

尿中 nano-extracellular vesicles の腎臓病
における非侵襲バイオマーカーとしての
有用性に関する研究

2021 年 1 月

藤 高 啓 右

尿中 nano-extracellular vesicles の腎臓病
における非侵襲バイオマーカーとしての
有用性に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（生物工学） 学位論文

藤高 啓右

目次

第 I 章	序論	1
	腎臓の構造と機能	1
	慢性腎臓病の定義と病態, 疫学	3
	CKD の診断	6
	腎生検	8
	Nano-extracellular vesicles と Liquid biopsy	8
第 II 章	糸球体腎炎モデルを用いた尿中 NVs 中および腎組織中の mRNA 発現変動の関連に関する検討	13
	II-i 実験方法	13
	実験動物および飼育条件	13
	Puromycin aminonucleoside (PAN)誘発糸球体腎炎モデルにおける検討	13
	採尿および尿中パラメータ測定	14
	尿中 NVs の単離	14
	NVs の粒子径分布及び粒子濃度の測定	15
	NVs からの total RNA 精製および mRNA 発現量測定	15
	糸球体の単離および total RNA 精製	18
	腎組織の病理組織評価および免疫染色	18
	統計解析	19
	II-ii 実験結果	20
	PAN 誘発糸球体腎炎モデルの病態確認	20
	PAN 誘発糸球体腎炎モデルにおける尿中 NVs の変化	22
	尿中 NVs 中の total RNA 量の変化および NVs 量との関連	24
	Reference 遺伝子の探索	26
	尿中 NVs 中の HPRT1 の mRNA 発現量の変化および NVs 量との関連	26
	PAN 誘発糸球体腎炎モデルにおける尿中 NVs 中および組織中の mRNA 発現量の変化	29
	その他の糸球体障害マーカーの変化に関する検討	33
	II-iii 考察および小括	35
	尿からの NVs の回収について	35
	PAN 誘発糸球体腎炎モデルの尿中 NVs のプロファイル変化	35

尿中 NVs 中の mRNA 発現量の変化および腎組織中の mRNA 発現量の変化との関連	36
第 III 章 糸球体腎炎モデルを用いた尿中 NVs 中 mRNA 発現量の薬効評価マーカーとしての可能性および腎機能との相関に関する検討	39
III-i 実験方法	39
実験動物および飼育条件	39
PAN 誘発糸球体腎炎モデルの作製および薬物投与	39
統計解析	39
III-ii 実験結果	41
尿中 NVs 中 mRNA 発現量の薬効評価マーカーとしての検討	41
尿中 NVs 中 mRNA 発現量の変化と腎機能との相関	46
III-iii 考察および小括	48
尿中 NVs 中の mRNA 発現量解析の薬効および作用機序マーカーとしての有用性	48
PNR	48
Rcan1	48
Desmin および vimentin	49
Cathepsin L	50
Col1a1, TGF β 1 および α SMA	50
FSP-1	51
第 IV 章 他の腎障害モデル(糖尿病およびメタボリックシンドロームモデル)における汎用性に関する検討	53
IV-i 実験方法	53
実験動物および飼育条件	53
糖尿病モデルにおける検討	53
メタボリックシンドロームモデルにおける検討	53
尿中パラメータ測定	54
採血および血中グルコース濃度測定	54
血圧測定	54
統計解析	55
IV-ii 実験結果	56

糖尿病およびメタボリックシンドロームモデルにおける尿中 NVs 中 mRNA 発現量 の変化と腎機能との相関.....	56
IV-iii 考察及び小括	63
糖尿病モデルおよびメタボリックシンドロームモデルにおける尿中 NVs 中 PNR の 変動および腎機能との相関.....	63
第 V 章 総括および今後の展望.....	64
謝辞.....	68
参考文献.....	69

本論文中では以下の略語を使用した。

略語	正式名称
18S	18S ribosomal RNA
ACR	albumin-creatinine ratio
ACTB	beta-actin
AER	albumin excretion rate
AQP1	aquaporin 1
α SMA	alpha smooth muscle actin
B2M	beta-2 microglobulin
CCV	clathrin-coated vesicles
cDNA	complementary DNA
CKD	chronic kidney disease
Colla1	collagen 1a1
Cr	creatinine
Ct	cycle threshold
DNA	deoxyribonucleic acid
eGFR	estimated glomerular filtration rate
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ER	endoplasmic reticulum
FSP-1	fibroblast-specific protein 1
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
LPS	lipopolysaccharide

miRNA	micro-RNA
mRNA	messenger RNA
MVE	multivesicular endosome
NFAT	nuclear factor of activated T
NTA	nanoparticle tracking analysis
NVs	nano-extracellular vesicles
PAN	puromycin aminonucleoside
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PNR	podocin to nephrin ratio
Pred	prednisolone
Rcan1	regulator of calcineurin 1
RNA	ribonucleic acid
SD	sprague dawley
TGF β	transforming growth factor beta
ZDF	zucker diabetic fatty
ZL	zucker lean

第I章 序論

腎臓の構造と機能

腎臓は泌尿器系の臓器の一つであり、主に尿を生成することで血液からの老廃物や余分な水分のろ過・排出を行い、体液の恒常性維持に非常に重要な機能を担っている。ヒトには通常二つの腎臓が存在し、重量としては体重の約 0.3%程度であるにも関わらず、心臓から拍出される血液の 20 - 25%が流入しており、常に大量の血液のろ過を行っている。

腎臓中には糸球体およびボウマン嚢からなる腎小体と尿細管により構成されるネフロンという機能単位が 100 万個以上存在することが知られている (Figure 1) (1)。糸球体は濾過膜としての機能を持ち、血液中の分子量の小さい分子をろ過する一方、分子量の大きいタンパクは保持するという役割を担っている。また、尿細管はろ過された分子のうち、生体に必要な成分および水を再吸収することで、不要な老廃物のみを排出している。

何らかの要因によって糸球体に障害が起きた場合、濾過膜としての機能が低下することで血中のアルブミン等のタンパクの漏出が起きることが知られている。また、ネフロンとしての機能が低下すれば老廃物を排出する能力が失われ、尿毒素と呼ばれる複数の物質が体内に蓄積することで様々な症状・疾患が生じる。

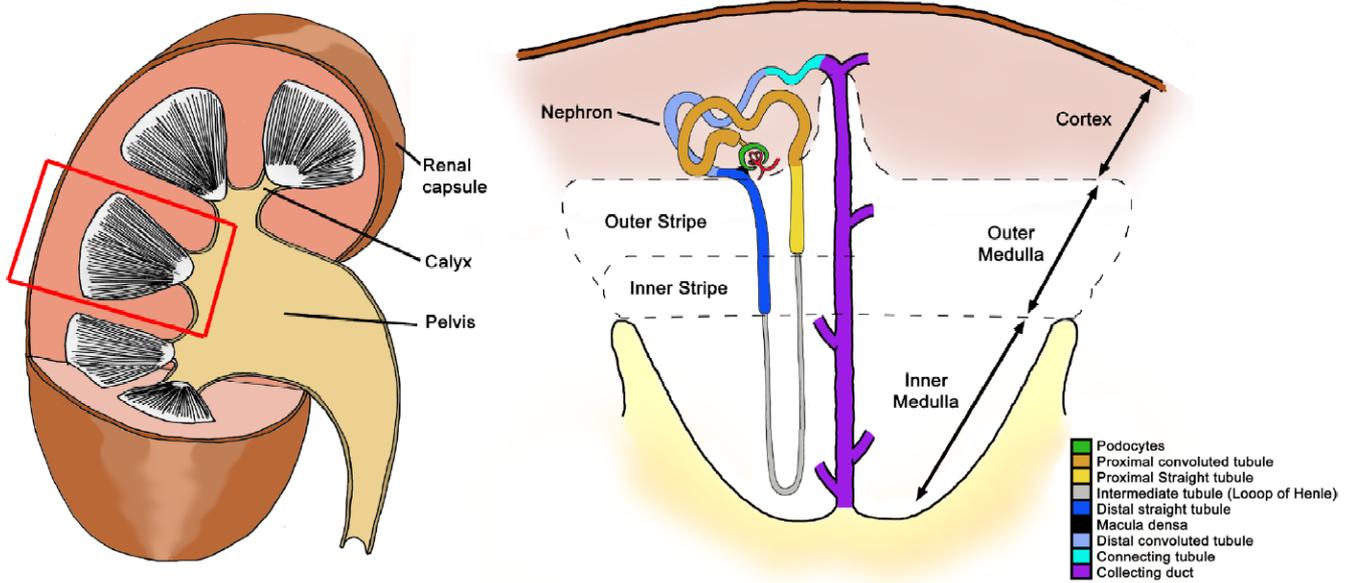


Figure 1. Structure of nephron, and organization of kidney cortex and medulla. Cited from reference No. 1.

慢性腎臓病の定義と病態，疫学

慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD)は微量アルブミン尿を含むタンパク尿などの尿異常や画像診断，血液検査および病理所見で腎障害の存在が明らかであること，血清のクレアチニン値をもとに推算した，推定球体濾過量 (estimated Glomerular Filtration Rate: eGFR)が 60 ml/分/1.73 m²未満の状態であること，のいずれかまたは両方が 3 か月以上継続することで診断される (Table 1) (2). つまり，腎臓の障害および機能低下が継続的に持続する状態である.

CKD は心筋梗塞や脳卒中，心不全などの心血管病や死亡リスクを上昇させることが多くの研究より示されているほか (3),これが進行することで末期腎不全 (End Stage Renal Disease: ESRD)に陥る. ESRD は基本的に不可逆的な臓器不全状態であり，これに陥った場合，人工透析による老廃物等の除去や，腎臓移植が必要となる.

CKD の国内患者数は年々増加し続けており，現在では 1,300 万人以上, ESRD 患者は 30 万人以上存在すると考えられている (4). 人工透析の費用は年間約 400 万円から 600 万円であるといわれており，全体で年間 1 兆 6000 億円に上ると推計されている. これは総医療費の約 4%を占めており，医療財政の面からも非常に大きな課題としてとらえられている. 日本国内のみならず，世界的に見ても CKD の患者数は増加の一途をたどっており (5, 6), 人工透析を受ける患者数を減らすための取り組みが世界的に必要であるといえる.

CKD の原因疾患としては様々な疾患が存在するが (Figure 2) (4), 多くの割合を占めるのが糖尿病性腎症と慢性糸球体腎炎であり，これらの疾患で全体の 70%弱となっている. 特に糖尿病性腎症については生活習慣の変化から年々増加し続けている.

Table 1. Diagnostic criteria for chronic kidney disease adapted from reference No. 2.

腎障害の指標	アルブミン尿 (AER \geq 30 mg/24 hour or ACR \geq 30 mg/Cr) 尿沈渣の異常 尿細管障害による電解質異常やその他の異常 病理組織検査による異常, 画像検査による形態異常 腎移植
GFR低下	GFR $<$ 60 ml/min/1.73 m ²

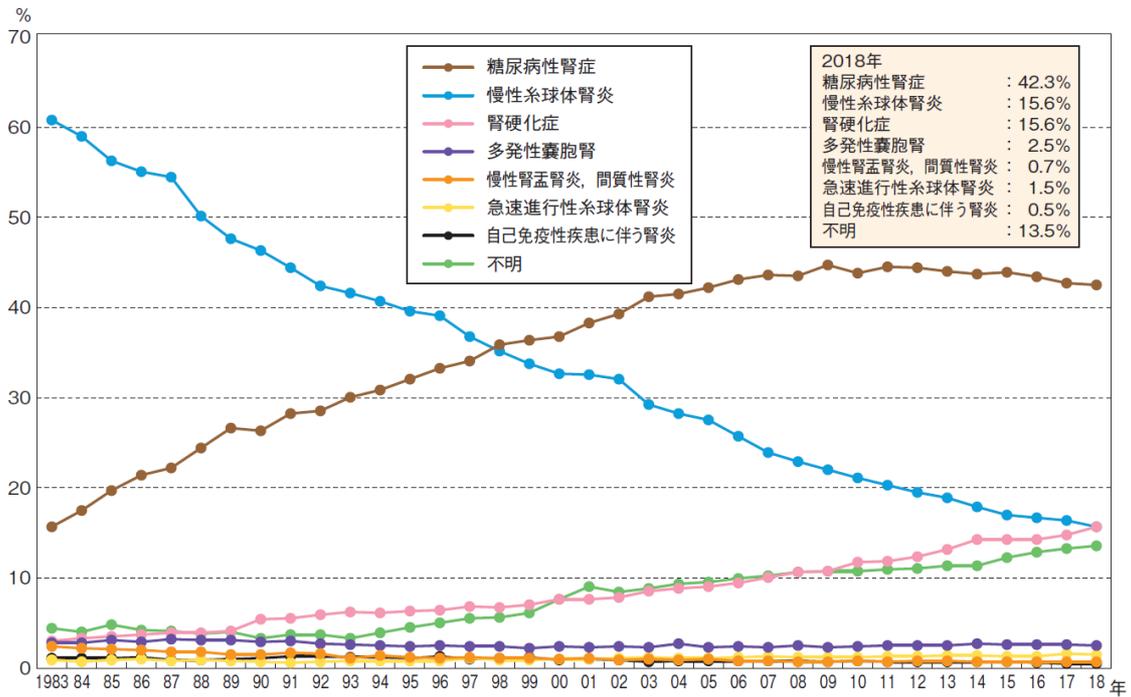


Figure 2. Changes in primary disease of end-stage renal disease. Cited from reference No. 4. The data reported here have been provided by the Japanese Society for Dialysis Therapy (JSdT). The interpretation and reporting of these data are the responsibility of the authors and in no way should be seen as an official policy or interpretation of the JSdT.

CKD の診断

CKD は上述の通り微量アルブミン尿を含むタンパク尿などの尿異常や画像診断，血液検査および病理所見で腎障害の存在が明らかであること，血清のクレアチニン値をもとに推算した，eGFR が 60 ml/分/1.73 m²未満の状態であること，のいずれかまたは両方が 3 か月以上継続することで診断されるが，それぞれの程度に応じてステージ分類がなされている (Table 2). しかしながら，CKD の病態は非常に緩徐に進行するため，定期的な健康診断等を受けていない場合は発見しづらく，血清クレアチニンの明らかな増加が認められる時点では腎機能の低下が進行している段階である．また，ネフロンの廃絶による腎機能の低下は不可逆的であるため，より早期に診断し，治療介入することが必要であると考えられている．

一方，現在診断に用いられている血清クレアチニンや尿中タンパクは腎機能が低下した結果を示すものであり，複数存在する原因疾患の多様性や，患者ごとの臓器の障害の状況を推し量ることは不可能である (7, 8). これらの要素が新たな治療薬の開発の難易度を高めている側面の一つであると考えられている．そのため，より早期から検出が可能，またはより詳細な病態分類が可能なバイオマーカーの開発が求められている．

Table 2. Classification of severity of CKD adapted from reference No. 2.
 Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); Yellow: moderately increased risk; Orange: high risk; Red, very high risk.

原疾患	尿蛋白区分			A1	A2	A3
糖尿病	尿アルブミン定量 (mg/day) 尿アルブミン/Cr比 (mg/gCr)			正常	微量アルブミン尿	顕性アルブミン尿
				<30	30~299	≥300
高血圧 腎炎 多発性嚢胞腎 移植腎 不明 その他	尿蛋白定量 (g/day) 尿蛋白/Cr比 (g/gCr)			正常	軽度蛋白尿	高度蛋白尿
				<0.15	0.15~0.49	≥0.50
GFR区分 (mL/min/1.73 m ²)	G1	正常または高値	≥90			
	G2	正常または軽度低下	60~89			
	G3a	軽度~中等度低下	45~59			
	G3b	中等度~高度低下	30~44			
	G4	高度低下	15~29			
	G5	末期腎不全	<15			

腎生検

上述の通り，血中もしくは尿中で測定可能な検査項目からは得られる情報が限られるため，糸球体腎炎等の一部の腎臓疾患においては，病理学的に診断し，予後や治療効果を推定し，治療方針を決定するために，組織を直接採取する腎生検が実施される場合もある．一般的に適応となる病態としてはタンパク尿や血尿などの検尿異常，ネフローゼ症候群，急性腎不全，移植腎などがある．

腎生検は 0.8 mm~1.6 mm の生検針を複数回穿刺することで行われるため，出血が必発である．そのほか，血尿，腎周囲血腫，感染症，疼痛などの合併症も生じうるのに加え，極めて少数例ではあるが国内においても死亡例も報告されている (9)．腎組織を直接観察できることから得られる情報量が多い反面，患者にとって非常に負担の大きい検査である．そのために CKD の早期・軽症例への適応が困難であり，より負荷の少ない代替法の開発が求められている．

Nano-extracellular vesicles と Liquid biopsy

Nano-extracellular vesicles (NVs)は非常に幅広い種類の細胞が産生する，exosomes および microvesicles と呼ばれる脂質二重膜で構成される細胞外小胞の総称である (Figure 3)．産生された NVs は細胞外に放出されるため，尿，血液，脳脊髄液，唾液等の様々な体液中に存在している (10, 11)．

Exosomes の大きさは一般的には直径 30 nm から 100 nm とされており，細胞内で多胞性エンドソーム (multivesicular endosome: MVE)中に出芽することによって形成され，それが細胞膜と融合することで細胞外に放出されたものとして定義されている (10)．

一方, microvesicles は exosomes よりも大きく, 一般的に直径 100 nm から 1,000 nm であるとされ, こちらは細胞膜が直接細胞外に向かって出芽することで産生されるものと考えられている (10). いずれもその生成過程で細胞質に存在する成分を取り込むため, NVs の内部には産生した細胞内の DNA, RNA, miRNA 等の核酸, タンパクを含んでいる (11). NVs は脂質二重膜で構成されていることから, これらの内容物は細胞外に放出されたのちも比較的安定な状態を保つことができることが知られている (12).

NVs の生体内における役割の関しては研究が進んでおり, 現在では細胞間のコミュニケーションに用いられていると考えられている. がん細胞から産生される NVs が血液等を介して遠隔の臓器の細胞内に取り込まれることががんの転移につながるというような報告もなされている (13). そのほか, アルツハイマー型認知症のような神経変性疾患など, 様々な疾患の進展に関与することも報告されている (14).

上述の通り, これらの性質は NVs が産生された細胞内に存在する特異的な成分を含むことに由来するものであり, 言い換えれば NVs 内に存在する核酸やタンパクの性質を解析することにより, 産生された細胞の特定や, 細胞内で生じた変化を検出することができると考えられている. NVs 等を利用し, 体液を用いて臓器に生じた病理的变化を検出する技術は, 直接組織を採取する生検に対して液体生検 (liquid biopsy) と呼ばれ, 特になんのがんの診断法としての検討が進められている (15, 16). また, 比較的軽微な侵襲のみで検体を採取することが可能であり, 患者に負担の少ない診断法として様々な疾患への応用も期待されている.

一方，尿には腎臓含む泌尿器系の臓器由来の NVs が多く含まれると考えられることから，腎臓病および前立腺がん，膀胱がんの診断に活用することができる可能性について報告されている (17, 18). しかし，CKD の診断法としての臨床応用は未だ進んでいない．また，尿中 NVs が腎臓の病理的な状態および機能の変化を反映しているかについても，詳細な情報は不足している．

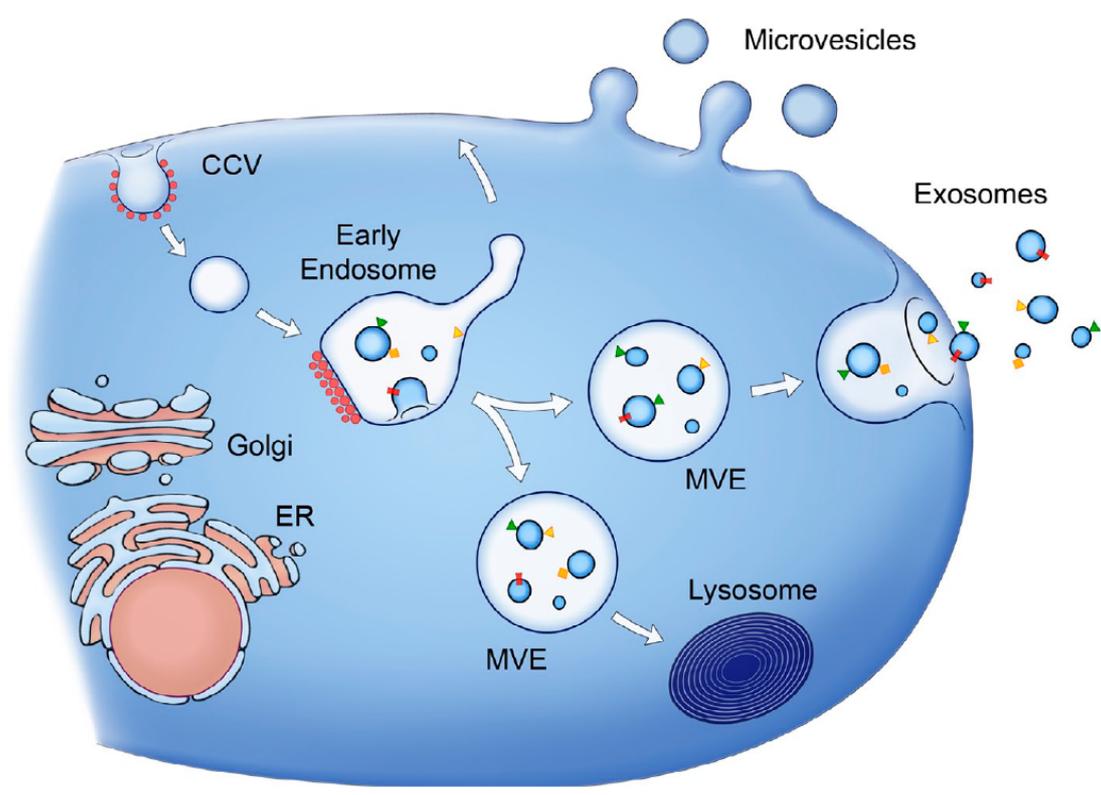


Figure 3. Mechanism of generation and release of nano-extracellular vesicles (exosomes and microvesicles) from the cells. Cited from reference No. 11. CCV; clathrin-coated vesicles, ER; endoplasmic reticulum, MVE; multivesicular endosome

そこで、本研究では尿中に含まれる NVs 中の mRNA に着目し、CKD の主な原因疾患である糸球体腎炎、糖尿病およびメタボリックシンドロームの動物モデルを用いて、病態における腎組織中の遺伝子発現の変化、腎機能の変化と NVs 中の遺伝子変化との相関を評価し、liquid biopsy および CKD の診断法としての応用可能性について 1) 糸球体腎炎モデルを用いた尿中 NVs 中および腎組織中の mRNA 発現変動の関連に関する検討、2) 糸球体腎炎モデルを用いた尿中 NVs 中 mRNA 発現量の薬効評価マーカーとしての可能性および腎機能との相関に関する検討および 3) 他の腎障害モデル(糖尿病およびメタボリックシンドロームモデル)における汎用性に関する検討を行った。

第II章 糸球体腎炎モデルを用いた尿中 NVs 中および腎組織中の mRNA 発現変動の関連に関する検討

II- i 実験方法

実験動物および飼育条件

雄性の Sprague Dawley (SD)ラットを日本チャールス・リバー社より購入して試験に用いた。各動物は入荷後、試験に用いる前に少なくとも5日間の順化を行った。動物は12時間ごとの明暗期の切り替え下、自由飲水、自由摂餌の環境において飼育した。飼料には標準資料である CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社)を用いた。試験期間中の動物については、少なくとも一日一回以上の観察を行い、健康状態を確認した。著しい体重減少や外部からの刺激に対する不応等が認められた場合は直ちに安楽死させることと定めていたが、本研究においては予期しなかった一般状態の悪化による安楽死は行わなかった。

Puromycin aminonucleoside (PAN)誘発糸球体腎炎モデルにおける検討

糸球体腎炎の動物モデルとして PAN 誘発糸球体腎炎モデルを用いた。PAN 誘発糸球体腎炎モデルは、6週齢の雄性 SD ラットに生理食塩水で溶解した PAN (Sigma-Aldrich)を 100 mg/kg/5 ml の投与用量および容量で尾静脈から単回静脈内投与して作製した。正常対照群として、生理食塩水のみを同様に投与した動物を用いた。各群への群分けについては、モデル作製の前日に測定した体重値を用い、逐次的シミュレーション法により割付を行った。各ラットは7日間飼育

し、経時的な採尿を行った。

採尿および尿中パラメータ測定

試験中の各時点において、代謝ケージ (KN-646: 株式会社夏目製作所もしくは 3701M081: テクニプラスト・ジャパン株式会社)を用いて 24 時間採尿を行い、尿サンプルを採取した。採取に用いた容器の採取前後の重量の差から、尿の比重を 1.0 として尿量を算出した。採取した尿サンプルは室温にて 700 x g で 10~20 分間遠心し、飼料や糞などの夾雑物を除いた上清を測定に使用した。後日測定を行った場合は、測定まで尿サンプルは -20°C で保存した。採取した尿サンプルのうち、500 μ l をパラメータ測定用に分取し、残りの全量を NVs の単離に用いた。

尿中のタンパク濃度およびクレアチニン濃度はそれぞれ Rat Urinary Protein assay kit (Chondrex, Inc.) およびラボアッセイ TM クレアチニンキット (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いて、各キットの取り扱い説明書に記載された方法に則って測定した。各キットの定量範囲で適切に測定できるように、各尿サンプルは精製水もしくはキット付属の希釈溶液を用いて希釈して測定した。タンパク尿については、測定された尿中のタンパク濃度と当該動物の尿量を乗じて一日あたりの排泄量として算出した。

尿中 NVs の単離

尿中の NVs は超遠心法により単離した。まず尿サンプルを 3,000 x g, 4°C で 10 分間遠心したのち、その上清を採取してさらに超遠心機 (Optima L-100XP: ベックマン・コールター株式会社) により

100,000 x g, 4°Cで1時間超遠心を行った。上清を注意深く除き，得られたペレットを100 µlのPBSで懸濁し，これをNVs懸濁液サンプルとして回収した。NVs懸濁液の5 µlを粒子径分布及び粒子濃度測定に用い，残りの全量をRNA抽出に用いた。

NVsの粒子径分布及び粒子濃度の測定

5 µlのNVs懸濁液をさらに495 µlのPBSに希釈したサンプルを使用し，Nanosight LM20 (Nanosight Ltd.)を用いた nanoparticle tracking analysis (NTA) (19)により粒子径分布および粒子濃度の測定を行った。測定に適切な粒子濃度域になるようにさらにPBSにより50~100倍に希釈し，それぞれのサンプルにつき5回繰り返し測定を行い，その平均値をデータとして採用した。得られた粒子濃度の測定値から，希釈倍率を考慮したうえで尿中クレアチニン1 mg当たりの濃度として規格化した排泄量を算出した。

NVsからのtotal RNA精製およびmRNA発現量測定

PAN誘発系球体腎炎モデルの尿中NVsからは，RNeasy micro kit (QIAGEN, Inc.)を用いてtotal RNAを精製した。単離したNVs懸濁液に，1% β-mercaptoethanolを添加したキット付属のRLT buffer 350 µlを加え，ボルテックスにより混和した。そこに70% エタノール 350 µlを加えてピペッティングし，混合液をキット付属のMinElute spin columnsに添加した。キット付属の洗浄液でカラムを洗浄したのち，DNase溶液を加えて室温で15 min静置した。キット付属の洗浄液でさらに二回洗浄したのち，RNase free水 15 µlを加えてtotal RNAを回収した。精製したtotal RNA溶液のRNA濃度を

NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.)を用いて測定した。

濃度測定に用いた残余の total RNA をすべて用いて SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.)により cDNA を合成した。合成した cDNA, 各遺伝子に対する TaqMan Gene Expression assays (Thermo Fisher Scientific, Inc.), 2×Assay Loading Reagent (Fluidigm Corporation) および ×2 Taqman PreAmp Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.)を 2: 1: 1: 4 の割合で混合し, サーマルサイクラー (T100™: Bio-Rad Laboratories, Inc.)を用いて, 14 サイクルの pre-amplification を行った。

増幅した cDNA, Express qPCR SuperMix (Thermo Fisher Scientific, Inc.), 20× GE sample loading reagent (Fluidigm Corporation) および TaqMan Gene Expression assays を 9: 10: 1: 20 の割合で 96.96 Dynamic Array™ integrated fluidic circuit (Fluidigm Corporation)にローディングして混合し, Biomark HD system (Fluidigm Corporation)により定量 PCR を実施した。Ct 値が 35 以上の場合は mRNA 発現量としてはゼロとみなした。使用した各遺伝子に対する TaqMan Gene Expression assays の情報は table 3 に示した。

Table 3. List of TaqMan Gene Expression assays used for the study.

Gene Name	Molecular Name	Assay ID
18S	18S ribosomal RNA (pan-Eukaryotic)	Hs99999901_s1
Acta2	α Smooth Muscle Actin	Rn01759928_g1
ACTB	Beta-actin	Rn00667869_m1
Aqp1	Aquaporin 1	Rn00562834_m1
B2m	Beta-2 Microglobulin	Rn00560865_m1
Coll1a1	Collagen 1a1	Rn01463848_m1
Ctsl	Cathepsin L	Rn04341361_m1
Des	Desmin	Rn00574732_m1
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	Rn01527840_m1
Nphs1	Nephrin	Rn00674268_m1
Nphs2	Podocin	Rn00709834_m1
S100A4	Fibroblast-specific protein 1	Rn01451938_m1
Vim	Vimentin	Rn00579738_m1

糸球体の単離および total RNA 精製

PAN 誘発糸球体腎炎モデルにおいては，糸球体に特異的に発現する分子の変動を組織中と尿中 NVs 中で比較を行うため，シービング法 (20)を用いて糸球体の単離を行って検討した．小動物用気化麻醉装置 (Midmark Corporation)を用いて 5% セボフルラン (丸石製薬株式会社)により麻醉した．麻醉したラットの腹部を切開し，腹部大動脈および大静脈からの放血により安楽死させた．放血後，腎臓を摘出し皮膜を取り除いた．腎臓の表面部を 5 mm 程度カミソリで切り取り，腎皮質を採取した．

採取した腎皮質をカミソリでミンチ状に細断し，100 μm のメッシュ上で PBS により数回洗浄し，通過した組織懸濁液を回収した．回収した組織懸濁液を 70 μm のメッシュに添加し，メッシュ上の残渣を PBS により数回洗浄した．残渣を回収し，RNeasy micro kit (QIAGEN, Inc.)を用いて total RNA を精製した．Total RNA からの cDNA 合成および定量 PCR は上述の NVs 中の遺伝子発現解析と同様の方法で実施した．

腎組織の病理組織評価および免疫染色

各動物を上述の方法と同様に麻醉，安楽死させたのち，速やかに腎臓を摘出して皮膜を取り除いた．固定液が浸潤しやすいように腎臓の上下端を 1 mm 程度切除したのち，10% 中性ホルマリン溶液 (富士フィルム和光純薬株式会社)に浸漬し，室温で 1 週間程度組織固定した．固定した組織はパラフィンブロックに包埋し，既報 (21)に準じた方法により病理組織評価および免疫染色を行った．

Desmin 免疫染色には，1 次抗体として抗 desmin マウスモノク

ローナル抗体 (Dako, Clone D33, Cat. No. M0760, Lot No. 00054755, 0.71 µg/mL) を用い, 2次抗体としてはヒストファイン・シンプルステイン (ニチレイ, ラット MAX-PO(M), Cat. No. 414171, Lot No. H1111)によるペルオキシダーゼ標識アミノ酸ポリマー法を適用した. 薄切したパラフィン切片を脱パラフィン化したのち, 200倍希釈した抗デスミン1次抗体を用いて4°C, オーバーナイトでインキュベートした. 続けて二次抗体を加えて室温で30分間インキュベートした. ジアミノベンチジン (ペルオキシダーゼ染色 DAB キット (Brown Stain), ナカライテスク株式会社)で褐色に発色した部位を免疫陽性とみなした.

統計解析

本章内で示すデータについては, 特に脚注が無い場合すべて平均値±標準誤差の形式で示した. 2群間の比較には Student's t-testを用いた. 2群間以上の比較を行う場合は, 一元配置分散分析を行った後, Dunnett's multiple comparison testによる検定を実施した. また, 経時変化のデータ等, 繰り返し測定されたデータの検定には二元配置分散分析を行った後, Bonferroni 補正を行って群間比較を行った. P値が0.05未満の場合を統計学的に有意な差があるとみなした. すべての統計解析は GraphPad Prism version 7.04 (GraphPad Software, Inc.)を用いて実施した.

II - ii 実験結果

PAN 誘発糸球体腎炎モデルの病態確認

始めに，PAN 誘発糸球体腎炎モデルにおける腎障害の病態の確認を行った (Figure 4). 典型的条件として汎用されている PAN 100 mg/kg を静脈内単回投与する条件にてモデルを作成後，24 時間採尿を経時的に行い，得られた尿サンプルを用いて尿中タンパク濃度および尿量を測定した. 測定した値を用いて，各時点における尿中タンパク排泄量の経時変化を検討したところ，PAN 誘発糸球体腎炎モデルにおいて経時的な増加が認められた. 特に，モデル作製 3 日後と 7 日後においては顕著に増加しており，コントロール群と比較して有意な差が認められた (3 日後 $P < 0.05$, 7 日後 $P < 0.01$). 一方，尿量についてはモデル作製後も変化はなく，コントロール群との差は認められなかった. これらの結果から，本条件で明確な糸球体腎炎モデルが作成できていることが確認された.

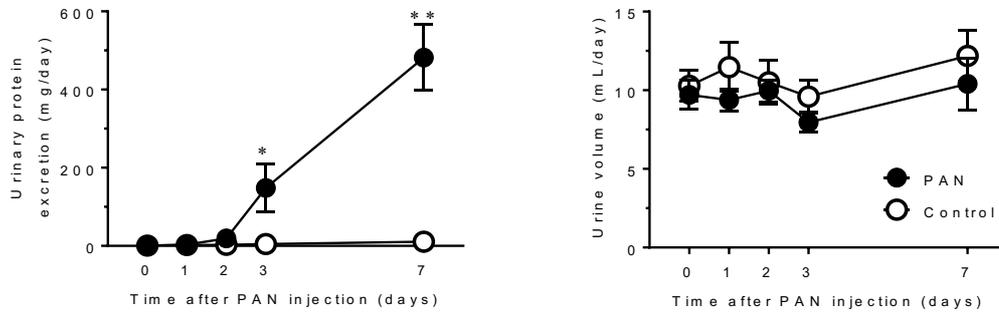
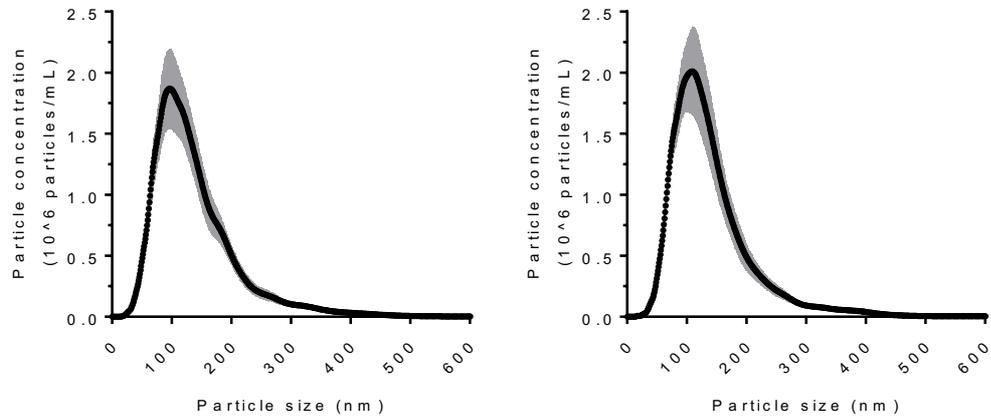


Figure 4. Disease profile of the PAN nephritis model and excretion of NVs in urine. Time course of urinary protein excretion (left) and urine volume (right) (n=8). Data are presented as the mean \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01 vs. control group.

PAN 誘発糸球体腎炎モデルにおける尿中 NVs の変化

次に，PAN 誘発糸球体腎炎モデルおよびコントロール動物の尿中 NVs を超遠心法により回収し，粒子径分布，粒子数のプロファイルを NTA 法により測定した．典型例として，モデル作製 7 日後の PAN 誘発糸球体腎炎モデル群およびコントロール群における尿中 NVs の粒子径分布を figure 5 に示した．いずれの群においても，平均ピーク値を 120 ~ 140 nm とした粒子分布を示しており，群間の差は認められなかった．そのほかの時点においても，同様に粒子分布の差は認められなかった (図示せず)．また，それぞれの群の各時点における尿中 NVs 中の濃度を尿中クレアチニン値で補正し，尿中 NVs 排泄量を算出した (Figure 5)．その結果，PAN 誘発糸球体腎炎モデルにおいて，モデル作製 2 日後以降わずかに尿中 NVs 排泄量が増加する傾向ではあったが，各群間で有意な差はなかった．上記の結果から，本研究に用いた超遠心法の条件により，尿からの NVs が適切に回収できていることが確認された．

A



B

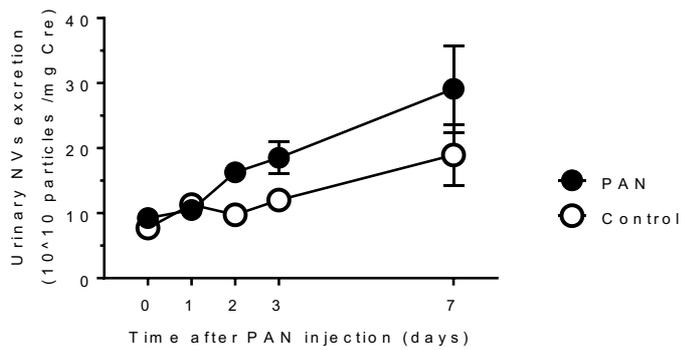


Figure 5. Profile of urinary NVs in the PAN nephritis model. (A) Size distribution of NVs in urine from control rats (left) and PAN nephritis model rats (right) on day 7 (n=8). The gray range represents the SEM. (B) Time course of urinary NV excretion (n=8). Data are presented as the mean \pm SEM.

尿中 NVs 中の total RNA 量の変化および NVs 量との関連

さらに，NVs に含まれる内容物にも影響が生じているかどうかを検討した．本研究では尿中 NVs 中の遺伝子発現に着目していることから，それぞれの群の各時点において回収した尿中 NVs 中から精製した total RNA の量について比較を行った (Figure 6)．その結果，1日に排泄される尿中 NVs 中に含まれる total RNA の量は~300 ng 程度と非常に微量であることがわかった．また，ばらつきも大きいものの，明らかな日間変動はなく，PAN 誘発糸球体腎炎モデル群とコントロール群の差も認められなかった．すべてのサンプルにおいて NVs 量と回収された total RNA 量の関連を比較したところ，両者に相関は認められなかった (Figure 6)．

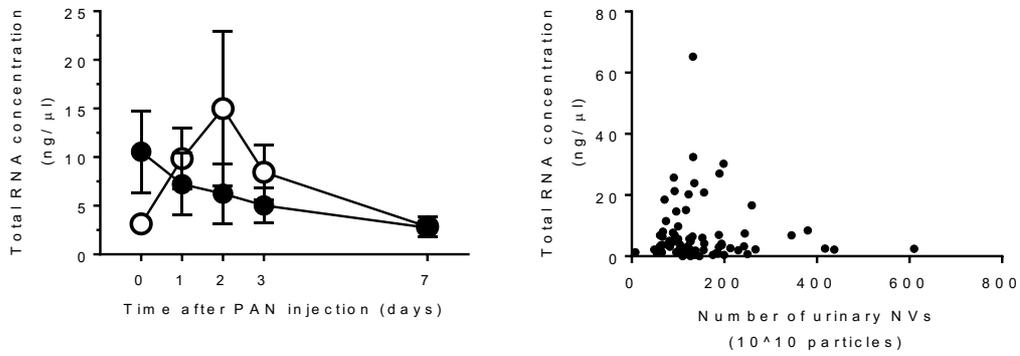


Figure 6. Changes in total RNA concentration in urinary NVs in the PAN nephritis model and relationships with the amount of urinary NVs. (Left) time course of total RNA concentration in urinary NVs (n=7-8). Data are presented as the mean \pm SEM. (Right) relationships between total RNA concentration and number of urinary NVs. Data are presented as individual plots.

Reference 遺伝子の探索

各群における尿中 NVs 中の各種 mRNA 発現量の変動を比較するため、まずは規格化に用いるための reference 遺伝子の探索を行った。それぞれの群の各時点における尿中 NVs 中において、一般的に reference 遺伝子として汎用される HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1), B2M (beta-2 microglobulin), ACTB (beta-actin), 18S(18S ribosomal RNA)の発現量の変化を、定量 PCR 法を用いて Ct 値として算出し、検討した (Figure 7)。その結果、HPRT1 および B2M については明らかな日間変動および群間における差は認められなかった。ACTB については、日間変動は認められなかったものの、ばらつきは HPRT1 および B2M よりも大きい傾向があった。また、18S については日間のばらつきが非常に大きかった。以上の結果から、HPRT1 および B2M を reference 遺伝子として用いることが適切であることが示唆された。そのため、本研究では HPRT1 を reference 遺伝子として用いて mRNA 発現量の定量および各群の比較を行った。

尿中 NVs 中の HPRT1 の mRNA 発現量の変化および NVs 量との関連

上述の検討において尿中 NVs 中の total RNA 量と NVs 量の相関については認められなかったが、reference 遺伝子として用いる HPRT1 の mRNA 発現量についても、尿中 NVs 量との関連について検討した (Figure 8)。その結果、尿中 NVs 中の total RNA 量と同様に、HPRT1 の mRNA 発現量に関しても NVs 量との相関は認められなかった。

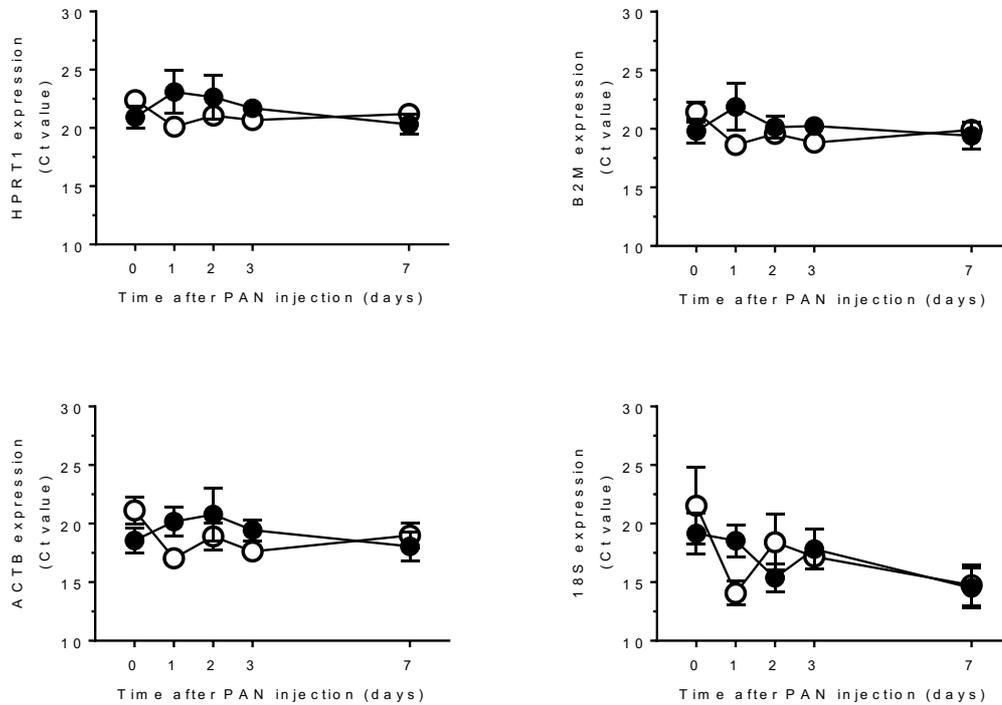


Figure 7. Selection of reference gene for qPCR analysis in urinary NVs. Time course of gene expressions of HPRT1 (upper left), B2M (upper right), ACTB (lower left) and 18S (lower right) in urinary NVs (n=7-8). Data are presented as the mean \pm SEM.

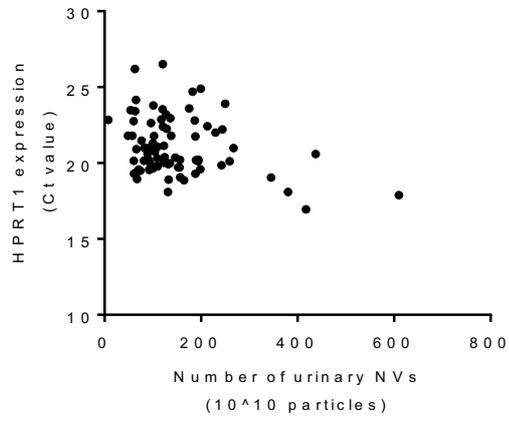


Figure 8. Relationships between expression of HPRT1 and number of urinary NVs. Data are presented as individual plots.

PAN 誘発糸球体腎炎モデルにおける尿中 NVs 中および組織中の mRNA 発現量の変化

次に、尿中 NVs 中の mRNA 発現量の変化が組織中で生じている障害を反映しうるかどうかについて検討を行った。PAN 誘発糸球体腎炎モデルにおいては、PAN による糸球体特異的な障害が引き起こされていることが知られていることから (22)、まずはげっ歯類において非常に鋭敏な糸球体障害マーカーとして汎用されている desmin (23, 24) の mRNA 発現量の変化に着目して検討を行った (Figure 9)。その結果、PAN 誘発糸球体腎炎モデル群における尿中 NVs 中の desmin の mRNA 発現量はコントロール群と比較して経時的に増加していくことが明らかとなった。特にモデル作製 3 日後においてコントロール群の 5.8 倍に増加、7 日後には 17.3 倍に増加しており 7 日後の時点では有意な差が認められた ($P < 0.01$)。この変動は、尿中タンパク排泄量の増加の経時変化と一致していた。

さらに、この尿中 NVs 中の desmin の mRNA 発現量の変化が、腎組織中に生じている障害を反映しているかどうかを確認するため、糸球体中の desmin の mRNA 発現量の経時変化および desmin タンパクの発現量の変化についても検討を行った (Figure 10)。その結果、PAN 誘発糸球体腎炎モデル群の糸球体における desmin の mRNA 発現量の経時変化は尿中 NVs 中の mRNA 発現量の変化と同様の推移を示しており、7 日後においてはコントロール群と比較して有意に増加していた ($P < 0.01$)。また、モデル作製 7 日後の腎組織切片を用いた desmin の免疫染色を実施した結果、PAN 誘発糸球体腎炎モデル群の糸球体ではコントロール群と比較して明らかな染色領域の増加が認められた。以上の結果より、desmin については腎組織で生じている

変化が尿中 NVs 中に反映されていることが示唆された。

一方、本モデルで糸球体特異的な障害が生じていることを、尿中 NVs 中の mRNA を解析することにより間接的に確認できるかどうかを検討するため、PAN による障害を直接受けないと考えられる近位尿細管のマーカースとして用いられている aquaporin 1 (AQP1) (25) の尿中 NVs 中の mRNA 発現量の経時変化を検討した (Figure 9)。その結果、尿中 NVs 中の AQP1 の mRNA 発現量についてはモデル作製後も変化しておらず、各群間での差も認められなかった。

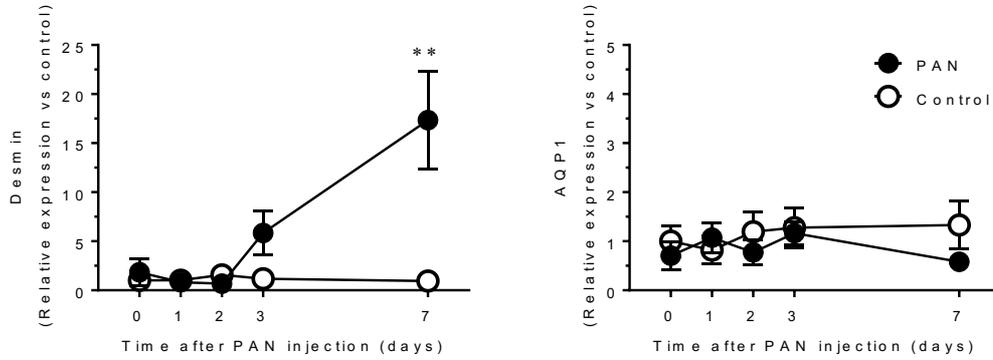


Figure 9. Changes in podocyte and tubular injury marker expression in urinary NVs. (left) Time course of relative mRNA levels of desmin, a podocyte injury marker, in urinary NVs (n=5-8). (right) Time course of relative mRNA levels of AQP1, a tubular marker, in urinary NVs (n=5-8). Data are presented as the mean \pm SEM. **P<0.01 vs. control group.

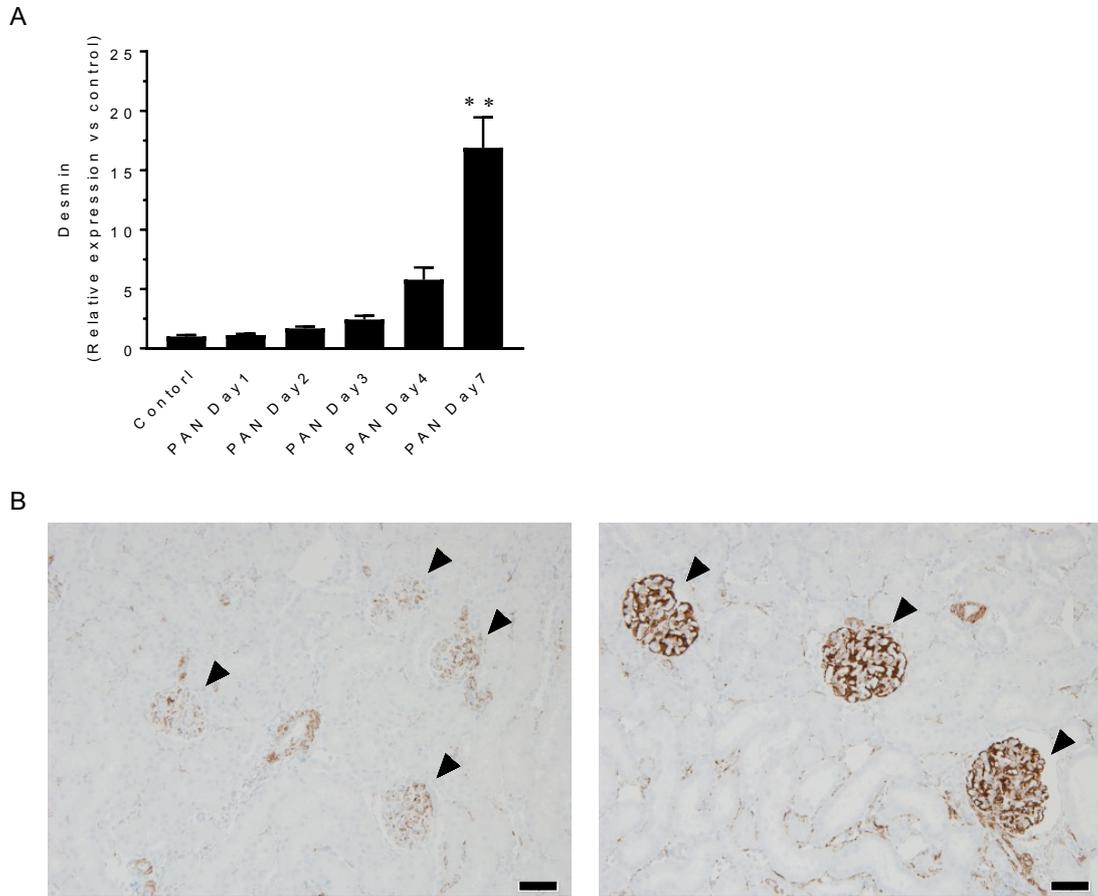


Figure 10. Changes in desmin expression in glomeruli. (A) Changes in relative desmin gene expression in isolated glomeruli at different time points (n=6-10). Data are presented as the mean \pm SEM. **P<0.01 vs. control group. (B) Representative images of immunohistochemistry of desmin in the kidney of control (left) and PAN nephritis model (right) rats at day 7. Arrowheads, glomeruli. Scale bar, 50 μ m.

その他の糸球体障害マーカーの変化に関する検討

Desmin と同様に，その他の糸球体障害マーカーの変化についても同様の現象が認められるかどうかについて，さらに検討を行った．腎臓において糸球体に特異的に発現し，腎臓のろ過機能に極めて重要な役割を果たしている細胞であるポドサイト障害の予測マーカーとして報告されている podocin/ nephrin 比 (podocin to nephrin ratio: PNR) (26)についても尿中 NVs 中および糸球体中の mRNA 発現の変化を検討した (Figure 11)．その結果，モデル作製後初期については PAN 誘発糸球体腎炎モデル群では尿中 NVs 中の PNR が低下し，その後増加する傾向が認められたが，7日後のコントロール群の測定値にばらつきが大きかったため群間の差は認められなかった．一方，糸球体中の PNR についてはモデル作製後初期に PAN 誘発糸球体腎炎モデル群では低下傾向にあり，その後増加していた．特に 7 日後ではコントロール群と比較して有意に高値だった ($P<0.01$)．以上の結果から，PNR に関しても，尿中 NVs 中および糸球体中で類似の変動を示す傾向が確認された．

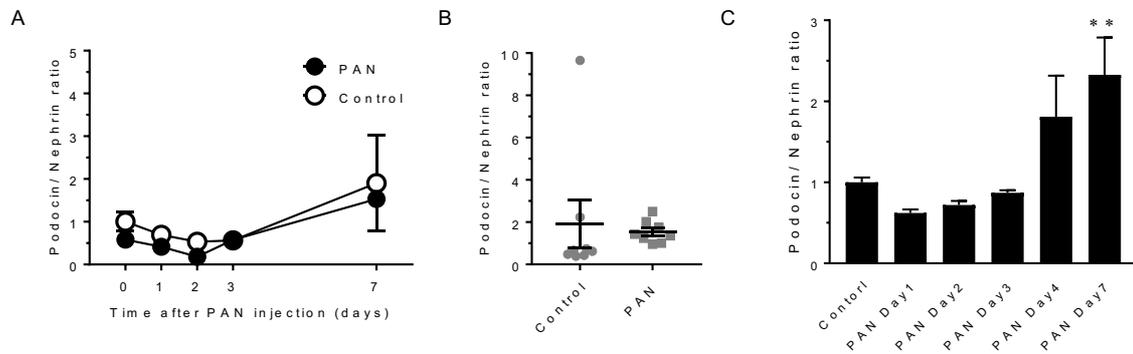


Figure 11. Changes in podocin to nephrin ratio in urinary NVs and glomeruli. (A) Time course of podocin to nephrin ratio in urinary NVs (n=5-8). (B) Changes in podocin to nephrin ratio in urinary NVs at day 7 (n=8). (C) Changes in podocin to nephrin ratio in isolated glomeruli at different time points (n=6-10). Data are presented as the mean \pm SEM. **P<0.01 vs. control group.

II - iii 考察および小括

尿からの NVs の回収について

本研究においては，超遠心法を用いて尿中に含まれる exosomes および microvesicles を区別すること無く NVs として回収を行った。上述の通り，これらの細胞外小胞は生成されるメカニズムが異なり，その大きさが異なることや表面抗原の差異などもあるものの，完全に明確な区別をして回収することが困難であるためである (27)。将来的に疾患の診断法に用いることを想定した場合，複雑な技術を組み合わせることでこれらの小胞を区別することを目指すよりも，総合的に解析できる技術をベースとしたほうがより簡便かつ経済的な診断法となりうると考えられる。

NVs は回収法によってその回収量，収率および粒子分布が異なることが知られているが (28)，本研究において回収された NVs のプロファイルは，これまで報告 (29, 30)されている exosomes および microvesicles の粒子径とは相違がなかったことから，適切に回収できていたと考えられる。一方で超遠心法は高額な機器が必要なことに加え，回収処理に長時間を要することから，カラム等を用いたより簡易な方法による回収法を利用した検討が必要であると考えられた。

PAN 誘発系球体腎炎モデルの尿中 NVs のプロファイル変化

PAN 誘発系球体腎炎モデルの尿中 NVs のプロファイルについて検討した結果，粒子径分布に関しては全く変化がなく，尿中 NVs 排泄量については増加傾向にあったものの有意な差は認められなかった。腎疾患における尿中 NVs の排泄量の変化については，ヒトの IgA 腎症においては，尿中の exosomes 排泄量が健常人に比べて増加

することが報告されている (31). 株化マクロファージを用いた検討によれば, LPS で刺激することで exosomes の産生量が増加することも報告されており (32), 炎症を伴う場合等, 腎疾患の種類によって尿中 NVs 排泄量の変化は様々であることが示唆された.

一方, 尿中 NVs 排泄量と NVs 中に含まれる total RNA 量および reference 遺伝子として用いた HPRT1 の mRNA の発現量について相関を検討した結果, これらには全く相関が無いことが明らかになった. Exosomes の生成過程において, RNA は MVE のラフト領域に結合することでその内部に取り込まれるため, 必ずしも細胞質内に存在する RNA が均等に内包されるわけではないという報告もされている (33). これらの事実を考慮すると, HPRT1 や B2M といった mRNA については本研究においてはその発現量の日間変動およびコントロール群と病態群での差はなく, reference 遺伝子として用いることができたものの, 病態プロファイルの大きく異なる疾患を検討する際にはその都度 reference 遺伝子の選抜が必須であると推察された.

尿中 NVs 中の mRNA 発現量の変化および腎組織中の mRNA 発現量の変化との関連

PAN 誘発糸球体腎炎モデルを用いた検討においては, desmin および PNR について尿中 NVs 中および糸球体中の mRNA 発現量の変化を経時的に検討した. Desmin は従来平滑細胞および横紋筋細胞に特異的に分布する細胞骨格構成タンパクの 1 種として知られており (34), 正常なポドサイトではほとんど発現が認められないが, げっ歯類においては, ポドサイト障害時に生じる細胞骨格の再構成に

伴い大きく発現が増加することが知られており，ポドサイト障害を鋭敏に反映するマーカーとして汎用されている (23, 24). また，nephrin および podocin はポドサイトに発現するタンパクであり，遺伝性の糸球体腎炎の原因遺伝子であることが知られている (35). ポドサイトは足突起と呼ばれる非常に特徴的かつ微細な構造を有しており，隣接するポドサイトの足突起同士が指を絡ませるようにしてろ過膜を形成している (36). Nephrin はこの指同士の~40 nm の間隙をつなぎ合わせる機能を持った一回膜貫通型のタンパクである (37). また，podocin は nephrin の細胞内ドメインに結合する裏打ちタンパクとして報告されている (38). いずれも足突起およびろ過膜構造の維持に非常な役割を果たすタンパクであり，これらの発現比率である PNR はポドサイト障害を予測するマーカーとして報告されている (26, 39). これらの2つのマーカーの経時的な変動を検討した結果，いずれのマーカーについても尿中 NVs 中および糸球体中で類似した変動の経時推移が認められた.

一方で，尿細管障害のマーカーとして知られている AQP1 の尿中 NVs 中 mRNA 発現量についてもその経時変化を検討した. AQP1 は様々な組織に発現する水分子を選択的に透過させるチャネルタンパクであり，腎臓においては近位尿細管に発現しており，原尿から水を再吸収する役割を担っていると考えられている (40). AQP1 は虚血再灌流障害や腎移植時の尿細管障害時に減少するマーカーとして報告されている (25). しかし，PAN 誘発糸球体腎炎モデルにおいては AQP1 の尿中 NVs 中 mRNA 発現量については，コントロール群との差は認められなかった. PAN はポドサイト選択的に取り込まれて代謝されることにより活性酸素が発生し，酸化ストレスを端緒とす

る様々な細胞毒性を示す化合物であり，それ故に糸球体特異的な腎障害を生じさせることが報告されている (41). このことから考えると，直接的な障害が生じていない尿細管障害のマーカーである AQP1 の変動が認められなかったことは妥当な結果であると考えられた.

さらに，Spanu らは，尿中 NVs 中の cystatin C の mRNA 発現量について，腎皮質における mRNA 発現量および尿中 cystatin C タンパク量が相関していることを報告している (42). このような過去の報告および，本研究において複数の糸球体障害のマーカーの尿中 NVs 中および腎組織中で類似した変動が認められたことと，直接障害が生じていないと考えられる尿細管障害マーカーでは変動が生じていないことが検出可能であったことから，尿中 NVs 中の mRNA 発現量を解析することにより腎組織中で生じている障害を非侵襲的に検出することが可能であることが強く示唆された.

第III章 糸球体腎炎モデルを用いた尿中 NVs 中 mRNA 発現量の薬効 評価マーカーとしての可能性および腎機能との相関に関する 検討

III - i 実験方法

実験動物および飼育条件

雄性の SD ラットを日本チャールス・リバー社より購入して試験に用いた。飼育はII章と同様の条件で行った。

PAN 誘発糸球体腎炎モデルの作製および薬物投与

PAN 誘発糸球体腎炎モデルはII章と同四の条件で作成した。治療介入を行った場合の検討として、PAN 投与の1時間前に精製水に溶解したプレドニゾロン (水溶性プレドニン：塩野義製薬株式会社)を 10 mg/kg/10 ml の投与用量および容量で単回経口投与を行った。プレドニゾロンの陰性対照群に対しては、精製水のみを同様に投与した。各群への群分けについては、モデル作製および投与の前日に測定した体重値を用い、逐次的シミュレーション法により割付を行った。各ラットは7日間飼育し、経時的な採尿を行った。

統計解析

本章内で示すデータについては、特に脚注が無い場合すべて平均値±標準誤差の形式で示した。2群間の比較には Student's t-test を用いた。P 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意な差があるとみなした。2つのパラメータ間の相関解析には、Pearson の相関係数解析を行った。すべての統計解析は GraphPad Prism version 7.04

(GraphPad Software, Inc.)を用いて実施した。

その他の試料採取および測定法についてはすべてII-iに示した方法で実施した。

Ⅲ - ii 実験結果

尿中 NVs 中 mRNA 発現量の薬効評価マーカーとしての検討

まず，尿中 NVs 中の mRNA 発現量の変化が薬効評価のマーカーとして利用可能であるかどうかを検討するために，PAN 誘発糸球体腎炎モデルに対してプレドニゾロンを投与した際の変化を検討した (Figure 12). 過去に報告されているように (43)，プレドニゾロンの投与によって PAN 誘発糸球体腎炎モデルにおけるモデル作製 7 日後の尿中タンパク排泄量の増加は有意に抑制されていた ($P<0.01$). プレドニゾロンの投与により病態が抑制できていることが確認されたことから，この時に病態発症および腎障害に関わるような遺伝子の発現がどのように変化しているかについて明らかにするため，尿中 NVs 中の複数の mRNA 発現量の変化について検討を行った.

まず，上述した糸球体障害のマーカーである desmin および PNR について検討したところ，いずれも PAN 誘発糸球体腎炎モデル群においてコントロール群と比較して mRNA 発現量および比率が有意に増加しており ($P<0.01$)，プレドニゾロン投与群において desmin については抑制する傾向が，PNR については有意な抑制作用が認められた (Figure 13, それぞれ $P=0.10$, $P<0.01$).

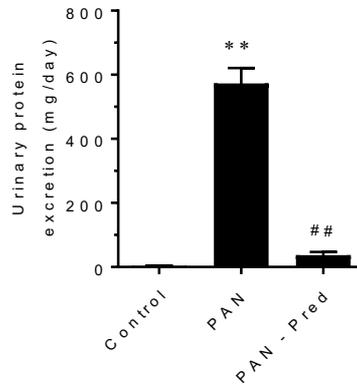


Figure 12. Effect of Pred on proteinuria in the PAN nephritis model. Data are presented as the mean \pm SEM (n=10, each group). **P<0.01 vs. control group; ##P<0.01 vs. the PAN group.

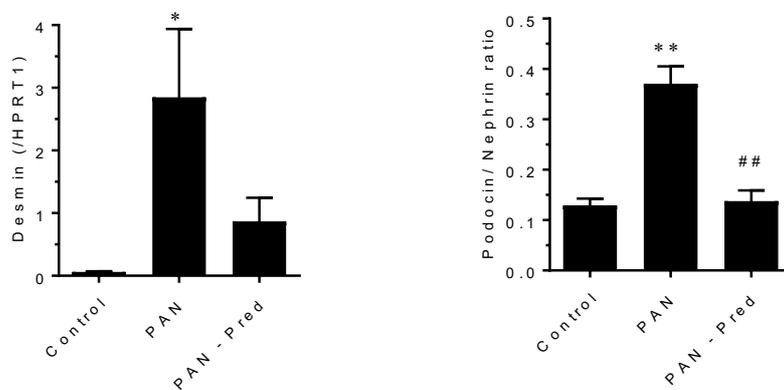


Figure 13. Effect of Pred on desmin mRNA levels (left) and podocin to nephrin ratio in urinary NVs in the PAN nephritis model. Data are presented as the mean \pm SEM (n=10, each group). *P<0.05, **P<0.01 vs. control group; ##P<0.01 vs. the PAN group.

同様に，糸球体腎炎をはじめとする腎障害との関連が報告されているその他の複数の遺伝子についても検討を行った (Figure 14). ポドサイトに発現し，カルシニューリン/ nuclear factor of activated T (NFAT)経路の下流に存在する遺伝子であり，微小変化型ネフローゼ症候群をはじめとする糸球体腎炎等との関連が報告されている Regulator of calcineurin 1 (Rcan1) (44)，腎障害時のポドサイトの形質転換により発現変動することが知られている collagen 1a1 (Coll1a1) および transforming growth factor- β 1 (TGF β 1) (46, 47)，desmin と同様の中間系フィラメントである vimentin (47)，腎炎において尿細管間質での発現と機能が相関することが報告されている a smooth muscle actin (α SMA) (48)，さらに孤発性ネフローゼ症候群との関連が深いと考えられている cathepsin L (49) および糸球体腎炎の一種である巣状分節性糸球体硬化症において陽性ポドサイトが増加するといわれている fibroblast-specific protein 1 (FSP-1) (50) の mRNA 発現量について検討した．その結果，PAN 誘発糸球体腎炎モデル群においてコントロール群と比較して Rcan1, Coll1a1, TGF β 1, vimentin, α SMA, cathepsin L では有意な増加が (それぞれ $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)，FSP-1 では有意な低下が認められた ($P < 0.01$)．これらの増加および低下は，プレドニゾン投与群においていずれも有意に抑制されていた (それぞれ $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$).

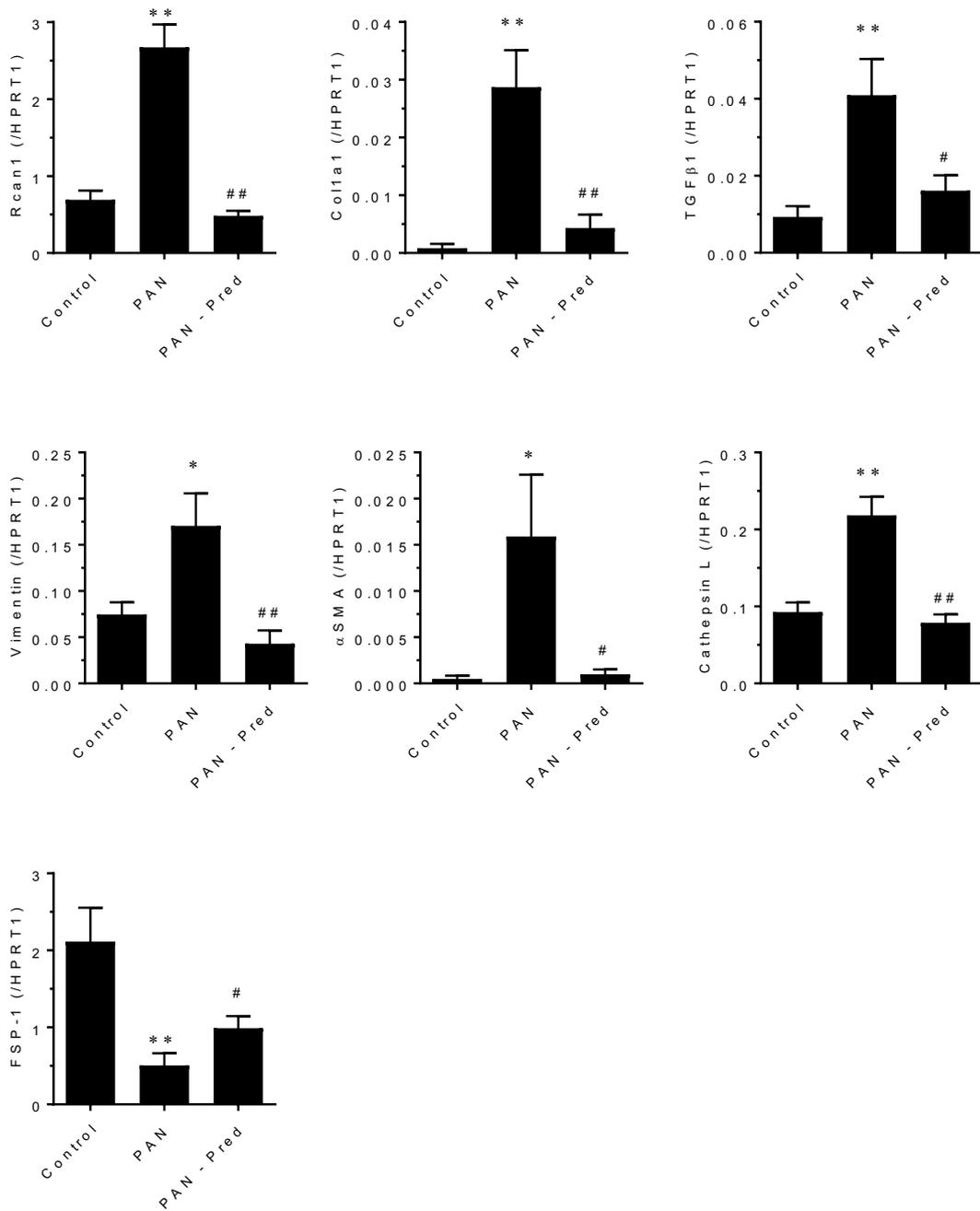


Figure 14. Effect of Pred on various mRNAs levels in urinary NVs in the PAN nephritis model. Data are presented as the mean \pm SEM (n=10, each group). *P<0.05, **P<0.01 vs. control group; #P<0.05, ##P<0.01 vs. the PAN group.

尿中 NVs 中 mRNA 発現量の変化と腎機能との相関

次に、前項で検討した尿中 NVs 中の各種 mRNA 発現量の変化と腎機能の指標の一つである尿中タンパク排泄量との相関を検討した (Figure 15). その結果, desmin においては正の相関傾向が認められたものの, 有意ではなかった ($P=0.07$). 一方, PNR, Rcan1, Col1a1, TGF β 1, vimentin, α SMA, cathepsin L についてはいずれも有意な正の相関が認められた (いずれの遺伝子も $P<0.01$). また, FSP-1 では有意な負の相関が確認された ($P<0.01$). 各遺伝子の相関係数は, 0.34 (desmin), 0.86 (PNR), 0.80 (Rcan1), 0.61 (Col1a1), 0.46 (TGF β 1), 0.59 (vimentin), 0.64 (α SMA), 0.81 (cathepsin L), -0.49 (FSP-1)であり, PNR, Rcan1, cathepsin L において特に高い相関が認められた.

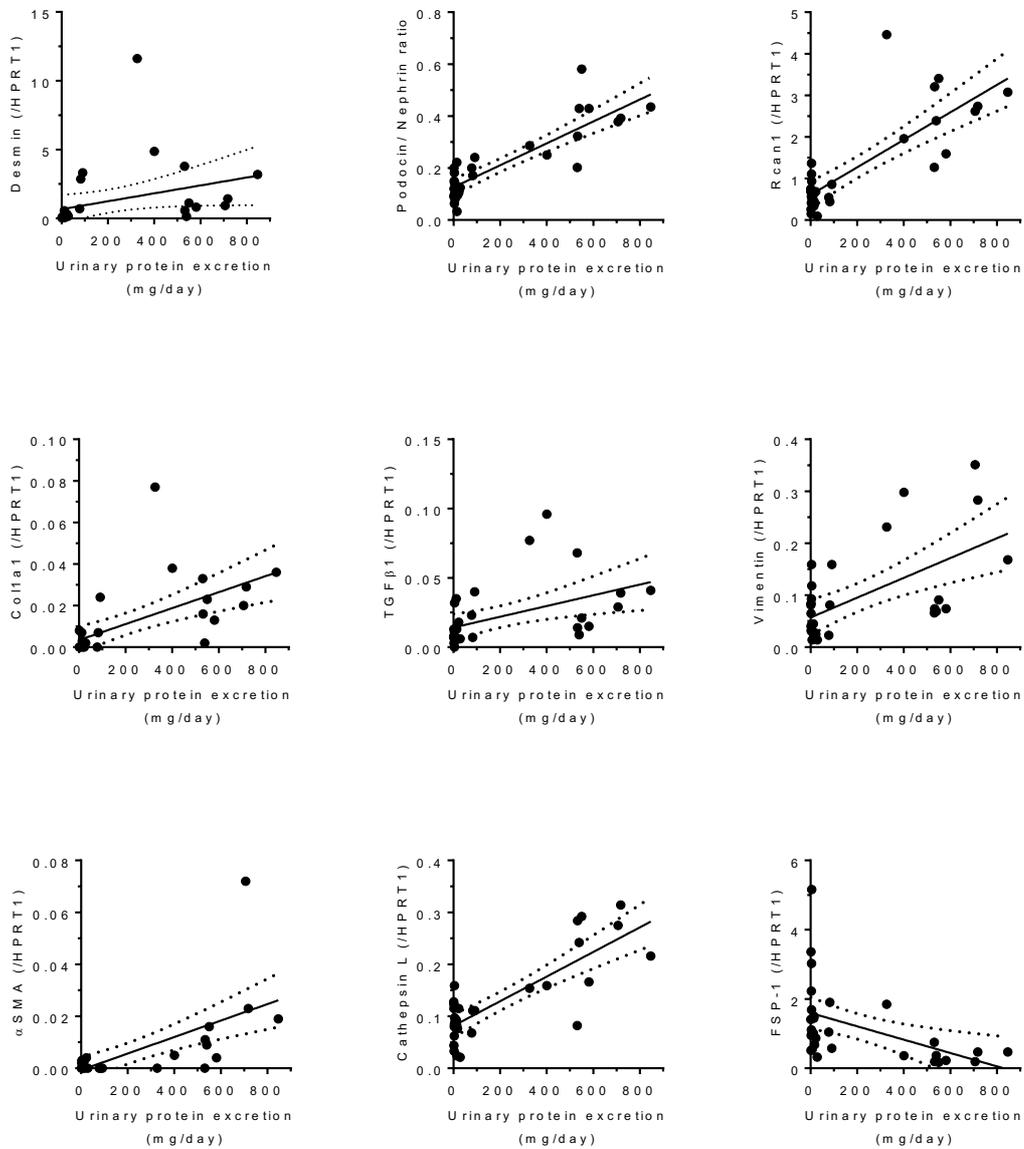


Figure 15. Correlations between each gene expression and urinary protein excretion. Solid line, regression line; dotted lines, 95% confidence interval of the slope of the regression line. correlation coefficients for each gene were 0.34(desmin), 0.86(PNR), 0.80(Rcan1), 0.61(Col1a1), 0.46(TGF- β 1), 0.59(vimentin), 0.64(α SMA), 0.81(cathepsin L), -0.49(FSP-1), respectively.

Ⅲ-iii 考察および小括

尿中 NVs 中の mRNA 発現量解析の薬効および作用機序マーカーとしての有用性

本章では，PAN 誘発糸球体腎炎モデルを用いて薬剤による治療介入時に尿中 NVs 中の様々な mRNA の発現量がどのように変動するかを検討した。

PNR

PAN 誘発糸球体腎炎モデルにおいて増加した PNR に対して，プレドニゾロンの投与により有意な増加抑制作用が認められた。上述の通り，PNR はポドサイト障害のバイオマーカーであり，尿中に脱落したポドサイトを回収した検討においても同様の変動が確認されている (26, 39)。これらの結果から，本検討で認められたプレドニゾロンの PNR に対する作用は糸球体中のポドサイトに対して影響を与えたものであり，薬剤によるポドサイト保護作用が非侵襲的に検出できることが示唆された。

Rcan1

Rcan1 はカルシニューリン/ NFAT 経路の下流に存在する遺伝子であり，この経路が活性化された際に発現が増加することが知られている (51)。カルシニューリン/ NFAT 経路の活性化は，複数の炎症性サイトカインの転写促進等を介して微小変化型ネフローゼ症候群をはじめとする糸球体腎炎，糸球体硬化症などの様々な腎疾患を引き起こすことが知られている (44, 52)。また，カルシニューリンは

糸球体腎炎の治療薬として用いられているシクロスポリンやタクロリムスといった免疫抑制剤のターゲット因子であることも報告されている (53). 加えて, Ding らは培養ポドサイトを用いた *in vitro* の実験において, PAN 処理によってカルシニューリンの活性化が引き起こされることを報告している (54). また, カルシニューリン阻害薬は PAN 誘発糸球体腎炎モデルに対する治療効果があることも報告されている (55). さらに, プレドニゾン等の糖質コルチコイドにはカルシニューリンの活性を抑制する作用があることも知られている (56, 57).

これらの報告および本研究の結果から, PAN 誘発糸球体腎炎モデルにおいてはカルシニューリン/ NFAT 経路の活性化によって Rcan1 の発現量が増加しており, プレドニゾンの投与によってカルシニューリン/ NFAT 経路の活性化が抑制されていることが尿中 NVs 中の Rcan1 mRNA 発現量を解析することで間接的かつ非侵襲的に検出できているものと考えられた.

Desmin および vimentin

Desmin および vimentin はいずれも中間系のフィラメント分子として知られており, 正常なポドサイトにおいてはこれらの発現量は低い, PAN 誘発糸球体腎炎モデルにおいては発現量が増加することが報告されている (58). これらの中間系フィラメント分子の増加は, ポドサイト障害を受けた際に, 基底膜からの脱落を阻止するためのストレス応答としての細胞骨格再編成であると考えられている (59, 60). 本研究において認められた尿中 NVs 中の desmin および vimentin の発現増加はこれらの報告と一致しており, ポドサイトに

おける変化を反映しているものと考えられた。

Cathepsin L

Cathepsin L はリソソームに存在するエンドペプチターゼの 1 種であり，リソソームにおけるタンパク質分解の開始に重要な寄与を持っていることが知られている (61)。ポドサイトにおいては，糸球体腎炎治療薬であるシクロスポリンの作用ターゲット分子の一つである synaptopodin や，糸球体基底膜の分解を生じさせることから，発現増加によりろ過機能を破綻させ，タンパク尿を発症させることが報告されている (49)。また，PAN 誘発糸球体腎炎モデルや糖尿病性腎症モデルの糸球体において発現増加し，ノックダウンすることによって PAN により生じるポドサイトの基底膜からの脱落や，糖尿病性腎症モデルにおける尿中アルブミン排泄量の増加を抑制することが報告されている (62, 63, 64)。

本研究の結果では，PAN 誘発糸球体腎炎モデルの尿中 NVs 中の cathepsin L の mRNA 発現量は増加し，プレドニゾロンの投与によってその増加は抑制されていた。mRNA の増加については上述の報告 (62) と一致しており，cathepsin L の発現増加抑制がプレドニゾロンのタンパク尿抑制メカニズムの一つであることが示唆された。

Col1a1, TGF β 1 および α SMA

ポドサイトは通常分裂能や運動能を持たない上皮系の終末分化細胞であると考えられているが，腎障害時には TGF β の増加による刺激によって間葉系細胞に形質転換を起こすことが報告されている (65)。培養ポドサイトを用いた検討において，PAN によるアクチン線

維の再構成を指標とした形質転換が、TGF β 経路を抑制する Smad3 阻害剤により抑制されることも報告されていることから (66), PAN 誘発糸球体腎炎モデルでは TGF β 経路の活性化によりポドサイトの形質転換が生じていると考えられる. TGF β 1 によるポドサイトの形質転換時には Colla1 および α SMA の発現が増加することも報告されている (67). PAN 誘発糸球体腎炎モデルの尿中 NVs 中で観察された Colla1, TGF β 1 および α SMA の mRNA 発現量の増加は, これらの報告と一致するものだった. 一方で Benito らは, 培養近位尿細管細胞を用いた検討において, 高濃度のアルブミンに暴露することで TGF β 1 の mRNA 発現量が増加することを示している (68). PAN 誘発糸球体腎炎モデルでは, PAN による直接的な近位尿細管の障害は生じていないものの, 糸球体障害によりタンパクの漏出が増加し, 近位尿細管は高濃度のアルブミンに暴露されている.

このことから, 尿中 NVs 中で生じていた TGF β 1 の mRNA 発現量の増加は, 近位尿細管で生じた変化を反映している可能性も考えられる. ただし, これらの分子の mRNA 発現量の増加は, 短期間で生じる急激なタンパク尿との正の相関を示していたことから (Figure 15), 直接的な障害が生じている糸球体における変動をより反映していると推測はできる. しかしながら, 病態発症時に複数の部位で共通して生じるような変動については, 尿中 NVs を用いた解析により障害部位を特定することは困難であると想定された.

FSP-1

FSP-1 はカルシウム結合タンパクである S100 ファミリーのメンバーであり, 糸球体腎炎の一種である巣状分節性糸球体硬化症の

糸球体において陽性ポドサイトが増加するといわれているほか、半月体腎炎において尿中 NVs 中の発現量が増加することが知られている (50, 69). 本研究において、PAN 誘発糸球体腎炎モデルの尿中 NVs 中の FSP-1 mRNA 発現量は減少しており、これらの病態とは異なる機序で発症している可能性が示唆された。

本章における検討結果から、複数の遺伝子の尿中 NVs 中の mRNA 発現量が病態発症に応じて増加もしくは低下し、治療介入によりその変化が抑制されていたことから、尿中 NVs 中の mRNA 発現量を検討することにより病態の発症および薬剤の作用機序を間接的に解析できることが示唆された。また、尿中 NVs 中の mRNA 発現量の変化と腎機能の指標の一つである尿中タンパク排泄量の増加が相関していたことから、これらの尿中 NVs の mRNA 発現量の解析により腎機能の障害の程度を予測できる可能性が示唆された。

第IV章 他の腎障害モデル(糖尿病およびメタボリックシンドロームモデル)における汎用性に関する検討

IV - i 実験方法

実験動物および飼育条件

雄性の Zucker lean (ZL)ラットおよび Zucker diabetic fatty (ZDF)ラットを日本チャールス・リバー社より購入して試験に用いた。また、雄性の SHR/NDmcr-cp(+/+)ラットおよび SHR/NDmcr-cp(cp/cp)ラットは日本エスエルシー株式会社より購入して試験に用いた。飼育は第II章と同様の条件で行った。

糖尿病モデルにおける検討

糖尿病の動物モデルとして、インスリン抵抗性および肥満状態を呈し、ヒト成人の2型糖尿病及びその合併症に近い病態を発症する近交系ラットである12週齢のZDFラットを用いた。正常対照群として同週齢のZLラットを用いた。各ラットは20週間飼育し、経時的な採血および採尿を行った。

メタボリックシンドロームモデルにおける検討

メタボリックシンドロームのモデル動物として、高血圧自然発症ラットの中でレプチン受容体遺伝子のナンセンス変異に由来する肥満形質をもち、メタボリックシンドロームに類似する症状を呈する28週齢のSHR/NDmcr-cp(cp/cp)ラットを用いた。対照群としては同週齢のSHR/NDmcr-cp(+/+)ラットを用いた。

尿中パラメータ測定

尿中のアルブミン濃度およびクレアチニン濃度はそれぞれレビスTMラットアルブミン ELISA キット (富士フィルム和光純薬株式会社)およびラボアッセイTMクレアチニンキット (富士フィルム和光純薬株式会社)を用いて、各キットの取り扱い説明書に記載された方法に則って測定した。各キットの定量範囲で適切に測定できるように、各尿サンプルは精製水もしくはキット付属の希釈溶液を用いて希釈して測定した。測定された尿中アルブミン濃度と当該動物の尿量を乗じて一日あたりの排泄量として算出した。

採血および血中グルコース濃度測定

各動物の血中グルコース濃度は次の方法で測定した。血液サンプルは各測定時点において、尾静脈を注射針により穿刺し、ヘマトクリット毛細管を用いて採取した。約 1,000 x g, 4°Cで 15 分間遠心して血漿を分離、採取した。得られた血漿サンプルは精製水で 10 倍に希釈したのち、グルコース CII-テストワコー (富士フィルム和光純薬株式会社)を用いて、キットの取扱説明書に記載された方法に従って測定した。

血圧測定

各動物の血圧は非観血式自動血圧測定装置 (MK-200ST: 室町機械株式会社)を用いて tail-cuff 法により測定した。測定は各動物につき連続 5 回測定し、収縮期血圧の最低値と最高値を除いた 3 回の平均値を評価に用いた。また、測定中に体動などが認められ不適切と判断される測定値は予め除き、測定回数にも含めなかった。

統計解析

本章内で示すデータについては、特に脚注が無い場合すべて平均値±標準誤差の形式で示した。2群間の比較には Student's t-test を用いた。P 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意な差があるとみなした。2つのパラメータ間の相関解析には、Pearson の相関係数解析を行った。すべての統計解析は GraphPad Prism version 7.04 (GraphPad Software, Inc.)を用いて実施した。

その他の試料採取および測定法についてはすべて II - i に示した方法で実施した。

IV - ii 実験結果

糖尿病およびメタボリックシンドロームモデルにおける尿中

NVs 中 mRNA 発現量の変化と腎機能との相関

CKD は糸球体腎炎の他，糖尿病や高血圧，メタボリックシンドローム等，多様な原因により発症する症候群であることから，PAN 誘発糸球体腎炎モデル以外の病態モデルにおいても NVs 中 mRNA 発現量の変化と腎機能が相関しうるかどうかについて検討を行った。

糖尿病の動物モデルとして，インスリン抵抗性および肥満状態を呈し，ヒト成人の 2 型糖尿病及びその合併症に近い病態を発症する近交系ラットである ZDF ラットを用いた実験を行った。12 週齢および 32 週齢の時点における血糖値を測定した結果，ZDF ラットはいずれの時点においても，対照動物である ZL ラットと比較して有意に高い血糖値を示した (Figure 16)。また，糖尿病性腎症において腎機能の指標の一つとして用いられる尿中アルブミン排泄量についても各時点で測定したところ (Figure 16)，ZDF ラットでは 12 週齢時から増加しており，32 週齢時にはさらに経時的な増加が認められた。ZL ラットでは尿中へのアルブミン排泄はほとんど生じておらず，いずれの時点でも ZDF ラットの尿中アルブミン排泄量は有意な高値であった ($P < 0.01$)。以上の結果ら，ZDF ラットにおいては明確な高血糖状態の持続による腎障害が生じていることが確認された。

PAN 誘発糸球体腎炎モデルを用いた検討において，最も高い尿中タンパク排泄量との相関が認められた PNR について糖尿病性腎症モデルでも同様の変化が生じているのかどうかを検討した。32 週齢時点における ZL ラットおよび ZDF ラットの尿中 NVs 中の PNR を測定したところ，ZDF ラットでは ZL ラットに比べて有意な高値を示

した (Figure 17, $P < 0.01$). また, PNR と尿中アルブミン排泄量との
相関を検討したところ, 有意な正の相関が認められ, 相関係数は 0.81
であった (Figure 17, $P < 0.01$).

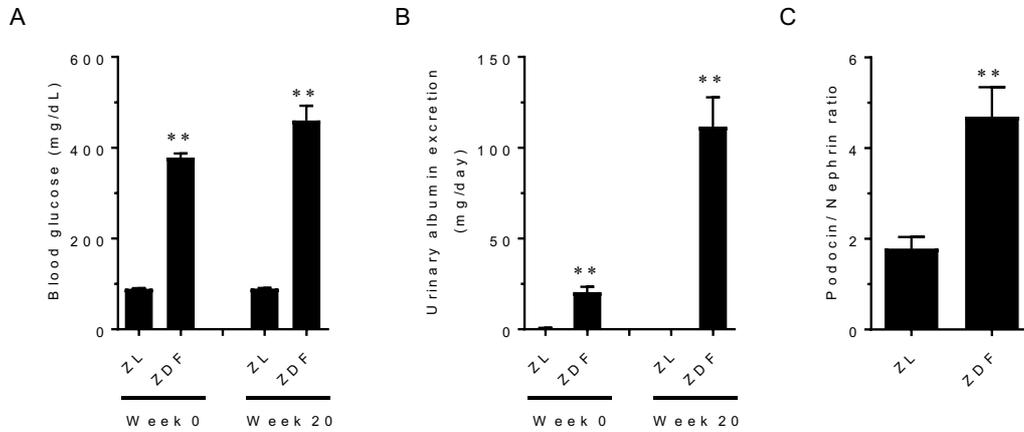


Figure 16. Changes in blood glucose, urinary albumin excretion and in the podocin to nephrin ratio in urinary NVs of ZDF rats. (A) Changes in blood glucose levels and (B) urinary albumin excretion (n=6-12). (C) Changes in the podocin to nephrin ratio in urinary NVs (n=5-8). Data are presented as the mean \pm SEM. **P<0.01 vs. ZL group.

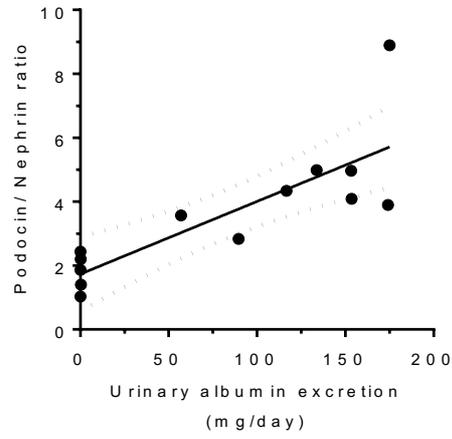


Figure 17. Correlation between podocin to nephrin ratio and urinary albumin excretion in ZDF rats. Solid line, regression line; dotted lines, 95% confidence interval of the slope of the regression line. Correlation coefficient was 0.81.

さらに、メタボリックシンドロームモデルである SHR/NDmcr-cp(cp/cp)ラットにおいても同様に検討を実施した。SHR/NDmcr-cp(cp/cp)ラットおよびコントロール動物である SHR/NDmcr-cp(+/+)ラットはいずれもラットの一般的な正常血圧である 80 - 120 mmHg (70)よりも高値を示しており、各群に差はなかった(Figure 18)。一方、血糖値については SHR/NDmcr-cp(cp/cp)ラットでは、前述の ZDF ラットよりは軽微であるものの SHR/NDmcr-cp(+/+)ラットに比べて有意に高い値であった (Figure 18, $P < 0.01$)。尿中アルブミン排泄量についても測定を行ったところ、SHR/NDmcr-cp(+/+)ラットではほとんど排泄は認められず、SHR/NDmcr-cp(cp/cp)ラットでは有意な高値を示していた (Figure 18, $P < 0.01$)。また、PNR に関しても検討した結果、PAN 誘発糸球体腎炎モデルおよび糖尿病性腎症モデルと同様に、SHR/NDmcr-cp(cp/cp)ラットにおいて SHR/NDmcr-cp(+/+)ラットと比較して有意に高値であった (Figure 18, $P < 0.05$)。さらに PNR と尿中アルブミン排泄量との相関を検討したところ、有意な正の相関が認められ、相関係数は 0.72 であった (Figure 19, $P < 0.05$)。

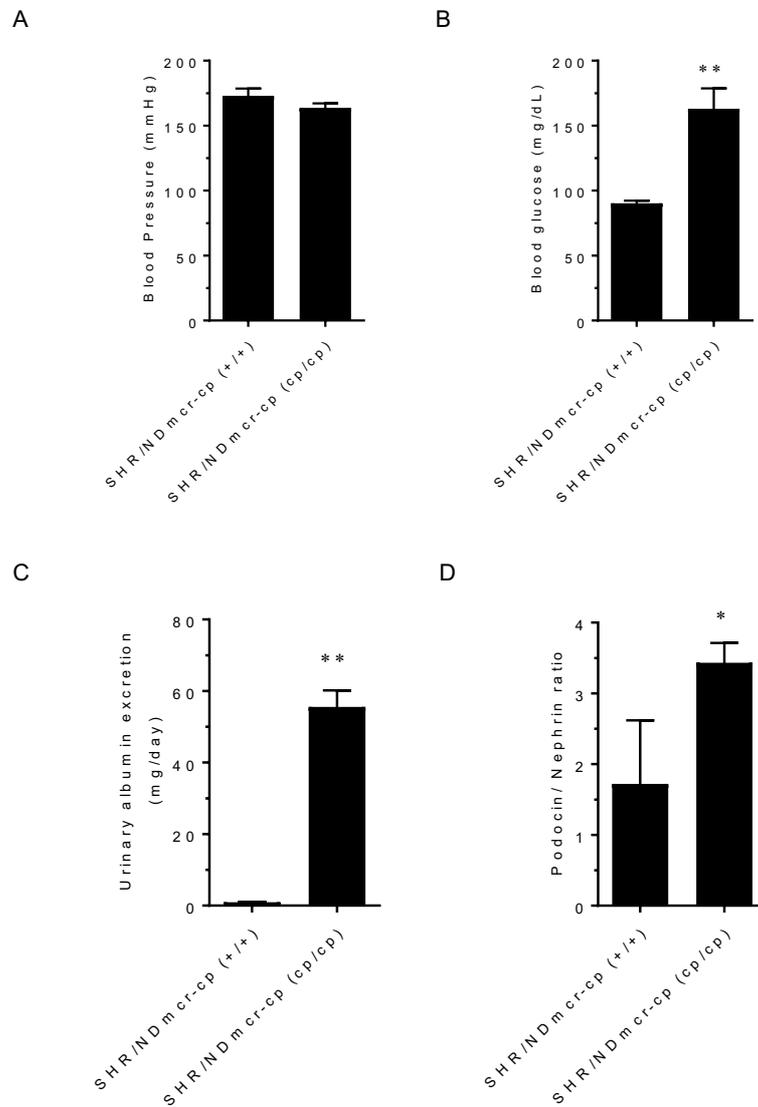


Figure 18. Changes in blood pressure, blood glucose, urinary albumin excretion and in the podocin to nephrin ratio in urinary NVs of SHR/NDmcr-cp (cp/cp). (A) Changes in blood pressure, (B) blood glucose levels, (C) urinary albumin excretion (n=5-10). (D) Changes in the podocin to nephrin ratio in urinary NVs (n=3-7). Data are presented as the mean \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01 vs. SHR/NDmcr-cp (+/+) group

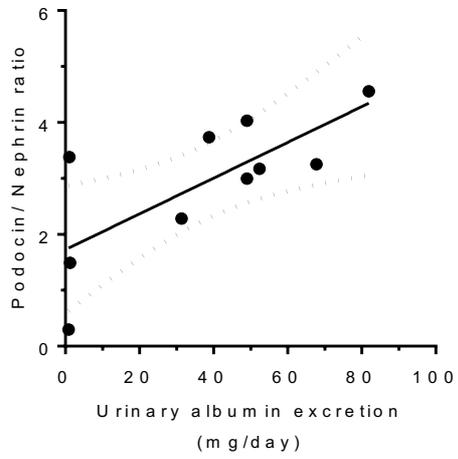


Figure 19. Correlation between podocin to nephrin ratio and urinary albumin excretion in SHR/NDmcr-cp (cp/cp). Solid line, regression line; dotted lines, 95% confidence interval of the slope of the regression line. Correlation coefficient was 0.72.

IV - iii 考察及び小括

糖尿病モデルおよびメタボリックシンドロームモデルにおける尿中 NVs 中 PNR の変動および腎機能との相関

本章には、PAN 誘発糸球体腎炎モデルに加え、糖尿病モデルおよびメタボリックシンドロームモデルを用いて異なるメカニズムにより発症する腎障害においても尿中 NVs 中 PNR が変動しうるかどうかを検討した。その結果、PAN 誘発糸球体腎炎モデルと同様に糖尿病モデルである ZDF ラットおよびメタボリックシンドロームモデルである SHR/NDmcr-cp(cp/cp)においても、尿中 NVs 中 PNR は増加していることが明らかとなった。また、尿中 NVs 中 PNR と尿中アルブミン排泄量がいずれのモデルにおいても相関していることが示された。これらのモデルは、PAN 誘発糸球体腎炎モデルと発症機序は異なっているものの糸球体およびポドサイト障害が生じていることが報告されている (71, 72, 73)。これらの結果から、尿中 NVs 中 PNR の増加は糸球体障害が生じている腎疾患においては共通に認められる現象であり、様々な腎疾患において糸球体障害を非侵襲的に検出し、疾患の重篤度を予測できる有用なバイオマーカーとして活用できることが示唆された。

第V章 総括および今後の展望

これまでの NVs に関する過去の研究においては，血中の NVs を用いた乳がん，肺がん，すい臓がん等様々ながん種に対する liquid biopsy としての応用に関する検討が最も盛んに報告されてきた (74, 75, 76). しかしながら，尿中の NVs を活用した腎臓病のバイオマーカー，liquid biopsy としての有用性に関する報告は，がん等他の疾患と比較してまだまだ限られているのが現状である．そういった状況ではあるものの，尿中 exosomes 中の microRNA がループス腎炎，腎組織の線維化および本態性高血圧症に伴う早期腎障害等の腎臓病のリスク予測因子としての潜在的バイオマーカーとなりうることが報告されている (77, 78, 79, 80). また，尿中 NVs 中の mRNA に関しては，ポドサイトの分化において重要な役割を果たしている形質導入因子である Wilms tumor 1 の尿中 exosomes 中 mRNA が糖尿病性腎症のバイオマーカー候補であるという報告がされている他，別のグループからは尿中 exosomes 中の C-C motif chemokine ligand 2 の mRNA 発現量が IgA 腎症の診断法として利用できる可能性が報告されている (81, 82). 一方で，尿中 NVs 中の mRNA 発現量の変化が，正常時および病態発症時の腎組織の各細胞において生じている変化をどのように反映しているのか，病態発症の機序や重篤度とどのように関連しているのかについては，ほとんど報告がなく，未だに明らかになっていない．

そこで本研究では，尿中に含まれる NVs 中の mRNA 発現に着目し，CKD の原因疾患である糸球体腎炎等の動物モデルを用いて，尿中 NVs 中の mRNA 発現量の変化と組織中の mRNA 発現量の変化

との関連性を検討し，さらに薬物投与による影響および腎機能との相関を検討することで以下の知見を得た．

- 1) PAN 誘発糸球体腎炎モデルにおいて，尿中 NVs 中の desmin mRNA 発現量および PNR が糸球体における変動を適時的に反映していた
- 2) 同モデルにおいて変動が認められた複数の分子の尿中 NVs 中 mRNA 発現量の増加もしくは減少が，プレドニゾロンの投与によって抑制された
- 3) 同モデルにおいて，複数の分子の尿中 NVs 中 mRNA 発現量が，尿中タンパク排泄量と相関を示した
- 4) 糖尿病モデルである ZDF ラットおよびメタボリックシンドロームモデルである SHR/NDmcr-cp(cp/cp)においても尿中 NVs 中の PNR が増加しており，さらにそれが尿中アルブミン排泄量と相関していた

本研究では尿中 NVs 中の mRNA 発現量が腎組織で生じている変化を適時的に反映しており，それらの変動を非侵襲的に検出できる可能性を示した．本研究において検討した各分子はいずれも病態との関連が報告されており，それぞれ疾患の発症メカニズムを反映していると考えられた．しかし，各分子の一つ一つの検討では発症メカニズムの一面を捉えることができるものの，CKD のような極めてへテロな疾患の病態プロファイルを精密に把握，分類することは困難である．

一方，近年のがんに対する liquid biopsy の研究においては，複

数の分子のタンパク量， mRNA 量などを組み合わせることによってより精確な診断が可能であることを示す報告がなされている (15,16). 例えば肺がんに関して， 10 種類の血中 exosomes 中タンパクの組み合わせを用いて機械学習によってモデルを作成することで， 単一マーカーよりも感度および特異度の高い判別が可能であることが報告されている (83). また， 同様に肺がん患者において血中 exosome 中タンパクを deep-learning で解析し， 早期の診断法として検討するような約 500 例規模の臨床研究も行われている (84). 腎疾患においても， tissue inhibitor of metalloproteinase 2 と insulin-like growth factor binding protein 7 の 2 種のタンパクを組み合わせより早期に急性腎障害の診断を行う医療機器が既に米国で承認されている他， 尿中プロテオームの多変量解析により巣状分節性糸球体硬化症や IgA 腎症といった糸球体腎炎を正確に判別できる可能性が報告されている (85, 86).

これらの報告のような尿中に排泄されるタンパク質を用いた分析に比べ， 尿中 NVs を利用した解析法は， 本研究において示した通り， desmin, vimentin 等の細胞骨格系の分子等， 通常では細胞外に分泌されない分子についても非侵襲的にその変動を検出， 解析できるメリットがある． また， 近年ではトランスクリプトーム解析はプロテオーム解析に比べて平均的なコストが低いことに加え， 適切な reference 遺伝子の設定によってより定量性の高い測定ができる可能性もある． 実際にヒトの尿中 NVs 中においても， GAPDH や ACTB のような汎用的な reference 遺伝子が日間変動なく一定の発現量であることも報告されている (87). また， 動物実験と異なりヒトの診断に用いる際の尿検体は一般的に随時尿であるため， より日内変動を規

格化できるような reference 遺伝子の設定が重要であることも推察される。

これらのことを鑑みた場合、尿中 NVs 中 mRNA 発現量の解析による診断法はより低コストかつ簡便で正確な方法に繋がる可能性もあると考えられる。また、尿検体は血液よりも検体採取がさらに容易かつ侵襲性が低く、患者への負担が非常に少ない。糸球体腎炎は幼少期に発症する患者も多く、IgA 腎症等、確定診断に腎生検が必要な場合も存在する (88)。さらに、前述の通り CKD において腎生検が実施される例は極めて少ない。これらの課題に対して、尿中 NVs 中 mRNA 解析による診断法は極めて有効な解決策となることが期待される。

本研究において得られた結果は、尿中 NVs 中の mRNA 発現量が臓器中で生じた変化を反映しうることを示し、障害の発生機序および腎機能の変化を検出する手法に関する重要な情報を提供するものであり、腎疾患の非侵襲的な新たな診断法の開発に対して、非常に有益な情報となりうると考えられる。

謝辞

本論文の作成に際し，懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました筑波大学大学院生命環境科学研究科 深水 昭吉 教授に深甚な謝意を表します。

本論文の作成にあたり，有益な御助言および御高閲を賜りました筑波大学大学院生命環境科学研究科 柏原 真一 准教授，木村 圭志 准教授ならびに 石田 純治 講師に深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり，終始有益な御指導，御鞭撻を賜りました田辺三菱製薬株式会社 荒川 健司 氏に深謝いたします。

本研究の一部は Hitachi Chemical Co. America, Ltd. Taku Murakami 氏，田辺三菱製薬株式会社 持田 英樹 氏，柿本 哲宏 氏ならびに 竹内 理人 氏との共同研究であり，深謝いたします。

本研究の実施について田辺三菱製薬株式会社 吉川 公平 氏，梅田 麻美 氏，白田 成俊 氏，井口 卓 氏ならびに大阪大学大学院薬学研究科 尾花 理徳 准教授に多大な協力をいただきましたことを感謝いたします。

参考文献

1. Davidson AJ: Mouse kidney development StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.34.1, <http://www.stembook.org>. 2009.
2. 日本腎臓学会: エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン 2018.
3. Glasscock RJ, Warnock DG and Delanaye P: The global burden of chronic kidney disease: estimates, variability and pitfalls. *Nat Rev Nephrol* 13: 104-114, 2017.
4. 新田 孝作, 政金 生人, 花房 規男, 後藤 俊介, 阿部 雅紀, 中井 滋, 谷口 正智, 長谷川 毅, 和田 篤志, 濱野 高行, 星野 純一, 常喜 信彦, 三浦 健一郎, 山本 景一, 中元 秀友: わが国の慢性透析療法の現況, *透析会誌* 52 (12): 679-754, 2019.
5. Wang V, Vilme H, Maciejewski ML and Boulware LE: The economic burden of chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Semin Nephrol* 36: 319-330, 2016.
6. Takemoto Y and Naganuma T: Economic issues of chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Contrib Nephrol* 198: 87-93, 2019.

7. Levin A and Stevens PE: Early detection of CKD: the benefits, limitations and effects on prognosis. *Nat Rev Nephrol* 7: 446-457, 2011.
8. Rysz J, Gluba-Brzózka A, Franczyk B, Jabłonowski Z and Ciałkowska-Rysz A: Novel biomarkers in the diagnosis of chronic kidney disease and the prediction of its outcome. *Int J Mol Sci* 18: 2017.
9. 今井 裕一: 腎生検ガイドブック —より安全な腎生検を施行するために— 第2章 腎生検におけるインフォームド・コンセント, *日腎会誌* 47 (2): 76-82, 2005.
10. Hessvik NP and Llorente A: Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci* 75: 193-208, 2018.
11. Raposo G and Stoorvogel W: Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200: 373-383, 2013.
12. Stephanie B and Suresh M: Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *Proteomics Clin Appl* 9(3-4): 358–367, 2005.
13. Yun Z and Xiao FW: A niche role for cancer exosomes in metastasis. *Nat. Cell Biol.* 17: 709–711, 2015.
14. Tarja M, Sanna L and Katja MK: Exosomes in Alzheimer's disease. *Neurochem International* 97: 193-199, 2016.

15. Gabriele DR, Sabna RK and Mary B: Liquid biopsies in cancer diagnosis, monitoring and prognosis. *Trends in Pharmacol Sci.* 40: 172-186, 2019.
16. Rares D, Leonie FO, Ioana BN, Klaus P and George AC: MicroRNAs from liquid biopsy derived extracellular vesicles: recent advances in detection and characterization methods. *Cancers* 12: 1-23, 2020.
17. Braun F and Muller RU: Urinary extracellular vesicles as a source of biomarkers reflecting renal cellular biology in human disease. *Methods Cell Biol* 154: 43-65, 2019.
18. De Palma G, Di Lorenzo VF, Krol S and Paradiso AV: Urinary exosomal shuttle RNA: Promising cancer diagnosis biomarkers of lower urinary tract. *Int J Biol Markers* 34: 101-107, 2019.
19. Gardiner C, Ferreira YJ, Dragovic RA, Redman CW and Sargent IL: Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *J Extracell Vesicles* 2: 2013.
20. Li B, Yao J, Morioka T and Oite T: Nitric oxide increases albumin permeability of isolated rat glomeruli via a phosphorylation-dependent mechanism. *J Am Soc Nephrol* 12: 2616-2624, 2001.

21. Kakimoto T, Okada K, Hirohashi Y, Relator R, Kawai M, Iguchi T, Fujitaka K, Nishio M, Kato T, Fukunari A, et al: Automated image analysis of a glomerular injury marker desmin in spontaneously diabetic Torii rats treated with losartan. *J Endocrinol* 222: 43-51, 2014.
22. Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC, Durvasula RV, Hauser PV, Kowalewska J, Krofft RD, Logar CM, Marshall CB, Ohse T, et al: Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F213-229, 2009.
23. Floege J, Alpers CE, Sage EH, Pritzl P, Gordon K, Johnson RJ and Couser WG: Markers of complement-dependent and complement-independent glomerular visceral epithelial cell injury in vivo. Expression of antiadhesive proteins and cytoskeletal changes. *Lab Invest* 67: 486-497, 1992.
24. Hoshi S, Shu Y, Yoshida F, Inagaki T, Sonoda J, Watanabe T, Nomoto K and Nagata M: Podocyte injury promotes progressive nephropathy in zucker diabetic fatty rats. *Lab Invest* 82: 25-35, 2002.
25. Sonoda H, Yokota-Ikeda N, Oshikawa S, Kanno Y, Yoshinaga K, Uchida K, Ueda Y, Kimiya K, Uezono S, Ueda A, et al: Decreased abundance of urinary exosomal aquaporin-1 in renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F1006-1016, 2009.

26. Fukuda A, Wickman LT, Venkatareddy MP, Sato Y, Chowdhury MA, Wang SQ, Shedden KA, Dysko RC, Wiggins JE and Wiggins RC: Angiotensin II-dependent persistent podocyte loss from destabilized glomeruli causes progression of end stage kidney disease. *Kidney Int* 81: 40-55, 2012.
27. The International Society for Extracellular Vesicles: Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the international society for extracellular vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7: 1-43, 2018
28. He L, Zhu D, Wang J and Wu X: A highly efficient method for isolating urinary exosomes. *Int J Mol Med* 43: 83-90, 2019.
29. Baranyai T, Herczeg K, Onodi Z, Voszka I, Modos K, Marton N, Nagy G, Mager I, Wood MJ, El Andaloussi S, et al: Isolation of exosomes from blood plasma: qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS One* 10: e0145686, 2015.
30. Wu M, Ouyang Y, Wang Z, Zhang R, Huang PH, Chen C, Li H, Li P, Quinn D, Dao M, et al: Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and microfluidics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 10584-10589, 2017.

31. Feng Y, Lv LL, Wu WJ, Li ZL, Chen J, Ni HF, Zhou LT, Tang TT, Wang FM, Wang B, et al: Urinary exosomes and exosomal CCL2 mRNA as biomarkers of active histologic injury in IgA nephropathy. *Am J Pathol* 188: 2542-2552, 2018.
32. Kobina E, Liwang Y, Xiaohong W, Wei H, Dongze Q, Jiukuan H, Yigang W, Basilia Z, Tianqing P and Guo-Chang F: Blockade of exosome generation with GW4869 dampens the sepsis-induced inflammation and cardiac dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1852: 2362-2371, 2015.
33. Teresa J, Maja MJ, Karolina S and Tadeusz J: Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS Letters* 589: 1391-1398, 2015.
34. Li Z, Mericskay M, Agbulut O, Butler-Browne G, Carlsson L, Thornell LE, Babinet C and Paulin D: Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *J Cell Biol* 139: 129–44, 1997.
35. Aurélie P, Fabien N, Ernie LE, Dalia R, Olivier G, Marie-Josèphe T, Chantal L, Jacques D, Michel F, Claire P, Stéphane D, Martin H, Thomas B, Marina C, Patrick N and Corinne A: Nephtrin mutations can cause childhood-onset steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 19: 1871–1878, 2008.

36. Puneet G: A review of podocyte biology. *Am J Nephrol* 47: 3-13, 2018.
37. Vesa R, Päivi L, Jorma W, Ulla L, Marjo K, Hannu J, Christer H and Karl T: Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7962-7967, 1999.
38. Tobias BH, Matias S, Björn H, Leonie S, Miriam S, Enken G, Moin AS, Gerd W and Thomas B: Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet* 12: 397-405, 2003.
39. Fukuda A, Wickman LT, Venkatareddy MP, Wang SQ, Chowdhury MA, Wiggins JE, Shedden KA and Wiggins RC: Urine podocin:nephrin mRNA ratio (PNR) as a podocyte stress biomarker. *Nephrol Dial Transplant* 27: 4079-4087, 2012.
40. Soren N, Jorgen F, David M, Tae-Hwan K, Peter A and Mark AK: Aquaporins in the kidney: From molecules to medicine *Physiol Rev* 82: 205-244, 2002.
41. Xia L, Zhou M, Kalhorn TF, Ho HT and Wang J: Podocyte-specific expression of organic cation transporter PMAT: implication in puromycin aminonucleoside nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F1307-1313, 2009.

42. Spanu S, van Roeyen CR, Denecke B, Floege J and Muhlfield AS: Urinary exosomes: a novel means to non-invasively assess changes in renal gene and protein expression. *PLoS One* 9: e109631, 2014.
43. Yatsu T, Aoki M and Tanaka A: Effect of zelandopam, a dopamine D1-like receptor agonist, in puromycin aminonucleoside nephrosis rats. *Eur J Pharmacol* 510: 121-126, 2005.
44. Wang Y, Jarad G, Tripathi P, Pan M, Cunningham J, Martin DR, Liapis H, Miner JH and Chen F: Activation of NFAT signaling in podocytes causes glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 21: 1657-1666, 2010.
45. Jin-Song H, Kayo H, Satoshi H, Kazuhiko F, Isao S and Yasuhiko T: Identification of cellular origin of type 1 collagen in glomeruli of rats with crescentic glomerulonephritis induced by anti-glomerular basement membrane antibody. *Nephrol dial Transplant* 16: 704-711, 2001.
46. Ayesha G and Peter JM: Transforming growth factor-beta and the glomerular filtration barrier. *Kidney Res Clin Pract* 32: 3-10, 2013.
47. Charles EP, Stewart F, Colin GM, Christopher OB, Michael L, Lee S, John M, Nicholas DH and Martin LH: Murine Denys–Drash syndrome: evidence of podocyte de-differentiation and systemic

mediation of glomerulosclerosis. *Human Molecular Genetics* 12: 2379-2394, 2003.

48. Zana SN, Merica GD, Livia P, Marijan S, Dragan L, Tomislav F, Zvonimir P, Antonia B and Katarina V: The interstitial expression of alpha-smooth muscle actin in glomerulonephritis is associated with renal function. *Med Sci Monit* 18: 235-240, 2012.

49. Keisuke S, Kohei M, Takuji E, Tomoki M, Yuishi M, Rina O, Tsukasa T and Mitsuru O: Role of cathepsin L in idiopathic nephrotic syndrome in children. *Medical Hypotheses* 141: 1-3, 2020.

50. Samejima K, Nakatani K, Suzuki D, Asai O, Sakan H, Yoshimoto S, Yamaguchi Y, Matsui M, Akai Y, Toyoda M, Iwano M and Saito Y: Clinical significance of fibroblast-specific protein-1 expression on podocytes in patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron Clin Pract* 120: c1-c7, 2012.

51. Gerald RC and Eric NO: NFAT signaling. *Cell* 109: S67-S79, 2002

52. Zhang K, Sun W, Zhang L, Xu X, Wang J and Hong Y: miR-499 ameliorates podocyte injury by targeting calcineurin in minimal change disease. *Am J Nephrol* 47: 94-102, 2018.

53. Spurney RF: Non-immunologic actions of calcineurin inhibitors in proteinuric kidney diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5: 181, 2014.
54. Ding F, Li X, Li B, Guo J, Zhang Y and Ding J: Calpain-mediated cleavage of calcineurin in puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury. *PLoS One* 11: e0155504, 2016.
55. Shen X, Jiang H, Ying M, Xie Z, Li X, Wang H, Zhao J, Lin C, Wang Y, Feng S, et al: Calcineurin inhibitors cyclosporin A and tacrolimus protect against podocyte injury induced by puromycin aminonucleoside in rodent models. *Sci Rep* 6: 32087, 2016.
56. Sipka S, Szücs K, Szántó S, Kovács I, Lakos G, Antal-Szalmás P, Szegedi G and Gergely P: Inhibition of calcineurin activity and protection against cyclosporine A induced cytotoxicity by prednisolone sodium succinate in human peripheral mononuclear cells. *Immunopharmacology* 48: 87-92, 2000.
57. Sipka S, Szucs K, Szántó S, Kovács I, Lakos G, Kiss E, Antal-Szalmás P, Szegedi G and Gergely P: Glucocorticosteroid dependent decrease in the activity of calcineurin in the peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 60: 380-384, 2001.

58. Jun Z, Eishin Y, Yusuke W, Yutaka Y, Masaaki N, Huiping L, Zhenyun Q and Tadashi Y: Upregulation of nestin, vimentin, and desmin in rat podocytes in response to injury. *European J Pathol* 448: 485-492, 2006.
59. Nicole E, Kai RK, Jochen R, Dietmar U, Wilhelm K, Peter M and Karlhans E: Podocytes respond to mechanical stress In vitro. *J Am Soc Nephrol* 12: 413-422, 2001.
60. Michio N: Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int* 89: 1221-1230 2016.
61. Barrett AJ and Kirschke H: Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. *Methods Enzymol* 80: 535–561, 1981
62. Ayano K, Isao S, Teruo H, Miyuki T, Yu S, Katsuhiko A, Kazumi I, and Yusuke S: Expression of cathepsin L and its intrinsic inhibitors in glomeruli of rats with puromycin aminonucleoside nephrosis. *J Hischem Cytochem* 66: 863-877, 2018.
63. Jochen R, Jun O, Isao S, Katsuhiko A, Andreas H, Thomas MM, Karen H, Kazumi I, Eiki K, Jordan AK Yasuhiko T and Peter M: Podocyte migration during nephrotic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and alpha-3 integrin. *J Bio Chem* 279: 34827-34832, 2004.

64. Marjolein G, Angelique LWMMR, Henry D, Brigith W, Toin H van K, Frans GR, Ton JR, Jo HMB, Thomas R and Johan van der V: Cathepsin L is crucial for the development of early experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* 90: 1012-1022, 2016
65. Yingjian L, Young SK, Chunsun D, Lawrence PK, Xiaoyan W and Youhua L: Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *Am J Pathol* 172: 299-308, 2008.
66. Lina J, Hong C, Jie D, Aijun Y and Yingchao Z: Puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury is ameliorated by the Smad3 inhibitor SIS3. *FEBS Open Bio* 10: 1601-1611, 2020.
67. Chen-an C, Jyh-Chang H, Jinn-Yuh G, Jer-Chia T and Hung-Ghun C: TGF-beta 1 and integrin synergistically facilitate the differentiation of rat podocytes by increasing alpha-smooth muscle actin expression. *Translational Res* 148: 134-141, 2006.
68. Benito AY, Emmanuel C, Dieter H and Fokko J van der W: Regulation of endothelin-1 and transforming growth factor-beta 1 production in cultured proximal tubular cells by albumin and heparan sulphate glycosaminoglycans. *Nephrol Dial Transplant* 16: 1769-1775, 2001.

69. Morikawa Y, Takahashi N, Kamiyama K, Nishimori K, Nishikawa Y, Morita S, Kobayashi M, Fukushima S, Yokoi S, Mikami D, Kimura H, Kasuno K, Yashiki T, Naiki H, Hara M and Iwano M: Elevated levels of urinary extracellular vesicle fibroblast-specific protein 1 in patients with active crescentic glomerulonephritis. *Nephron* 141: 177-187, 2019.
70. Hidehiko T, Masao S and Fujio K: Effect of gamma-aminobutyric acid (GABA) on normotensive or hypertensive rats and men. *Japanese J Physiol.* 11: 89-95, 1961.
71. Funk J, Ott V, Herrmann A, Rapp W, Raab S, Riboulet W, Vandjour A, Hainaut E, Benardeau A, Singer T, et al: Semiautomated quantitative image analysis of glomerular immunohistochemistry markers desmin, vimentin, podocin, synaptopodin and WT-1 in acute and chronic rat kidney disease models. *Histochem Cell Biol* 145: 315-326, 2016.
72. Masaomi N, Yuko I, Nobuteru U, Reiko I, Takeo S, Satoshi S, Kiyoshi K, Charles van Y de S and Toshio M: In a type 2 diabetic nephropathy rat model, the improvement of obesity by a low calorie diet reduces oxidative/carbonyl stress and prevents diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 20: 2661-2669, 2005.
73. Shzuyo T, Yurie Y, Tohru Y, Atsushi M, Daisuke K, Naomi K and Yoichi K: Characterization of fatty acid profile in the liver of

SHR/NDmcr-cp (cp/cp) rats, a model of the metabolic syndrome. *Biol Pharm Bull* 35: 184-191, 2012.

74. Alimirzaie S, Bagherzadeh M and Akbari MR: Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. *Clin Genet* 95: 643-660, 2019.

75. Cui S, Cheng Z, Qin W and Jiang L: Exosomes as a liquid biopsy for lung cancer. *Lung Cancer* 116: 46-54, 2018.

76. Nuzhat Z, Kinhal V, Sharma S, Rice GE, Joshi V and Salomon C: Tumour-derived exosomes as a signature of pancreatic cancer - liquid biopsies as indicators of tumour progression. *Oncotarget* 8: 17279-17291, 2017.

77. Perez-Hernandez J, Forner MJ, Pinto C, Chaves FJ, Cortes R and Redon J: Increased urinary exosomal microRNAs in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 10: e0138618, 2015.

78. Lv LL, Cao YH, Ni HF, Xu M, Liu D, Liu H, Chen PS and Liu BC: MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F1220-1227, 2013.

79. Chun-Yan L, Zi-Yi Z, Tian-Lin Y, Yi-Li W, Bao L, Jiao L and Wei-Jun D: Liquid biopsy biomarkers of renal interstitial fibrosis based on urinary exosome. *Exp Mol Pathol* 105: 223-228, 2018.

80. Perez-Hernandez J, Olivares D, Forner MJ, Ortega A, Solaz E, Martinez F, Chaves FJ, Redon J and Cortes R: Urinary exosome miR-146a is a potential marker of albuminuria in essential hypertension. *J Transl Med* 16: 228, 2018.
81. Abe H, Sakurai A, Ono H, Hayashi S, Yoshimoto S, Ochi A, Ueda S, Nishimura K, Shibata E, Tamaki M, et al: Urinary exosomal mRNA of WT1 as diagnostic and prognostic biomarker for diabetic nephropathy. *J Med Invest* 65: 208-215, 2018.
82. Feng Y, Lv LL, Wu WJ, Li ZL, Chen J, Ni HF, Zhou LT, Tang TT, Wang FM, Wang B, et al: Urinary exosomes and exosomal CCL2 mRNA as biomarkers of active histologic injury in IgA nephropathy. *Am J Pathol* 188: 2542-2552, 2018.
83. Birgitte SP, Kristine RJ, Rikke B, Birgitte HF, Torben RR, Peter M, Kim V, Malene MJ and Boe SS: Exosomal proteins as diagnostic biomarkers in lung cancer. *J Thoracic Oncol* 11: 1701-1710, 2016.
84. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04529915>
85. Mohsen N, Shiva K, Shiva S, Mostafa RT, Dorothea R and Roman AZ: The novel diagnostic biomarkers for focal segmental glomerulosclerosis. *Inter J Nephrol*: 574261, 2014.

86. Shiva S, Shiva K, Mohsen N, Dorothea R, Mostafa RT, Mahmud P, Roman AZ: Diagnostic urinary proteome profile for immunoglobulin A nephropathy. *Iranian J Kidney Diseases* 9: 239-248, 2015.
87. Taku M, Melanie O, Mieko O, Vivian T, Cindy Y and Masato M: Development of glomerulus-, tubule-, and collecting duct-specific mRNA assay in human urinary exosomes and microvesicles. *PLoS One* 9: e109074, 2014.
88. 平方 秀樹: 腎生検ガイドブック —より安全な腎生検を施行するために— 第1章 腎生検の適応と禁忌, *日腎会誌* 47 (2): 73-75, 2005.