensin receptor blocker. *Diabetes Care* 32: 1485-1490, 2009

Fan C, Konoshita T, et al. Synergy of aldosterone and high salt induces vascular smooth muscle hypertrophy through

up-regulation of NOX1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 111: 29-36, 2008

Wakahara S, Konoshita T*, et al. Synergistic expression of ACE and ACE2 in human renal tissue and confounding effects of hypertension in the ACE/ACE2 ratio. *Endocrinology* 148: 2453-2457, 2007

Konoshita T*, et al. A Proximal Direct Repeat Motif Characterized as a Negative Regulatory Element in the Human Renin Gene. *J Cell Biochem* 102:1043-1050, 2007

Konoshita T*, et al. Tissue gene expression of renin-angiotensin system in human type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 29: 848-852, 2006