

学位論文

「血中プロレニン濃度の臨床的意義に関する検討」

DM17006 川村 沙友希

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 内分泌代謝内科学
指導教授 七里 眞義

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

論文要旨

内分泌疾患の診療においては、血中や尿中の様々なホルモン濃度を測定して診断を行っている。原発性アルドステロン症やその他レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系に関わる疾患や病態の評価には血漿レニン活性が用いられているが、血漿レニン活性は体位変換や薬剤の影響で大きく変動するため、正確な評価のためには一定期間の薬剤中止や、食事や体位の制限を設けたうえで採血を施行する必要がある。その煩雑さや様々な因子の影響を加味し評価する必要があることから臨床的に頻用されにくい現状がある。そこで、血漿レニン活性に代わる、もしくは補助的な臨床指標の可能性としてプロレニンに着目した。プロレニンは腎臓の傍糸球体細胞で産生され循環血液中に分泌されるが、一部は細胞内で活性型レニンにプロセシングされて分泌される。プロレニンが循環血液中の主な形であり、レニンの血中濃度よりも 10 倍以上高濃度で血漿中に存在するとされている。これまでのプロレニン測定に関する報告においては、プロレニン活性で代用する方法や、総レニン濃度からプロレニン濃度を間接的に求める方法が多く用いられており、プロレニン分子を直接的に捉える測定系で臨床に用いられるものはない。本研究室では独自の「網羅的抗表面抗原抗体作製法」を用いてプロレニンオープン構造部位 N 端の 11 アミノ酸配列に特異的な家兎由来ポリクローナル抗体を作成し、これにマウス由来抗プロレニンオープン構造部位 C 端側モノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチ免疫酵素抗体法 (ELISA) の確立に成功した。本研究において血漿および血清プロレニン濃度の臨床的意義を検討することを目的とした。

ウェスタン解析より、ヒト血漿免疫反応性プロレニンは 3 つ、血清免疫反応性プロレニンは 2 つの主要な成分で構成されていた。血漿と血清で共通して、翻訳後修飾を受けたプロレニン全長と C 端側レニン/プロレニン共通配列で切断された断片が存在した。血漿中で検出可能であった高分子量のアルブミン結合プロレニンは、ヒト血清中には存在しなかった。新たに確立した ELISA でも、血清および血漿プロレニン濃度は相関していたが、血清プロレニン濃度は血漿より低値であった。血漿および血清ともにプロレニンは翻訳後修飾を受けており、翻訳後修飾の影響で抗体による免疫反応が阻害されプロレニン分子を確実に捉えて測定することが困難となっていた可能性が示唆される。新たに確立した ELISA ではプロレニンプロセグメント領域に特異的な抗体を使用し、プロレニン分子を確実に捉え正確なプロレニン濃度の算出ができる可能性がある。ELISA で測定した血清プロレニン濃度は男性に比べ女性で有意に高値であり、プロレニンが黄体期に上昇することが影響していたと考えられる。血中プロレニン濃度は、体位変換による生理的変動の影響を受けず、外来での随時採血での評価が可能な安定的な指標であると考えられ、今後の病態評価に活用できることが期待される。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 方法	
2-1. 材料	2
2-2. IgG の精製	2
2-3. 免疫沈降	2
2-4. N型糖鎖切断酵素処理	2
2-5. ウェスタンブロッティング	3
2-6. ELISA	3
2-7. 対象	3
2-8. 血液検体採取	4
2-9. 統計解析	4
2-10. 倫理承認と参加への同意	4
3. 結果	
3-1. pro1-11 抗体の検討	4
3-2. 血中プロレニン分子存在型	5
3-3. 血中プロレニン濃度の ELISA の確立	7
3-4 健常者の血中プロレニン濃度	8
3-4-1. 血漿と血清プロレニン濃度	8
3-4-2. 性別と血中プロレニン濃度	8
3-4-3. 体位変換と血中プロレニン濃度	9
4. 考察	10
5. 総括	12
6. 今後の課題	12
7. 謝辞	13
8. 引用文献	13
9. 業績目録	14

1. 序論

内分泌疾患の多くは、何らかの原因によりホルモンが過剰もしくは欠乏状態となることで症状や機能障害を来す病態である。一つのホルモンが体内の様々な臓器に影響を与えそれぞれの兆候を来すため症状が多彩であり、全身の所見を観察し評価することが重要である。この内分泌疾患の診断法として、血液、尿などの生体内のホルモン濃度の測定を行い過剰もしくは欠乏状態の診断をしている。体内のホルモン濃度は常に一定ではなく時間帯や状況に応じて変化し、さらに基礎疾患や栄養状態、ストレス度合いなどの多様な因子を加味して診断する必要がある。

その中でも、レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系に関わる疾患や病態の臨床評価には血漿レニン活性と血漿アルドステロン濃度が用いられている。血漿レニン活性は、体位変換や薬剤の影響で大きく変動するため、一定期間の薬剤中止や食事・体位の制限を設けたうえで採血を施行している。その煩雑さや、様々な因子の影響を加味する必要があることから診断に苦慮する場面も多く、臨床的に頻用されにくい現状がある。そのため、血漿レニン活性に代わるもしくは補助的な臨床指標の可能性としてプロレニンに着目した。

プロレニンは、1971年に Lumbers によってヒト羊水中に不活性型レニンとして発見された [1]。その後プロレニンは、血液中、腎臓でも存在が報告され、現在までに卵巣、胎盤、精巣、眼、副腎など多臓器に存在することがわかっている [2]。この中でもプロレニンの主要な産生場所は腎臓である。腎臓の傍糸球体細胞で産生されたプロレニンの大部分は循環血液中に分泌される。プロレニンの一部がレニンにプロセシングされて分泌されるが、プロレニンが循環血液中の主な形であり、レニンの 10 倍以上高濃度で血液中に存在している [3]。これまでのプロレニン測定に関する報告においては、プロレニン活性で代用する方法や、総レニン濃度からレニン濃度を引き算してプロレニン濃度を間接的に求める方法が多く用いられており [4, 5]、プロレニン分子を直接的に捉える測定系で臨床に用いられるものはないのが現状である。

著者らが所属する研究室では独自の「網羅的抗表面抗原抗体作製法」を用いてプロレニンオープン構造部位 N 端の 11 アミノ酸配列に特異的な家兔由来ポリクローナル抗体を作成し、これにマウス由来抗プロレニンオープン構造部位 C 端側モノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチ免疫酵素抗体法 (ELISA) の確立に成功した [6]。

プロレニンを直接的に捉える測定系を用い、血中プロレニンの臨床的意義を明らかにすることを目的に研究を行った。

2. 方法

2-1. 材料

プロレニン標準品であるリコンビナントヒトプロレニンは Cayman Chemical 社（米国）より購入し、プロレニンに対するモノクローナル抗体である抗プロレニンプロセグメント 30-43 抗体（以下 pro30-43 抗体）は Molecular Innovations 社（米国）より購入した。プロレニンに対するポリクローナル抗体については 2-2 で詳細を記載する。

その他、プロテイン A 固相免疫沈降用磁気ビーズ（Sure Beads Protein A Magnetic Beads）、1×レムリサンプルバッファー、10% ポリアクリルアミドゲル（10% Mini-PROTEAN® TGX™ Gels）、PVDF メンブレン（Immuno-Blot® PVDF Membrane For Protein Blotting）、ヤギ由来抗マウス IgG(H+L)-HRP、ヤギ由来抗ウサギ IgG(H+L)-HRP、分子量マーカーの Precision Plus Protein™ Western C™ Protein Standards と、Precision Plus Protein™ Dual Color Standards は、Bio-Rad laboratories 社（米国）より購入した。

N 型糖鎖切断酵素は Zyme Scientifics 社（米国）、バッファーのヒカリ A 液、ヒカリ B 液はナカライテスク（日本）、ウェスタンブロッティング検出試薬（Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagents）は GE Healthcare Life Sciences 社（英国）より購入した。

2-2. IgG の精製

プロレニン N 端 1 から 11 番目のアミノ酸配列（プロセグメント 1-11）の合成ペプチド LPTDTTTFKRI-[Cys⁰]を作成、精製し、既報[6]の通り家兔に免疫した。獲得した抗血清を Melon™ gel IgG Purification Kit（Thermo Fisher Scientific 社，米国）でプロトコール通り処理しポリクローナル抗プロレニンプロセグメント 1-11 抗体（以下 pro1-11 抗体）を精製した。

2-3. 免疫沈降

免疫沈降は、プロテイン A 固相免疫沈降用磁気ビーズに各種 IgG 抗体 5μg 溶液を添加し、室温で 60 分インキュベートを行った後、Tween®20 添加 PBS（PBS-T）で 3 回洗浄した。その後、抗原となるプロレニン標準品、ヒト血漿検体をビーズに添加して室温で 1 時間、回転混和しながら反応させた。さらに PBS-T で 3 回洗浄した後、ジチオトレイトール（DTT）を含む 1×レムリサンプルバッファーを添加して 70℃で 10 分反応させて溶出した。

2-4. N 型糖鎖切断酵素処理

血漿もしくは血清に対して N 型糖鎖切断酵素を加え 1×PBS で希釈し 37℃で 1 時間反応させた。

2-5. ウェスタンブロッティング

プロレニン標準品、ヒト血漿および血清検体を 355 mM β メルカプトエタノール添加 1×レムリサンプルバッファと混合し、10%ポリアクリルアミドゲルを用い、Power Pac[™] HC Power Supply (Bio-Rad) でドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis : 以下, SDS-PAGE) を行った。PVDF メンブレンに転写し、3%ウシ血清アルブミンでブロッキング、1 次抗体として抗プロレニン抗体を反応させた。2 次抗体はヤギ由来抗マウス IgG (H+L)-HRP もしくはヤギ由来抗ウサギ IgG (H+L)-HRP を反応させ、最終的にウェスタンブロッティング検出試薬で検出し Image Quant LAS4000 (GE Healthcare 社、米国) で撮影した。

2-6. ELISA

ELISA は既報[6]に従い、以下変更点を加え、全ての各検体の測定は 3 ウェル分を使用し 3 重に行った。また、以下工程の洗浄は各 3 回ずつ PBS-T を用いて施行した。96 ウェル平底ブラックマイクロプレートに pro1-11 抗体溶液を固相し 2 晩 4℃で静置した。プレートを洗浄し、1×カゼインをプレートへ添加し室温で静置した。ヒカリ A 液を用い、プロレニン標準品希釈液 (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μ g/ml 希釈系列) と血清および血漿 20 倍希釈液を作成し、各々を pro30-43 抗体希釈液と混合し 37℃で 1 時間 45 分間反応させた。この反応後の混合液を、ブロッキング後に洗浄を行ったプレートへ添加し、さらに 37℃で 1 時間 45 分間反応させた。その後、プレートを洗浄し、ヤギ由来抗マウス IgG (H+L)-HRP 希釈液を遮光下室温で反応させた。プレートを洗浄し、0.005% H_2O_2 添加 0.5% 3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸液を入れて遮光下室温で 1 時間反応させた。0.1M グリシン-水酸化ナトリウム液 (pH10.3) を追加し、反応を停止した。蛍光測定は、Spectra Max M2 microplate reader (Molecular Devices 社、米国) を使用し、励起波長 320nm、蛍光波長 405nm で測定した。プロレニン標準品の各希釈系列の蛍光測定平均値からブランク測定平均値を引き標準曲線を作成した。各サンプル値も同様に平均値からブランク測定平均値を引き、標準曲線より得られた計算式に当てはめ濃度計算を行った。

また、市販されている human renin quantikine ELISA kit (R&D Systems 社、米国) [7] をプロトコールに従って使用し、ヒト血漿のレニン/プロレニン濃度を測定した。

2-7. 対象

対象は、健常者 40 人 (男性 25 人、女性 15 人)、年齢 21-72 歳 (平均 42.1 ± 13.6 歳) である。基礎疾患がない健常者でインフォームド・コンセントが得られる方を公募にて募集した。健康診断結果を持参いただき、問診とあわせて基礎疾患がないことを確認し、継続的な疾患治療中や内服加療中の方を除外した。研究目的について十分に説明し、本人の自由意思に基づき同意を得られた方を対象とした。

2-8. 血液検体採取

研究対象者の血液検体を EDTA-2Na もしくは血清分離剤入りの真空採血管(ベノJECT[®] II 真空採血管; テルモ株式会社)へ各々採取した。前者はすぐに氷冷し、3000rpm(1469×g)・20 分で血漿を冷蔵遠心分離した。後者は、約 1 時間、室温にて凝固させたのち血清を遠心分離した。分離した血漿および血清を、測定を行うまで-30℃で保存した。

2-9. 統計解析

データは平均値±SD で示し、 $P<0.05$ を統計学的に有意と判断した。統計解析は、JMP v5 (SAS institute 社、米国) と Prism 5 (GraphPad Software 社、米国) を用いて施行した。性別による 2 群間のプロレニン濃度の比較には、Mann-Whitney U 検定を使用し、体位変換や N 型糖鎖切断酵素の使用の有無によるプロレニン濃度変化の比較には対応のある t 検定を用いた。

2-10. 倫理承認と参加への同意

この研究計画は北里大学医学部・病院倫理委員会 (B19-084) で承認され、全ての参加者より書面によるインフォームド・コンセントを取得している。

3. 結果

3-1. pro1-11 抗体の検討

血漿とプロレニン標準品を pro1-11 抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE を行い、pro1-11 抗体でウェスタンブロッティングすることで pro1-11 抗体が捉えるタンパクを同定した。以前、本研究室から報告された結果では pro1-11 抗体 1000 倍希釈でウェスタンブロッティングを施行しており [6]、pro1-11 抗体濃度をさらに 5000 倍希釈としてプロレニン標準品と血漿プロレニンを捕捉できるか確認を行った。既報 [6] 同様、プロレニン標準品とヒト血漿で共通する 2 つの強いシグナルバンドが検出された。2 つのうち上方 (矢印 a) は免疫沈降で使用した IgG の重鎖と考えられるバンド、下方 (矢印 b) はプロレニン全長 (43kDa) と考えられるバンドであった (図 1)。また、免疫沈降を行っていないプロレニン標準品を SDS-PAGE し、pro1-11 抗体を用いウェスタンブロッティングした結果では 43kDa の単一のバンドのみが検出され、タンパク量勾配に対応してバンド色の濃度勾配を認めた [6]。Pro1-11 抗体は、血液中のプロレニン全長を特異的に捕捉していると考えられた。

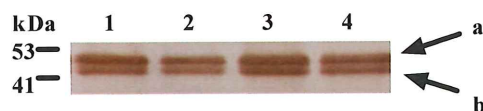


図1 pro1-11 抗体の特異性

プロレニン標準品（レーン 1, 10ng; レーン 2, 1ng）とヒト血漿（レーン 3, 1μl; レーン 4, 0.1μl）を pro1-11 抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングを行った。ウェスタンブロッティングの 1 次抗体は免疫沈降で使用した抗体と同じ pro1-11 抗体（1:5000）を使用し、2 次抗体はヤギ由来抗ウサギ IgG(H+L)-HRP（1:3000）を使用した。

3-2. 血中プロレニン分子存在型

血漿および血清に存在するプロレニン分子の比較を行うため pro30-43 抗体を用いて、SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングを行った。プロレニン標準品、血漿・血清においてもサンプルの濃度勾配に応じてシグナル強度勾配を示しており、pro30-43 抗体がプロレニンを特異的に認識していることが考えられた（図 2）。既報[6]同様、血漿では 3 つのバンドが検出され、血清では 2 つのバンドが検出された。血漿と血清で共通して、プロレニン標準品と同レベルのバンド（赤矢印）と低分子量バンド（青矢印）が検出されたが、高分子量を示すバンド（緑矢印）は血清では検出されなかった（図 2）。また、プロレニン標準品と同レベルの血漿・血清のバンド（赤矢印）はプロレニン全長を示していると考えられるが、プロレニン標準品よりわずかに高分子量を示していた（図 2）。血漿・血清を N 型糖鎖切断酵素で処理すると、既報の血漿[6]同様、血清においてもプロレニン全長を示すバンド分子量は低下し（図 3 赤矢印）、糖鎖修飾を受けていることが明らかになった。

レニンとプロレニンの合計濃度を測定する市販の human renin quantikine ELISA kit で健常者 6 人分の血漿を測定した。血漿レニン+プロレニン濃度が 553.6 ± 223.5 pg/ml であった[6]のに対し、同一検体で N 型糖鎖切断酵素処理をした血漿レニン+プロレニン濃度は 618.6 ± 249.0 pg/ml であり、N 型糖鎖を切断することにより ELISA で測定できる血漿レニン+プロレニン濃度に上昇がみられた ($p = 0.0353$ 、図 4)。

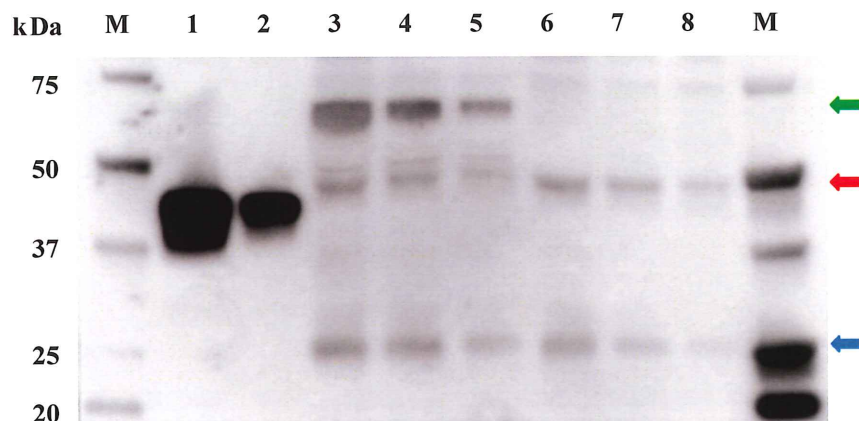


図2 血漿と血清のプロレニン分子

プロレニン標準品（レーン1, 10ng; レーン2, 2.5ng）、ヒト血漿（レーン3, 0.2 μ l; レーン4, 0.1 μ l; レーン5, 0.05 μ l）およびヒト血清（レーン6, 0.2 μ l; レーン7, 0.1 μ l; レーン8, 0.05 μ l）を SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングした。1次抗体には pro30-43 抗体 (1:3000) を使用し、2次抗体はヤギ由来抗ウサギ IgG (H+L)-HRP (1:12000) を使用した。



図3 プロレニンの翻訳後修飾

ヒト血漿（レーン3-5, 0.1 μ l）およびヒト血清（レーン6-8, 0.1 μ l）; 通常検体（レーン3, 6）、37 $^{\circ}$ Cインキュベートのみ（レーン4, 7）、37 $^{\circ}$ Cインキュベート N 型糖鎖切断酵素処理（レーン5, 8）を SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングした。1次抗体には pro30-43 抗体 (1:4500) を使用し、2次抗体はヤギ由来抗マウス IgG (H+L)-HRP (1:20000) を使用した。

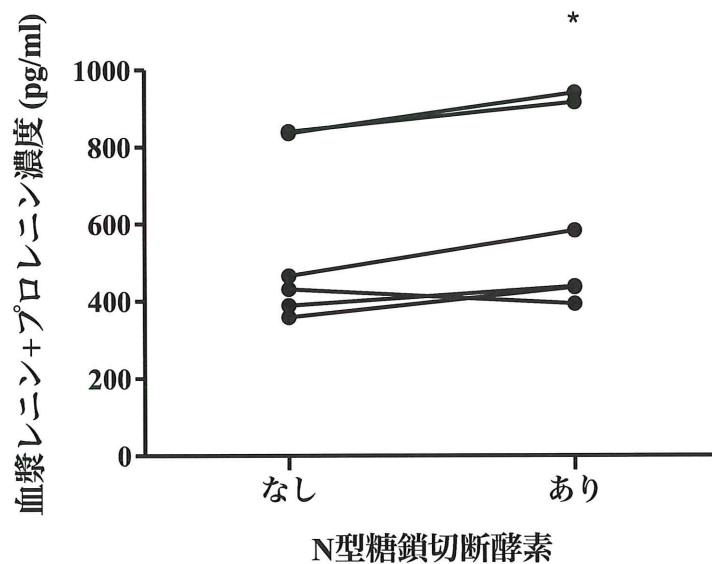


図4 N型糖鎖切断酵素処理による血漿レニン+プロレニン濃度の変化

健康者 6 人分の検体で、N 型糖鎖切断酵素処理を行った血漿と酵素処理を行っていない血漿のレニン+プロレニン濃度を human renin quantikine ELISA kit を用いて測定した。

3-3. 血中プロレニン濃度の ELISA の確立

血漿プロレニンサンドイッチ ELISA を既報[6]の通り確立しているが、実臨床では血清検体の採取機会が多いことから、血清プロレニン濃度に関しても ELISA を確立した。血清でも同様の抗体、工程を使用し一部改変を行い測定した。血漿同様に 0.1-1 $\mu\text{g/ml}$ の範囲でプロレニン標準品を連続希釈し直線性の高い標準曲線が得られた ($y = 102.45x - 1.1747$, $R^2 = 0.9954$, 図 5)。ヒト血清の 1:10、1:15、1:20、1:30、1:35 の希釈系列を作成し、各測定値を標準曲線にあてはめて求めた濃度も高い直線性を示し標準曲線と並行性を示した。ヒト血清プロレニン濃度の測定内および測定間変動係数はそれぞれ 2.85 % ($n=7$)、9.97 % ($n=5$)であった。

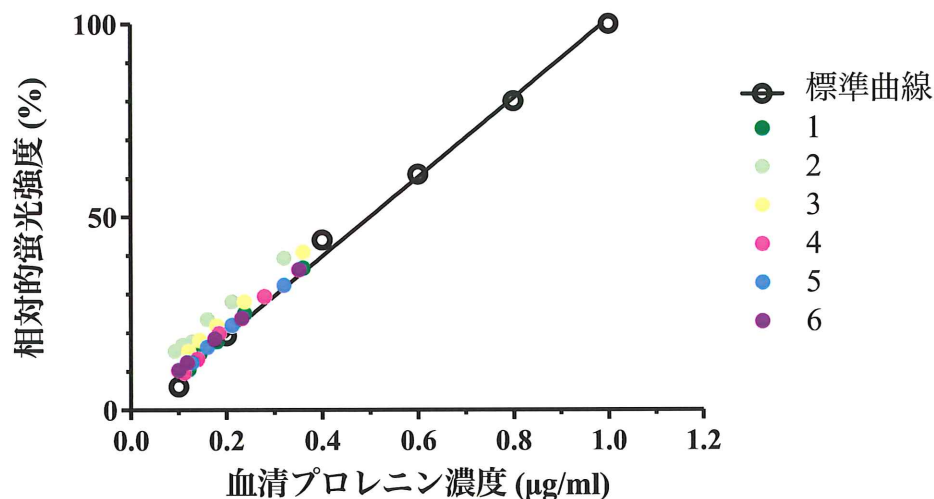


図5 血清プロレニン濃度の ELISA

各色丸 (1~6) は健常者 6 人の血清 1:10、1:15、1:20、1:30、1:35 希釈系列の各測定値をプロットした。白丸と直線はプロレニン標準品で作成した標準曲線を示す。

$$(y = 102.45x - 1.1747, R^2 = 0.9954)$$

3-4. 健常者の血中プロレニン濃度

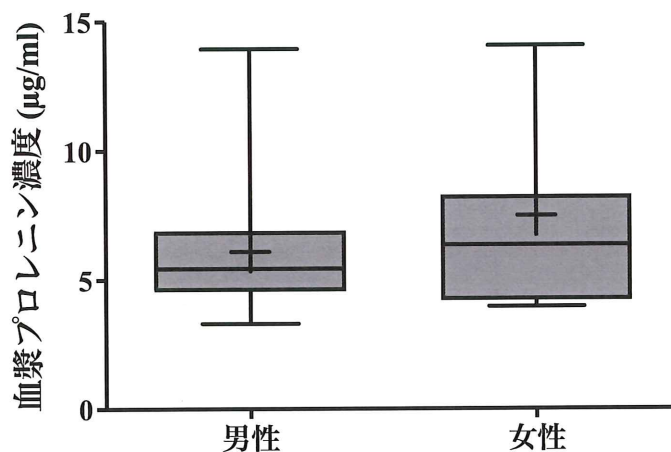
3-4-1. 血漿と血清プロレニン濃度

健常者 40 人の同時採取した血漿および血清を用いて、今回新たに確立した ELISA でプロレニン濃度を測定した。血漿プロレニン濃度は $6.6 \pm 2.9 \mu\text{g/ml}$ 、血清プロレニン濃度は $5.3 \pm 1.5 \mu\text{g/ml}$ であり、血清に比べ血漿プロレニン濃度が有意に高値であった ($p < 0.05$)。また、血漿プロレニン濃度と血清プロレニン濃度は有意な相関を認めた ($r = 0.6909$)。

3-4-2. 性別と血中プロレニン濃度

健常者 40 人 (男性 25 人、女性 15 人) の性別によるプロレニン濃度を比較した。今回確立した ELISA で測定した血漿プロレニン濃度は男性 $6.1 \pm 2.6 \mu\text{g/ml}$ 、女性 $7.9 \pm 3.3 \mu\text{g/ml}$ ($p = 0.1177$)、血清プロレニン濃度は男性 $4.8 \pm 1.0 \mu\text{g/ml}$ 、女性 $6.1 \pm 1.9 \mu\text{g/ml}$ ($p = 0.0028$) であった。血清においては女性で有意に高値の結果を示し、血漿においても女性で高値の傾向を認めた。(図 6)

(A)



(B)

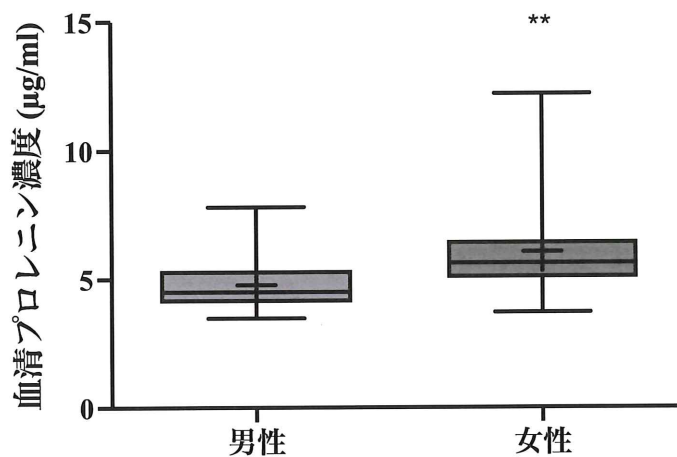


図6. 血漿 (A) および血清 (B) プロレニン濃度と性別

健康者 40 人 (男性 25 人、女性 15 人) の血漿および血清プロレニン濃度を ELISA で測定した。(A) 血漿プロレニン濃度、(B) 血清プロレニン濃度のそれぞれの男女比較を示した。

箱ひげ図の箱は四分位範囲、箱内を横断する横線は中央値を示す。ひげの上下端はそれぞれ最小値と最大値を示し、箱内の十字は平均値を表した。

3-4-3. 体位変換と血中プロレニン濃度

体位変換の影響を評価するため座位 15 分、臥位 30 分、立位 60 分後の各体位で健康者の血中プロレニン濃度を測定した。同時に測定した血漿レニン活性は典型的な生理的変動を認め、臥位と比較して座位で有意に上昇し、立位で著しく上昇したのに対し、血漿プロレニン濃度は各体位での有意な変化を認めなかった[6]。血清での比較でも同様に、6 人の健康者の体位変換の影響について検討を行ったが、血清プロレニン濃度の

平均値は、臥位 4.7 ± 2.3 $\mu\text{g/ml}$ 、立位 4.9 ± 2.2 $\mu\text{g/ml}$ で有意な変化は認めなかった ($p = 0.1138$ 、図 7)。

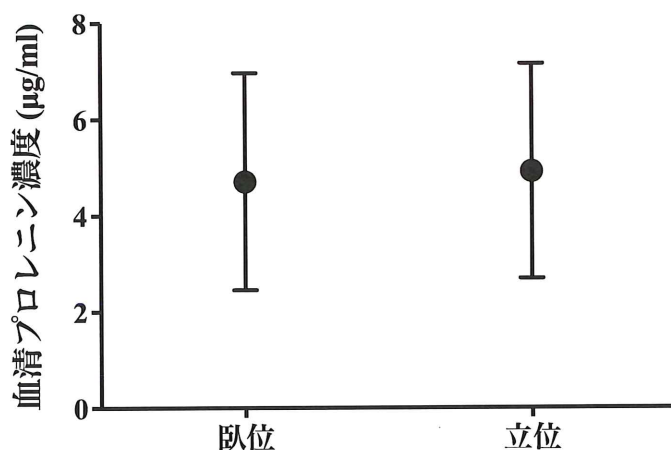


図 7. 体位変換と血清プロレニン濃度

健康者 6 人で臥位 30 分、立位 60 分後に採血を施行し、ELISA で血清プロレニン濃度を測定した。黒丸 (●) は 6 人の平均血清プロレニン濃度、エラーバーは SD を示す。

4. 考察

血中プロレニンの直接測定は長きにわたり測定することが困難でありプロレニン活性による評価やレニン濃度から間接的に算出したプロレニン濃度で評価を行ってきた[8]。臨床においては、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の評価には血漿レニン活性と血漿アルドステロン濃度が使用されている。近年、プロレニン ELISA キットが市販されているが血中プロレニン濃度は pg/ml レベルの極めて低濃度と報告されてきた[9]。しかし、今回新たに確立したプロレニンサンドイッチ ELISA では血中プロレニン濃度は $\mu\text{g/ml}$ レベルであり、市販の ELISA キットよりも千から一万倍高濃度を示していた。

本研究においては、新たに確立した ELISA に関して抗体の特異性を確認し、血中プロレニン分子存在型、ヒト血中プロレニン濃度について検討を行った。

今回用いたプロレニンプロセグメント 1-11 を認識するポリクローナル抗体 (pro1-11 抗体) の評価をおこなうため、プロレニン標準品と血漿を同抗体で免疫沈降し SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングを行った。プロレニン標準品と血漿で同じ分子量を示すバンドが検出され、pro1-11 抗体はプロレニン全長を特異的に捕捉し認識すると考えられた。この pro1-11 抗体を固相抗体として使用し、プロレニンプロセグメント 30-43 を認識するモノクローナル抗体 (pro30-43 抗体) を検出抗体として用い血漿[6]および血清プロレニンサンドイッチ ELISA を確立した。プロレニン標準品を用いて作成した標準曲線は高い直線性を示

し、血清サンプルの測定内および測定間変動係数は共に十分に低値であり安定した測定系であると考えられた。

次に血中プロレニン分子存在型の確認のため、pro30-43 抗体で血漿および血清の SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングを行った。血漿免疫反応性プロレニンは 3 つ、血清免疫反応性プロレニンは 2 つの主要な成分で構成されていた。血漿で検出された 3 種のバンドのうち、血清では高分子量バンドが消失しており、このバンドは血漿をアルブミン除去カラムで処理した際に消失することから、プロレニン断片がアルブミンと結合したものを示していると考えられた[6]。血清でこのバンドが消失したことは、血液が凝固する過程でアルブミンと結合していたプロレニン断片が外れる、もしくは凝固・血清分離の過程で血餅とともに除去された可能性が考えられた。また、血漿・血清のプロレニン全長を示すバンドは標準品よりわずかに高分子量であったが、N 型糖鎖を切断することにより分子量が低下した。このことから、血中プロレニンが糖鎖による翻訳後修飾を受けている可能性が考えられた[10]。しかし、N 型糖鎖の切断だけでは標準品と同一の分子量には至らなかった。今回の結果では、免疫沈降を行った血漿・血清のプロレニン全長バンドはプロレニン標準品と一致するレベルまで分子量の低下を示したことから、免疫沈降の過程で使用した DTT 処理によりプロレニン分子が還元されたものと考えられ[6]、血中プロレニンにおいてはジスルフィド結合による修飾が分子量増大に寄与していた可能性が最も高いと考えられた。

さらに N 型糖鎖による翻訳後修飾が ELISA へ与える影響についても検討を行った。市販レニン/プロレニン ELISA キットを使用し N 型糖鎖切断酵素で処理した血漿と、酵素処理していない血漿を測定すると、N 型糖鎖を切断した血漿の方がレニン+プロレニン濃度が高値であった。このことは、翻訳後修飾で結合していた糖鎖が免疫反応を阻害していた可能性を示唆しているが、その影響はわずかであった。

このように、血液中のプロレニン分子は様々な翻訳後修飾を受けており、市販の合成プロレニン標準品とは異なる分子型で血中に存在している可能性が高いと考えられる。市販の ELISA キットで測定した血中プロレニン濃度が低値となる理由としては、合成プロレニン標準品を用いて作成された抗体を使用した場合、様々な翻訳後修飾の影響を受けている血中プロレニン分子を認識することができなかったと考えられる。今回確立した ELISA はプロレニンのプロセグメント領域の N 末端 1-11 アミノ酸配列を特異的に認識することができる抗体を使用しており、翻訳後修飾の影響による阻害を受けず、プロレニン全長を確実に捕捉できるようになったことで、従来の ELISA 法より血中プロレニン濃度が確実に測定できるようになったと考えられる。

新たに確立したプロレニンサンドイッチ ELISA で、健常者 40 人の血漿および血清プロレニン濃度を測定した。女性の血清プロレニン濃度は男性に比較して有意に高値を示した。血漿プロレニン濃度も女性で高値の傾向を認めている。健常者は 21 歳～72 歳で、女性の月経周期を有する年齢層の対象者が含まれている。月経周期のある女性においては、血漿プロレニン活性は黄体期に上昇し、黄体形成ホルモン、エストラジオール、プロゲステロンの変化と血漿プロレニン活性が関連することが報告されており[11]、今回の結果で血中プ

ロレニン濃度が女性で高い傾向を示すことはプロレニン産生・分泌が増大することにより血漿プロレニン活性が上昇するのではないかと推測された。

同一の対象者の血漿プロレニン濃度と血清プロレニン濃度は有意な相関を認め、血漿プロレニン濃度は血清プロレニン濃度に比較して、平均値で 1.2 倍高値であった。しかし、血漿プロレニン濃度と血清プロレニン濃度の比は一定ではなく、血清に比して大幅に血漿プロレニン濃度が高値となる対象者も見受けられた。ウェスタンブロッティングでも、血漿は 3 バンドを示すが血清では高分子量のバンド（アルブミンと結合しているプロレニン断片）が消失しており、血漿プロレニン濃度と血清プロレニン濃度では、臨床的な指標として示す意義が異なる可能性が考えられる。

体位変換による血中プロレニン濃度への影響に関する検討では、血漿および血清ともにプロレニン濃度は体位変換による変動を認めなかった。現状、臨床で使用されている血漿レニン活性は、体位による変動を伴うため安静臥位での採血実施が必要であるが、今回確立した ELISA を使用して測定した血中プロレニン濃度は極めて安定的な指標であり、安静臥位での採血を必要とせず、随時採血での評価が可能な簡便な指標となりえる。

安定的な指標である血中プロレニン濃度に関して臨床的有用性について臨床検体を用いさらに評価し病態の把握につながる指標となり得ることが望まれる。

5. 総括

ヒト血漿免疫反応性プロレニンは 3 つ、血清免疫反応性プロレニンは 2 つの主要な成分で構成されており、血清ではアルブミン結合プロレニン断片が存在しなかった。プロレニンプロセグメント領域を認識する 2 種類の抗体を使用し血漿および血清プロレニン濃度を測定するサンドイッチ ELISA の確立を行った。血漿プロレニン濃度は血清プロレニン濃度よりも高値であり、血清プロレニン濃度は男性よりも女性で高値であった。本手法は血中プロレニンを特異的に捉えることのできる抗体を使用し従来の ELISA よりも血中プロレニン濃度を正確に評価できる可能性がある。また、血中プロレニン濃度は体位変換の影響を受けず安定的な指標である。

6. 今後の課題

本研究では、健常者血液検体での検討を行っているが血中プロレニン濃度と臨床指標との関連性に関する評価は不十分である。血中プロレニン濃度が反映する病態や使用薬剤の影響を評価するために、患者を含む臨床血液検体の血中プロレニン濃度測定を行い、臨床的有用性を解明していくことを今後の課題とする。

7. 謝辞

本論文は著者が北里大学医療系研究科 内分泌代謝内科学 博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。多くの方にご支援をいただきました。北里大学医学部内分泌代謝内科学 七里 眞義 教授には、研究遂行にあたり日頃よりご指導を賜りました。深く感謝申し上げます。藤本 和実 先生には、多岐にわたるご指導とご助言を賜り、心から感謝申し上げます。内分泌代謝内科学 診療准教授 鎌田 裕二 先生には、貴重なご指導や助言を頂き、深く感謝申し上げます。内分泌代謝内科学教室 技術員 加藤 由起子様、内分泌代謝内科学および同研究室、理学部物理学科物性物理学教室の各位には研究遂行にあたり日頃よりご指導、ご支援いただき深く感謝申し上げます。

8. 参考文献

- [1] Lumbers ER. Activation of renin in human amniotic fluid by low pH. *Enzymologia*. 1971;40:329-36
- [2] Krop M, A H Jan Danser. Circulating versus tissue renin-angiotensin system: on the origin of (pro)renin. *Curr Hypertens Rep*. 2008;10:112-8
- [3] J Nussberger, M de Gasparo, L Juillerat, T T Guyenne, V Mooser, B Waeber, et al. Rapid measurement of total and active renin: plasma concentrations during acute and sustained converting enzyme inhibition with CGS 14824A. 1987;9:1353-66
- [4] J A Luetscher, F B Kraemer, D M Wilson, H C Schwartz, M Bryyer-Ash. Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications. *N Engl J Med*. 1985;312:1412-7
- [5] J Deinum, B Rønn, E Mathiesen, F H Derkx, W C J Hop, M A D H Schalekamp. Increase in serum prorenin precedes onset of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999;42:1006-10
- [6] Fujimoto K, Kawamura S, Bando S, Kamata Y, Kodera Y, Shichiri M. Circulating prorenin: Its molecular forms and plasma concentrations. *Hypertens Res*. 2021:in press
- [7] SH Crouch, LJ Ware, LF Gafane-Mat. Dietary sodium intake and its relationship to adiposity in young black and white adults: The African-PREDICT study. *J Clin Hypertens(Greenwich)*. 2018. DOI: 10.1111/jch.13329
- [8] A H Jan Danser, Frans H M Derkx, Maarten A D H Schalekamp, Hans-Werner Hense, Günter A J Riegger, Heribert Schunkert. Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans. *J Hypertens*. 1998;16:853-62
- [9] Krop M, van Gool JM, Day D, Hollenberg NK, Jan Danser AH. Evaluation of a direct prorenin assay making use of a monoclonal antibody directed against residues 32-39 of the prosegment. *J*

Hypertens. 2011;29:2138-46.

[10] L C Fritz, A E Arfsten, V J Dzau, S A Atlas, J D Baxter, J C Fiddes, J Shine, C L Cofer, P Kushner, P A Ponte. Characterization of human prorenin expressed in mammalian cells from cloned cDNA.

Proc Natl Acad Sci USA. 1986;83:4114-8

[11] J E Sealey, S A Atlas, N Glorioso, H Manapat, J H Laragh. Cyclical secretion of prorenin during the menstrual cycle: synchronization with luteinizing hormone and progesterone. Proc Natl Acad Sci USA. 1985;82:8705-9

9. 業績目録

- 1) Sayuki Kawamura, Kazumi Fujimoto, Yuji Kamata, Masayoshi Shichiri: Molecular components of human serum prorenin. The Kitasato Medical Journal. in press.
- 2) Kazumi Fujimoto, Sayuki Kawamura, Satoru Bandou, Yuji Kamata, Yoshio Koderu, Masayoshi Shichiri: Circulating prorenin: its molecular forms and plasma concentrations. Hypertension Research. in press.
- 3) Sonomi Yoshino, Kazumi Fujimoto, Tesshu Takada, Sayuki Kawamura, Junro Ogawa, Yuji Kamata, Yoshio Koderu, Masayoshi Shichiri: Molecular form and concentration of serum α 2-macroglobulin in diabetes. Scientific Reports. 9:12927,2019.
- 4) 藤井 里江、白川 理永、河合 沙友希、市川 雷師、高野 幸路、七里 眞義：
妊娠中期までビルダグリプチンを服用し分娩した糖尿病合併妊娠の1例。糖尿病と妊娠、
1:63-67,2019.
- 5) Akinori Hayashi, Koji Takano, Sayuki Kawai, Masayoshi Shichiri: SGLT2 inhibitors provide an effective therapeutic option for diabetes complicated with insulin antibodies. Endocrine Journal. 63:187-191,2016.
- 6) 桃園 明、市川 雷師、河合 沙友希、星山 綾子、井上 光子、鈴木 陽彦、正木 嗣人、
高井 久仁庸、山岸 貴洋、小川 惇郎、林 哲範、鎌田 裕二、高野 幸路、七里 眞義：
授乳による血糖低下をCGMで確認し得たCSII使用中1型糖尿病の2症例。糖尿病と妊娠、
1:66-71,2016.