

# プロテオーム解析による ネコ慢性腎臓病の新規診断マーカーの探索

Search for novel diagnostic markers of chronic kidney disease in cats using proteome analysis

清水百梨<sup>1)</sup> Momori SHIMIZU, 前田浩人<sup>2)</sup>, 小寺義男<sup>3)</sup>, 渡辺俊文<sup>4)</sup>, 曾川一幸<sup>1)</sup>

1) 麻布大学生命・環境科学部生化学研究室 2) 前田獣医科医院 3) 北里大学理学部物性物理学講座

4) DVMs どうぶつ医療センター横浜

**Keywords** | 血漿, シアル酸化糖タンパク質, Apolipoprotein A-IV

## ■ 要約

ネコの腎疾患は臨床現場において増加傾向にある。臨床現場において慢性腎臓病の病期分類は、国際腎臓病研究グループ (IRIS) の基準に従って血漿クレアチニンと対称性ジメチルアルギニン (SDMA) を基に分類しているのが現状である。血漿クレアチニンは性差、年齢、筋肉量など腎臓以外の因子が検査データに影響を与え、SDMAは糸球体濾過量が約40%以上失われてから数値が上昇することが知られている。今回我々は血漿糖蛋白質に注目し、慢性腎臓病の早期診断マーカーの探索を行いフコシル化 Apolipoprotein A-IVを見出した。

## ■ Abstract

Feline kidney disease is increasing in clinical practice. Staging of chronic kidney disease follows the criteria of the International Renal Interest Society (IRIS); i.e., based on plasma creatinine and symmetric dimethylarginine (SDMA). Plasma creatinine is affected by non-renal factors, including gender, age and muscle mass, whereas SDMA is known to increase after loss of >40% of glomerular filtration rate. In this study, we examined plasma glycoproteins as early diagnostic markers for chronic kidney disease and identified fucosylated apolipoprotein A-IV as such a marker.

日本獣医腎泌尿器学会誌, 15 (1): 17–21, 2024

## はじめに

ネコの腎疾患は臨床現場において増加傾向にあり、腎機能異常を早期の段階で評価できる検査方法によりの確に診断し、病態を把握することが重要である。臨床現場において慢性腎臓病の病期分類は、国際腎臓病研究グループ (IRIS) の基準に従って血漿クレアチニンと対称性ジメチルアルギニン (SDMA) を基に分類しているのが現状である [1]。血漿クレアチニンは性差、年齢、筋肉量など腎臓以外の因子が検査データに影響を与え、軽度腎機能低下では異常値を示さない、いわゆる blind area の存在が知られ、SDMAは糸球体

濾過量が約40%以上失われてから数値が上昇することが知られている [2]。

近年のプロテオミクス技術の進歩に伴い、バイオマーカーを発見、同定するための様々なアプローチが発展してきている。質量分析計は生体試料中のペプチドやタンパク質を解析するための有力なツールである。質量分析計を用いた血清・血漿プロテオーム解析により多数のマーカー候補が検出され、癌特異的な診断情報が得られる [3,4]。我々は、プロテオーム・ペプチドーム解析技術を用いて、新たなネコ慢性腎臓病の新規診断マーカーの探索を行ってきた [5-7]。

プロテオミクスによる疾患マーカー探索技術には

Table 1. プロテオーム解析において、健常ネコよりも慢性ネコ腎症で増加していたタンパクの一覧

No.	Accession	Protein Name	TMT									慢性腎症ネコ (Stage 1) / 健常ネコ
			健常ネコ			慢性腎障害ネコ (Stage 1)			慢性腎障害ネコ (Stage 2)			
			126	127	Average	128	129	Average	130	131	Average	
1	M3WMA9	Alpha-2-macroglobulin	0.168	0.144	0.156	0.222	0.208	0.215	0.215	0.224	0.220	1.38
2	M3W955	Apolipoprotein A-IV	0.136	0.105	0.120	0.394	0.341	0.368	0.382	0.369	0.376	2.75
3	M3WKP2	Clusterin	0.198	0.188	0.193	0.216	0.231	0.224	0.245	0.251	0.248	1.16
4	M3W7H5	Complement factor D	0.142	0.153	0.148	0.184	0.169	0.1765	0.188	0.192	0.190	1.20
5	P14450	Fibrinogen alpha chain (Fragment)	0.198	0.160	0.179	0.191	0.231	0.211	0.218	0.231	0.225	1.25
6	M3WB06	Fibronectin	0.155	0.168	0.162	0.185	0.194	0.190	0.202	0.198	0.200	1.17
7	E3UTY9	Haptoglobin	0.213	0.189	0.201	0.218	0.216	0.217	0.222	0.231	0.227	1.08
8	P07405	Hemoglobin subunit alpha	0.167	0.130	0.149	0.280	0.234	0.257	0.238	0.264	0.251	1.66
9	P49064	Serum albumin	0.178	0.131	0.155	0.251	0.218	0.234	0.234	0.214	0.224	1.37
10	Q28412	Vitamin K-dependent protein C (Fragment)	0.212	0.160	0.186	0.280	0.301	0.291	0.304	0.311	0.308	1.56

健常ネコ2頭、慢性腎臓病ネコ4頭 (Stage 1: 2頭、Stage 2: 2頭) の血漿検体は、SSAコートされたマグネットビーズで溶出、TMT標識し、トリプシン消化後、LC-MS/MS解析を行った。健常ネコに比べ慢性腎臓病ネコ (Stage 1) で10タンパク質が増加した。

レクチンによる糖タンパク質の抽出と Tandem Mass Tag (TMT) を組み合わせた手法が用いられている [8]。今回は健常ネコと慢性腎臓病ネコの血漿検体を用いて、レクチンとTMTを組み合わせたプロテオーム解析により、ネコ慢性腎臓病の新規診断マーカーの探索を行った。

## 材料および方法

### 対象

2020年9月11日から2021年8月31日の間に去勢目的で前田獣医科医院に入院したネコ56頭 (健常ネコ43頭、慢性腎臓病ネコ19頭 ((Stage 1: 13頭、Stage 2: 6頭); 0-19歳) を対象とした。

健常ネコと慢性腎臓病ネコの分類において、健常ネコは血漿生化学検査 (血漿クレアチニン及びSDMA) と超音波検査により臨床的に慢性腎臓病がないと診断されたネコであり、慢性腎臓病ネコは超音波検査およびIRISの基準に従って、血漿クレアチニンとSDMAを基に慢性腎臓病の病期分類を行った [9,10]。Stage 3及びStage 4の慢性腎臓病ネコは期間中に入院されず、血漿のプロテオーム解析及びELISA測定は行っていない。

頸静脈から採血後、3000 rpm、10分間遠心し、血漿を-80°Cに保管した。血漿はプロテオーム解析およびELISA測定時に解凍して使用した。

### プロテオーム解析

健常ネコ2頭、慢性腎臓病ネコ4頭 (Stage 1: 2頭、Stage 2: 2頭) の血漿検体は、任意に抽出した。血漿検体はLens culinaris (LCA) がコートされたマグネットビーズ (VECTOR LABORATORIES社) を用い、シアル酸糖タンパク質を抽出した。各サンプルを安定同位体標識試薬 Tandem Mass Tag (TMT; Thermo Fisher Scientific社) で標識した。トリプシン消化を行い、酵素消化したサンプルはLC-MS/MS測定を行い、データベースサーチによりタンパク質同定と比較定量を同時に行った。

### ELISA測定

ELISAプレートの作製において、一次抗体はanti-Apolipoprotein A-IV (Proteintech Group, Inc. China) を0.5 µg/wellでマイクロタイタープレート (Nunc社) に感作し、NOF102 (NOF CORPORATION, Japan) にてブロッキングを行った。Apolipoprotein A-IV測定時は二次抗体としてanti-Apolipoprotein A-IVを Peroxidase Labeling Kit-NH2 (同仁化学社) を用いてHRP標識し用いた。フコシル化Apolipoprotein A-IV測定時はレクチンとしてLCA-HRP (株式会社J-ケミカル) を用いた。

測定は血漿検体をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に

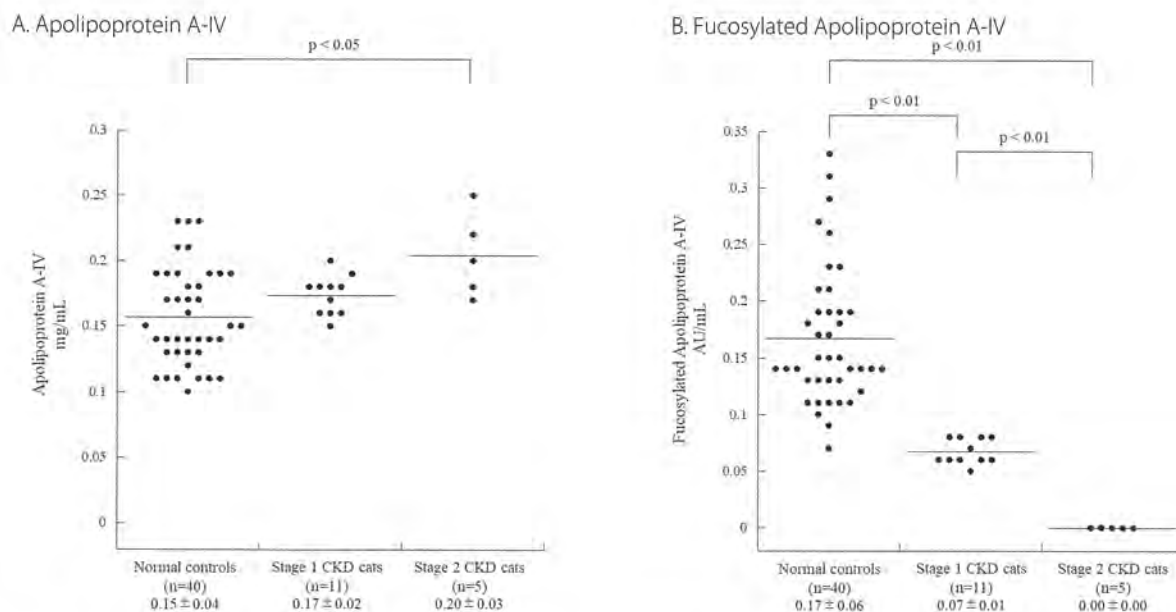


図1. 健常ネコと慢性腎臓病ネコのApolipoprotein A-IV値及びフコシル化Apolipoprotein A-IV値

A: 健常ネコと慢性ネコ腎症のApolipoprotein A-IV値

健常ネコで $0.15 \pm 0.04$  mg/ml、慢性腎臓病ネコ (Stage 1) で $0.17 \pm 0.02$  mg/mlでありSteel-Dwas testで有意な違いがみられなかった。一方、健常ネコで $0.15 \pm 0.04$  mg/ml、慢性腎臓病ネコ (Stage 2) で $0.20 \pm 0.03$  mg/mlであり $p < 0.01$  (Steel-Dwas test)と有意な違いがみられた。

B: 健常ネコと慢性ネコ腎症のフコシル化Apolipoprotein A-IV値

健常ネコ、慢性腎臓病ネコ (Stage 1) 及び慢性腎臓病ネコ (Stage 2) の3群間で、 $p < 0.01$  (Steel-Dwas test)と有意な違いがみられた。

て100倍に希釈した後、感作プレートに添加し、室温で1時間静置した。感作プレートをPBS-Tween bufferで3回洗浄後、二次抗体又はレクチンを添加し、室温で1時間静置した。さらに感作プレートをPBS-Tween bufferで3回洗浄後、TMB溶液 (Roche Diagnostics, Swiss) を添加し、10分間発色反応させ、反応停止液 (0.1 N 硫酸、富士フィルム株式会社) を添加した。吸光度はプレートリーダー (BioRad社) を用いて450 nmで測定を行った。

### Fucosyltransferase 8測定

Fucosyltransferase 8 (FUT8) 値は、FUT8 ELISA Kit (LifeSpan Biosciences, USA) を用い添付書に従って、健常ネコ10頭、慢性腎臓病ネコ (Stage 1) : 10頭の血漿を用いて測定した。2022年4月3日から2022年6月13日の間に去勢目的で前田獣医科医院に入院したネコ20頭 (健常ネコ10頭、慢性腎臓病ネコ10頭 (Stage 1) ; 0-6歳) を対象とした。Stage 2の慢性腎臓病ネコは期間中に入院されなかった。

### 統計解析

統計解析は全てSPSS version 19.0 statistical package

(SPSS社) を用いて行った。2標本検定はMann-Whitney U-test、3標本検定はSteel-Dwas testを用いて評価し $p < 0.05$ で有意差があると判断した。

### 結果

健常ネコ2頭、慢性腎臓病ネコ4頭 (Stage 1 : 2頭、Stage 2 : 2頭) の血漿検体は、10タンパク質を同定した (表1)。特に健常ネコと慢性腎臓病ネコ (Stage 1) の比率 (慢性腎臓病ネコ (Stage 1) / 健常ネコ) が2.0以上のものとしてはApolipoprotein A-IVが同定された。

Apolipoprotein A-IV値は、健常ネコ、慢性腎臓病ネコ (Stage 1) 及び慢性腎臓病ネコ (Stage 2) の血漿検体で、それぞれ $0.15 \pm 0.04$  mg/ml、 $0.17 \pm 0.02$  mg/ml、 $0.20 \pm 0.03$  mg/mlであり、健常ネコに対して慢性腎臓病ネコ (Stage 1) で有意な違いがみられなかった (図1A)。一方、フコシル化Apolipoprotein A-IV値は、健常ネコ、慢性腎臓病ネコ (Stage 1) 及び慢性腎臓病ネコ (Stage 2) の血漿検体で、それぞれ $0.17 \pm 0.06$  AU/ml、 $0.07 \pm 0.01$  AU/ml、 $0.00 \pm 0.00$  AU/mlであり、健常ネコに対して慢性腎臓病ネコ (Stage 1 及び Stage 2) で $p < 0.01$ と有意な違いがみられた (図1B)。

FUT8値は、健常ネコの血漿検体で $1688.7 \pm 654.1$

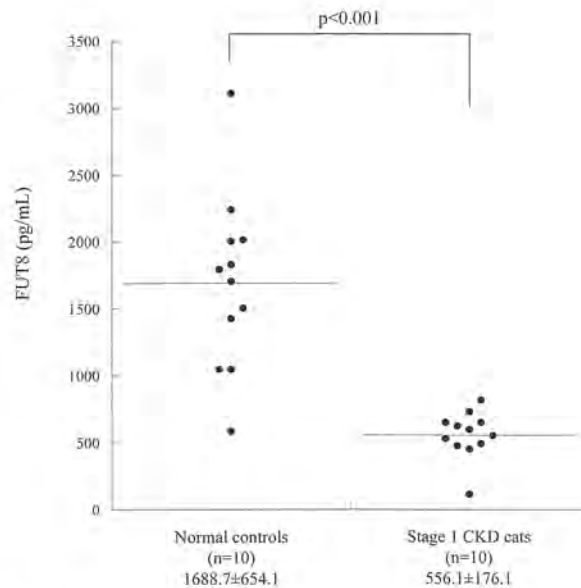


図2. 健常ネコと慢性腎臓症ネコ (Stage 1) の血漿 Fucosyltransferase 8 値

健常ネコで  $1688.7 \pm 654.1$  pg/ml、慢性腎臓症ネコ (Stage 1) で  $556.1 \pm 176.1$  pg/ml であり、 $p < 0.001$  (Mann-Whitney U-test) と有意な違いがみられた。

pg/ml、慢性腎臓病ネコ (Stage 1) の血漿検体で  $556.1 \pm 176.1$  pg/ml であり、健常ネコに対して慢性腎臓病ネコ (Stage 1) で  $p < 0.001$  と有意な違いがみられた (図2)。

## 考察

近年、プロテオミクス解析技術の発展により、次々に新しいバイオマーカーが発見されているが、実際の臨床診断に用いる段階までには至っていない [11]。バイオマーカーを発見する手順は、まず半定量的な方法でコントロール群と疾患群を比較解析してマーカー候補を選定する Discovery phase を経て、次々、それらの中から選定されたマーカーを Validation phase に移行させる。発見されたマーカーを ELISA 法にてバリデーションするのが理想的な手順である。

ヒトの血清検体を対象とした慢性腎臓病診断マーカーは、Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL)、Asymmetric dimethylarginine (ADMA)、Adiponectin、Apolipoprotein A-IV、Fibroblast growth factor 23 (FGF23)、A-type natriuretic peptide (ANP)、B-type natriuretic peptide (BNP) の7種類が報告されている [12]。健常ネコ2頭と慢性腎臓病ネコ (Stage 1) 2頭の血漿検体を使用し、TMT 標識技術を用いた比較解析を行った結果、Apolipoprotein A-IV を見出した。Apolipoprotein

A-IV はネコ慢性腎臓病との関係は報告されていない。

ヒトにおける Apolipoprotein A-IV は小腸及び非常に少量ではあるが肝臓によって合成される 46 kDa の血漿糖タンパク質である [12]。また、Apolipoprotein A-IV は小腸によって腸間膜リンパ液へ放出され、カイロミクロン、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (HDL) の構造タンパク質である [12]。

Apolipoprotein A-IV 値は、健常ネコで  $0.15 \pm 0.04$  mg/ml、慢性腎臓病ネコ (Stage 1) で  $0.17 \pm 0.02$  mg/ml であり有意な違いがみられなかったが、フコシル化 Apolipoprotein A-IV 値は、健常ネコで  $0.17 \pm 0.06$  AU/ml、慢性腎臓病ネコ (Stage 1) で  $0.07 \pm 0.01$  AU/ml であり  $p < 0.01$  と有意な違いがみられた。慢性腎臓病ネコ (Stage 1) の早期診断に有効であることが示唆された。フコシル化は、癌や炎症に最も関係の深い糖鎖修飾の1つである。ヒト肝臓癌の腫瘍マーカーである  $\alpha$ フェトプロテイン (AFP) は、肝硬変でも上昇するが、AFP の糖鎖にフコースが結合した AFP-L3 はきわめて特異性の高い肝臓癌のバイオマーカーである [13]。AFP-L3 は、 $\alpha 1-6$  フコース転移酵素である Fut8 の作用により、N 型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンに  $\alpha 1-6$  結合でフコースが付いた糖蛋白である [14]。本研究で見出したフコシル化 Apolipoprotein A-IV は、健常ネコに比べて慢性腎臓病ネコ (Stage 1) で低値をした。血漿中の FUT8 値

は、健常ネコで $1688.7 \pm 654.1$  pg/ml、慢性腎臓病ネコ (Stage 1) で $556.1 \pm 176.1$  pg/mlであり、慢性腎臓病ネコ (Stage 1) で低値であった。Liらは腎虚血再灌流障害マウスモデルにおいて、FUT8のRNA及びタンパク質レベルが炎症期 (2日目) 急激に増加し、炎症回復期 (7日目) で減少し、線維化期 (30日目) で再び増加する一貫した変化特性が確認され、急性・慢性腎臓病発症後の顕著かつ進行性の増加を報告された [15]。本研究では腎組織中と血漿中のFUT8値に解離が生じた。FUT8値測定に使用した検体は、慢性腎臓病ネコ (Stage 1) 症例であり、炎症回復期に相当するのでFUT8のタンパク質レベルが減少したこと

が考えられる。

糖鎖の生合成は小胞体から始まり、ゴルジ体を通る過程において成熟するが、フコシル化はゴルジ体で起こる。フコシル化は、FUT8とGDP-フコースで制御されている。様々な生体反応や疾患でみられるフコシル化の変化には、FUT8の発現の変化だけでなく、GDP-フコースの量的変化も重要であることが報告されている [16]。今後は、慢性腎臓病ネコ (Stage1~4) の血清を用いてFUT8及びフコシル化Apolipoprotein A-IVについての評価、腎生検材料を用いて病理組織化学的にFUT8、GDP-フコース及びフコシル化Apolipoprotein A-IVについての評価を検討している。

#### 参考文献

1. International Renal Interest Society (IRIS) (2021): IRIS Staging of CKD (modified 2019). [www.iris-kidney.com/pdf/IRIS\\_Staging\\_of\\_CKD\\_modified\\_2019.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf).
2. Relford R., Robertson J., Clements C. (2016): Symmetric Dimethylarginine: Improving the Diagnosis and Staging of Chronic Kidney Disease in Small Animals. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.*, 46, 941-960.
3. Hortin G.L. (2006): The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin. Chem.*, 52, 1223-1237.
4. Petricoin E.F., Belluco C., Araujo R.P., Liotta L.A. (2006) The blood peptidome: a higher dimension of information content for cancer biomarker discovery. *Nat. Rev. Cancer.*, 6, 961-967.
5. 前田浩人, 阿部沙織, 堀江和香, 望月俊介, 渡辺俊文, 曾川一幸, 佐藤守, 野村文夫 (2015): 猫慢性腎不全尿を用いた早期診断マーカーの探索. *北海道獣医師会雑誌.*, 59., 397.
6. 前田浩人, 小林加奈, 三品美夏, 渡辺俊文, 曾川一幸 (2019): サンドイッチELISA法を用いた Carboxylesterase 5A fragment測定系の構築と評価. *日本獣医腎臓器学会誌.*, 11., 14-18.
7. Maeda H, Igarashi K, Ishidoya M, Satoh M, Watanabe T, Nomura F, Sogawa K (2022): Urinary kidney injury molecule-1 as early diagnostic marker of chronic kidney disease in cats. *Medical. Mass. Spectrometry.*, 6., 36-44.
8. Sogawa K, Takano S, Iida F, Satoh M, Tsuchida S, Kawashima Y, Yoshitomi H, Sanda A, Koderu Y, Takizawa H, Mikata R, Ohtsuka M, Shimizu H, Miyazaki M, Yokosuka O, Nomura F (2016): Identification of a novel serum biomarker for pancreatic cancer, C4b-binding protein  $\alpha$ -chain (C4BPA) by quantitative proteomic analysis using tandem mass tags. *Br. J. Cancer.*, 115., 949-956.
9. Board NKFDOQIA (2002) Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification IV; Definition and classification of stages of chronic renal failure. *Am. J. Kidney. Dis.* 39., S46-S75.
10. Debruyne K, Haers H, Combes H, Paeppe D, Peremans K, Vanderperren K, Saunders JH (2012) Ultrasonography of the feline kidney: Technique, anatomy and changes associated with disease. *J. Feline. Med. Surg.*, 14., 794-803.
11. Sogawa K, Yamanaka S, Takano S, Sasaki K, Miyahara Y, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Takizawa H, Nomura F, Ohtsuka M (2021) Fucosylated C4b-binding protein  $\alpha$ -chain, a novel serum biomarker that predicts lymph node metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol. Lett.*, 21., 127-135.
12. Devarajan P (2010): The use of targeted biomarkers for chronic kidney disease. *Adv. Chronic. Kidney. Dis.*, 17., 469-479.
13. Taketa K (1990) : Alpha-fetoprotein: reevaluation in hepatology. *Hepatology.*, 12., 1420-1432.
14. 三善英知, 高松真二, 魚住尚史, 鎌田佳宏 (2017): フコシル化タンパク質を標的にした新規がん診断・治療薬の開発. *実験医学.*, 35., 1447-1452.
15. Li Z, Hao J, Li L, Shen N, Wang D, Wang N, Wen X, Wang W, Qin B, Tang Q, Guo X, Song H, Du X, Yang F, Lin H (2023): Loss of FUT8 in renal tubules ameliorates ischemia-reperfusion injury-induced renal interstitial inflammation transition to fibrosis via the TLR3-NF- $\kappa$ B pathway. *FASEB. J.*, 37., e23091-e23101.
16. Terao N, Takamatsu S, Minehira T, Sobajima T, Nakayama K, Kamada Y, Miyoshi E (2015): Fucosylation is a common glycosylation type in pancreatic cancer stem cell-like phenotypes. *World. J. Gastroenterol.*, 21., 3876-3887.