

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10147

研究課題名（和文）尿中ポウマン囊上皮細胞mRNAによる糸球体腎炎の非侵襲的バイオマーカーの確立

研究課題名（英文）Establishment of non-invasive urinary biomarker of glomerulonephritis by urinary parietal epithelial cell mRNA

研究代表者

此元 隆雄（konomoto, takao）

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：80315366

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：非侵襲的に増殖性糸球体腎炎の組織学的重症度を簡便に評価できるバイオマーカーの確立は重要である。ラット半月体形成性腎炎を用いてポウマン囊上皮細胞の活性化マーカーであるCD44について解析したところ、尿中CD44 mRNAの発現は蛋白尿の増加とともに亢進し、半月体が形成される時期に発現のピークが認められた。尿中CD44 mRNAは非侵襲的に糸球体腎炎の組織障害度を反映する尿中バイオマーカーとしての可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸球体腎炎の予後や治療は、腎生検による腎組織の重症度によって決定されることが多い。腎生検は入院を要する侵襲度の高い検査であり安易に行うことは難しい。ポウマン囊上皮細胞の活性化マーカーであるCD44について、尿中CD44 mRNAの発現を解析したところ、蛋白尿や組織重症度との相関が認められた。尿中CD44 mRNAは尿検体から測定することが可能であるため非侵襲的で、いつでも簡便に複数回測定することが可能である。治療の経過中に測定すれば、病勢の評価、治療方針の決定などに役立てることが可能となり、患者の病状に合わせた治療を計画することができる。

研究成果の概要（英文）：It is important to establish a biomarker that can noninvasively evaluate the histological severity of proliferative glomerulonephritis. CD44 is an activation marker of parietal epithelial cell. We analyzed urinary CD44 mRNA expression in rat crescentic nephritis using real time PCR. Urinary CD44 mRNA expression was correlated in proteinuria and crescents formations. was observed. Urinary CD44 mRNA was considered to be a potential urinary biomarker that noninvasively reflects the degree of tissue damage in glomerulonephritis.

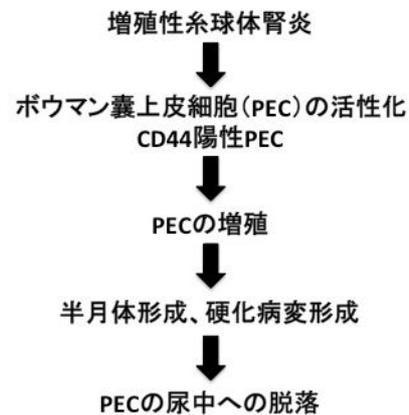
研究分野：小児腎臓学

キーワード：尿中バイオマーカー 尿中RNA ポウマン囊上皮細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小児の代表的な慢性糸球体腎炎として、IgA 腎症や二次性腎炎の紫斑病性腎炎が挙げられる。これらの増殖性糸球体腎炎の予後や治療は、腎機能障害の有無や蛋白尿の程度などの臨床的重症度に加え、腎組織における半月体形成率などの組織学的重症度によって決定される。しかし、現在、組織学的重症度を簡便に評価できるバイオマーカーは存在せず、侵襲性を伴う腎生検での評価を行わざるを得ない。近年、新たな腎疾患のバイオマーカーとして尿中ポドサイト数や尿中ポドサイト関連 mRNA が注目されている。ポドサイト傷害の持続に伴うポドサイト脱落によって糸球体硬化が誘導され、その結果として末期腎不全に至るとする Podocyte depletion 仮説 (Wiggins RC. *Kidney Int.* 71:2007) に基づくものであり、硬化病変を主体とする糸球体障害や臨床的重症度、予後と相関することが報告されている。しかし、IgA 腎症などの増殖性腎炎における硬化病変は比較的障害の進んだ状態であり回復不可能な終末像と考えられ、より早期に組織障害の重症度を評価するためには尿中ポドサイトの評価では不十分である可能性がある。一方で、尿中ポドサイト数や尿中ポドサイト関連 mRNA は新たなバイオマーカーの発見であるとともに、糸球体固有細胞は疾患によって尿中へ脱落するため、尿中から細胞や mRNA の採取が可能でありバイオマーカーとして活用できる可能性があることを示している。Smeets らは、糸球体腎炎において半月体形成や硬化病変形成にボウマン囊上皮細胞 (parietal epithelial cell; PEC) の活性化が重要な役割を果たしていると報告した (Smeets *et. al.* *J Am Soc Nephrol* 22:2011, *J Am Soc Nephrol* 20:2009)。巣状分節性糸球体硬化症における硬化病変部位において CD44 陽性 PEC が発現していることや、半月体形成性腎炎モデルにおいても半月体部に一致して CD44 陽性 PEC の発現を認め、これらの病変形成には PEC 活性化が重要であることを腎組織の評価によって明らかにした。しかし、これらの検討は腎組織での CD44 などの活性化マーカーの免疫染色で PEC の活性化を解析したものであり、臨床応用には腎生検が必要である。今回の研究では、ポドサイトと同様に尿中へ脱落した PEC に注目し、その活性化状態を尿中 PEC mRNA の発現プロファイルを解析することによって評価し、非侵襲的なバイオマーカーの確立を目指すものであり、これまで同様の着眼点からの報告はない (図1)。



尿中活性化PEC mRNA(CD44)発現亢進  
▶糸球体腎炎の非侵襲的バイオマーカー

図1 尿中活性化ボウマン囊上皮細胞(PEC) mRNA  
尿中活性化PEC mRNAを解析することにより、非侵襲的に糸球体腎炎の組織学的重症度が評価可能となる。

### 2. 研究の目的

すでに新規尿中バイオマーカーの探索をおこなっている福田顕弘ら (当大学内科学循環体液制御学分野) は、特異的ポドサイト障害ラット (human diphtheria toxin transgenic rat) (Kidney Int. 81:2012) や IgA 腎症 (Nephrol Dial Transplant. 30:2015) の尿中ポドサイト mRNA が、糸球体硬化病変、疾患活動性と相関することを報告している。ポドサイト以外の糸球体固有細胞、とくにボウマン囊上皮細胞が増殖性腎炎の半月体形成過程において、「PEC の活性化とともに活性化 PEC が尿中に脱落し、尿中の活性化 PEC mRNA の発現が亢進する」と仮定し著名な半月体形成を特徴とする抗糸球体基底膜抗体で惹起したラット半月体形成性腎炎を用いて、PEC の活性化マーカーである CD44 について検討を行う。

### 3. 研究の方法

抗糸球体基底膜抗体で惹起したラット半月体形成性腎炎を用いて、尿中活性化 PEC mRNA プロファイルと蛋白尿や腎機能などの臨床的重症度および半月体形成率や硬化病変の程度などの組織学的重症度との相関について経時的に解析する。抗ラット糸球体基底膜抗体をラットに静脈投与し、半月体形成性腎炎を惹起する。以下の検討のために、経時的に尿サンプルを採取し、尿より RNA を抽出する。得られた RNA より逆転写反応によって cDNA を作成し尿中 mRNA の発現をリアルタイム PCR によって解析する。尿サンプルと同時に、蛋白尿定量、腎機能評価を行い、腎臓組織を採取し、CD44 mRNA の発現との相関を検討する。1) 尿中活性化 PEC mRNA プロファイル: 尿 cDNA よりリアルタイム PCR を行い、CD44 を含む尿中 mRNA (PAX2, PGP9.5, AQP2) について検討し、PEC の活性化状態を明らかにする。2) 臨床的重症度と尿中活性化 PEC mRNA の相関ラット半月体形成性腎炎において、尿中 CD44 mRNA やその他の尿中活性化 PEC mRNA 発現と a) 蛋白尿の出現時期やその程度、b) 腎機能障害の出現時期やその程度などの臨床的重症度との相関を明らかにする。

### 4. 研究成果

1) ラット半月体形成腎炎における尿中 CD44 mRNA (図 1)

発現ラットに抗 GBM 抗体を投与し半月体形成腎炎を惹起し、day0~day28 まで経時的に尿サンプルを採取。採取された尿より ZR Urine RNA Isolation kit を用いて RNA を抽出し、SuperScript VIL0 cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA を作成。CD44 TaqMan Gene expression Assay にて real time PCR を行った。

CD44 mRNA は、蛋白尿が出現する day3 より発現が亢進し、半月体形成を認める day10 に発現のピークを認めた。

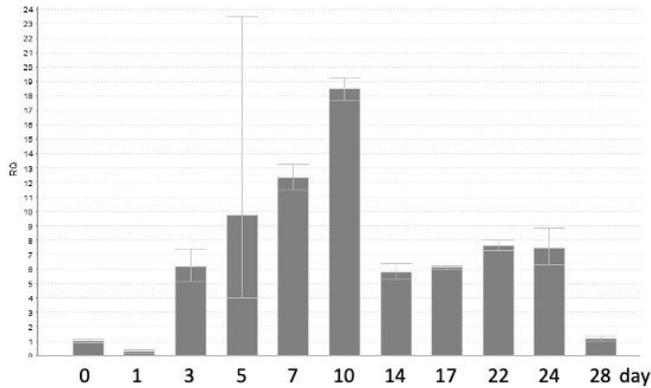


図1 尿中CD44 mRNA発現

2) PEC 関連 mRNA 発現 (図 2)

1) と同様に PEC に特異的に発現する PAX2 および PGP9.5 について real time PCR を行った。CD44 mRNA とは異なり、蛋白尿増加時や半月体形成時期には PAX2、PGP9.5 とともに発現が減少していた。

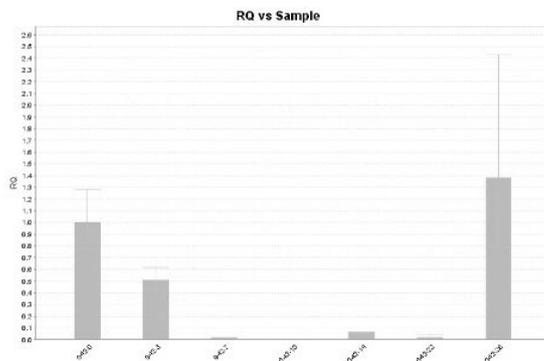


図2-1 尿中PAX2 mRNA発現

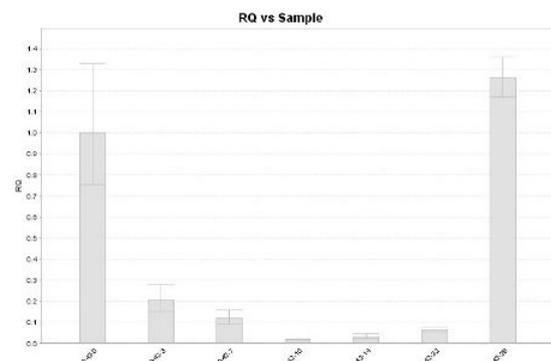


図2-2 尿中PGP9.5 mRNA発現

このことから、PEC に恒常的に発現している PAX2、PGP9.5 は、半月体形成性腎炎において腎障害時には発現が減少し、PEC 活性化マーカーである CD44 mRNA が活性化していることが示唆される。

3) CD44 mRNA と PAX2、PGP9.5、AQP2 mRNA 発現との比較 (図 3)

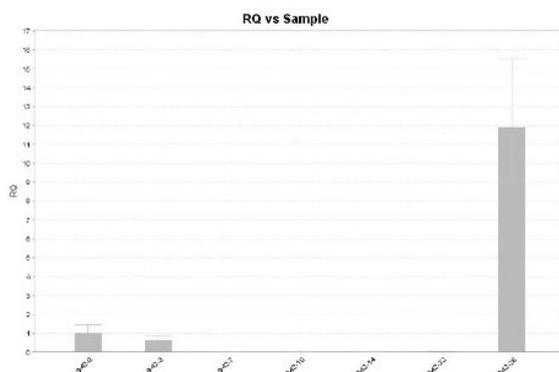


図3-1 尿中AQP2 mRNA発現

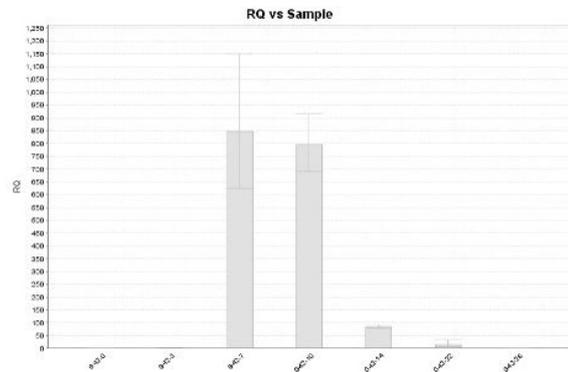


図3-2 尿中CD44/PAX2 mRNA発現比

CD44 mRNA と PAX2, PGP9.5, AQP2 mRNA 発現について、経時的に比較検討した。AQP2 に対して最も発現比が大きかった。また、蛋白尿や組織学的に増悪する day7 より発現比が増加しており、CD44/AQP2 比は臨床的増悪に相関していると考えられ、非侵襲的マーカーになりうる可能性が示唆された。

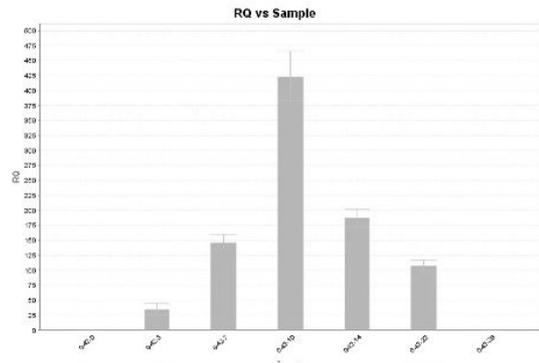


図3-3 尿中CD44/PGP9.5 mRNA発現比

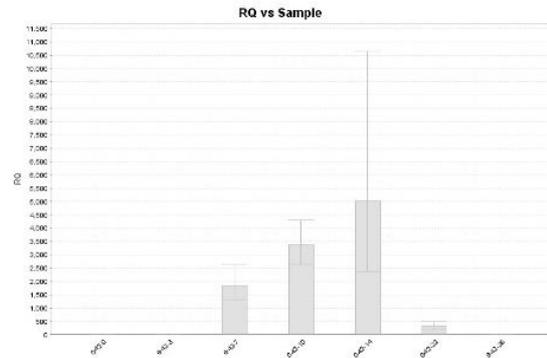


図3-4 尿中CD44/AQP2 mRNA発現比

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----