

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15986

研究課題名(和文) ヒト糸球体疾患における治療可能な傷害ポドサイトの検出

研究課題名(英文) To detect the early podocyte injury in human glomerulopathies

研究代表者

岡部 匡裕 (Okabe, Masahiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：70595272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト糸球体疾患において、ポドサイトのEGR-1発現は尿蛋白量ならびに尿中ネフリンおよびポドシンmRNA量と正相関し、糸球体ポドシン染色と逆相関し、マウスと同様ヒトにおいてもポドサイト傷害との関連が示唆された。組織所見では急性病変と関連しており、特に急性の傷害を反映していると考えられた。同コホートのIgA腎症のサブグループ解析でも同様の結果であり、また別コホートのループス腎炎の解析でも、やはりポドサイトEGR1と腎炎の活動性が関連しており、ポドサイト傷害が疾患活動性に関連するという過去の報告に一致していた。したがって、ポドサイトEGR-1発現がポドサイト傷害の染色マーカーとして有用と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトにおけるポドサイト傷害の染色マーカーは確立したものがなかったが、EGR-1がポドサイト傷害マーカーとして有用となるかもしれない。これにより、糸球体疾患でのポドサイト傷害の程度を可視化可能となる。また、ポドサイトのEGR-1発現率の違いにより、予後や治療反応性を予測し、免疫抑制剤の使用方法を変更するなど、オーダーメイド治療につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In human glomerular diseases, EGR-1 expression in podocytes was positively correlated with urinary protein level and urinary nephrin and podocin mRNA levels, and inversely correlated with glomerular podocin staining, suggesting that podocyte EGR-1 expression is associated with podocyte injury in humans as in mice. Also, EGR-1 expression in podocytes was positively correlated with acute lesions in histopathological findings, suggesting that EGR-1 expression reflects particularly acute injury. A subgroup analysis of IgA nephropathy in the same cohort showed similar results, and another analysis of lupus nephritis in a different cohort also showed an association between podocyte EGR1 expression and activity of the disease, consistent with previous reports. Therefore, podocyte EGR-1 expression may be a useful staining marker for podocyte injury.

研究分野：腎臓

キーワード：ポドサイト ポドサイト傷害 糸球体疾患 EGR-1 慢性腎臓病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦では治療介入の必要な慢性腎臓病患者はおよそ 1,330 万人と推測されており、これは本邦の成人人口の約 13%にあたる。慢性腎臓病の進行を完全に抑制することは困難であり、末期腎不全に至り透析導入となる患者は年間 35,000 人を超えており、かつ未だ増加傾向にある。慢性腎臓病の多くは糸球体疾患に因るが、その原因が何であれ、糸球体疾患が進行するとポドサイト傷害が生じ、ポドサイトが脱落していく。ポドサイトは生体内ではほぼ増殖することができないため、糸球体のポドサイト数が減少すると糸球体が不可逆的に硬化し、糸球体機能が廃絶する。残存糸球体へより負荷がかかることとなり、残存糸球体においてポドサイト傷害が助長され、さらに糸球体硬化が進んでいく悪循環に陥る。したがって、ポドサイトを守ることが、糸球体保護、さらには慢性腎臓病の進行抑制につながる事となる。

慢性腎臓病の評価として eGFR、蛋白尿や腎組織における糸球体硬化が用いられるが、いずれもポドサイト傷害・脱落後の結果をみている。ポドサイトを保護するためには「不可逆的ポドサイト傷害になり得るポドサイトを早期に検出する手段」が望まれる。

研究代表者はマウスからの正常あるいは傷害ポドサイトの特異的 mRNA の取得ならびにマイクロアレイおよび RT-PCR による解析に成功し、尿蛋白が顕著に増加する前の傷害早期から転写因子である MAF BZIP Transcription Factor F (MAFF) および early growth response protein 1 (EGR-1) が発現上昇することを見出した。正常ポドサイトではこれらは発現していない。生体内で MAFF あるいは EGR-1 が発現上昇したポドサイトは傷害を受け始めており、今後不可逆的ポドサイト傷害に陥ると考えられる。MAFF あるいは EGR-1 が陽性となっている早い段階で傷害ポドサイトを発見し治療できれば、ポドサイト保護、さらには腎臓病進展予防につながる可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では主としてヒトの腎生検検体を用い、各糸球体疾患患者のポドサイトで MAFF および EGR-1 が発現上昇しているか、またこの発現程度が組織パラメータ、臨床パラメータ、あるいはポドサイト脱落量と関連するか、解明することを目的とした。

3. 研究の方法

[1] ヒト腎組織における、MAFF および EGR-1 の染色条件の最適化

ポドサイト特異的傷害可能かつポドサイト特異的 mRNA 取得可能なマウスモデルを各種 EGR-1 抗体ならびに MAFF 抗体を使用し、EGR-1 および MAFF の染色条件をヒト組織において調整した。

[2] 糸球体疾患におけるポドサイト EGR-1 染色陽性率と臨床組織的関連

ヒト糸球体疾患においては、ポドサイト傷害の染色マーカーとして確立したものはない。ポドサイト傷害の指標として、現在確立しているものとしては、尿蛋白量や尿中ネフリンおよびポドシン mRNA 定量などがあり、各糸球体疾患の活動性との関連が報告されている。ポドサイト EGR-1 染色陽性率がこれらのポドサイト傷害マーカーと相関するか検証した。また、腎機能や各種組織パラメータとの関連も検証した。

前向きコホートとして、2018 年 6 月 20 日より 2020 年 3 月 31 日の間に東京慈恵会医科大学附属病院で腎生検を施行され、本研究に同意した症例を対象とし、20 歳未満、糸球体数 8 未満、尿細管間質疾患、腎移植ならびにデータ欠損の症例を除外した。尿中ネフリンならびにポドシン mRNA は、腎生検入院時の早朝尿より RNA を抽出し、qRT-PCR 法で測定した。ポドサイトの組織マーカーとしてはポドシン染色と用い、糸球体ポドシンスコア(糸球体を 4 分割し、各エリアにおいて染色性全消失 0 点、部分的な消失 1 点、正常 2 点でスコアリングし、それを合計したもので、0-8 点)を計測した。また臨床情報・血液データ・尿データはカルテより抽出した。

[3] 各糸球体疾患間におけるポドサイト EGR-1 染色陽性率の比較

いずれの糸球体疾患も病期が進むとポドサイト傷害を呈するが、その程度は糸球体疾患によって異なる可能性が高い。上記前向きコホートにおいて、糸球体疾患別に EGR-1 染色陽性率を比較した。

[4] IgA 腎症およびループス腎炎症例における、ポドサイト EGR-1 染色陽性と臨床組織的関連

同一糸球体疾患であっても、その病期・病勢により、ポドサイト EGR-1 染色陽性率が変化する可能性が高い。慢性糸球体腎炎である IgA 腎症ならびに、比較的急性な腎炎を呈するループス腎炎において、ポドサイト EGR-1 染色陽性と臨床組織的パラメータとの関連を検証した。IgA 腎症は上記前向きコホートに含まれた IgA 腎症症例を、ループス腎炎は後向きコホートとして

2001年から2016年に東京慈恵会医科大学附属病院で腎生検を施行されループス腎炎と診断された症例を対象として解析した。

4. 研究成果

[1] ヒト腎組織における，MAFF および EGR-1 の染色条件の最適化

EGR-1 染色においては，EGR-1 抗体 (15F7, Cell Signaling Technology 社) を用いた染色が良好であった。(図 1) 一方 MAFF は複数社の抗体で検証するも，ヒト組織での染色が不明瞭であり，以後 EGR-1 によるポドサイト傷害を検証していくこととした。

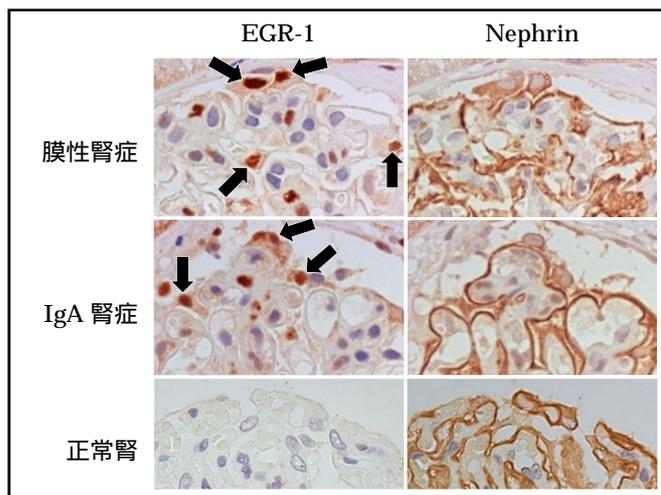


図 1. ヒト系球体疾患におけるポドサイトの EGR-1 発現

(Okabe M et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2019; 316: F241–F252. より引用，改変)

[2] 系球体疾患におけるポドサイト EGR-1 染色陽性率と尿蛋白ならびに尿中ポドサイトマーカーとの関連

系球体疾患症例 98 例において，EGR-1 陽性ポドサイト含有系球体率 (%EGR1) と，尿蛋白/クレアチニン比，尿中ネフリン mRNA/クレアチニン比，および尿中ポドシン mRNA/クレアチニン比に正の相関を認めた (各々 Rho=0.303, 0.378, 0.369; P=0.0024, <0.001, <0.001) (図 2)。

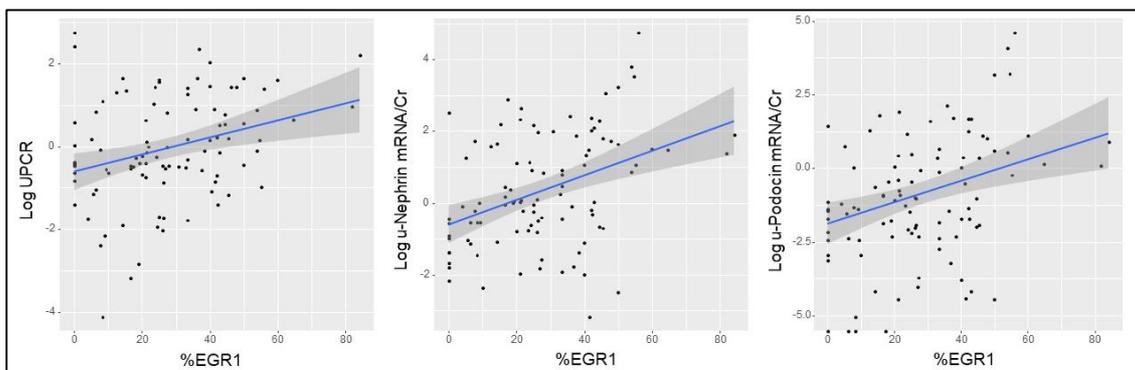


図 2. %EGR1 と尿蛋白，尿中ネフリン・ポドシン mRNA/クレアチニン比との相関

一方，eGFR とは相関を認めなかった (Rho=0.0277, P=0.768)。組織学的パラメータとしては，系球体ポドシンスコアと負の相関 (Rho=-0.286, P=0.0043) を認め，マウス同様ヒト系球体疾患でもポドサイトでの EGR1 発現がポドサイト傷害を表している可能性が示唆された。

また，半月体形成系球体率と正の相関 (Rho=0.425, P<0.001) を示す一方で，全節性硬化系球体率や尿細管間質障害度とは相関を認めず，特に急性の傷害を反映していると考えられた。

[3] 各系球体疾患間におけるポドサイト EGR-1 染色陽性率の比較

系球体腎炎である IgA 腎症，IgA 血管炎，ループス腎炎，ANCA 関連血管炎，MPGN で %EGR1 の上昇があったが，明らかな疾患別の差は認められなかった。ネフローゼ疾患では膜性腎症および一次性巣状分節性系球体硬化症で %EGR1 が高い一方，微小変化型ネフローゼ症候群では比較的低値を示した (図 3)。ポドサイト傷害の質の違いを表している可能性があり，しばしば困難である一次性巣状分節性系球体硬化症と微小変化型ネフローゼ症候群の鑑別に使用できるかもしれない。今後検討していく予定である。

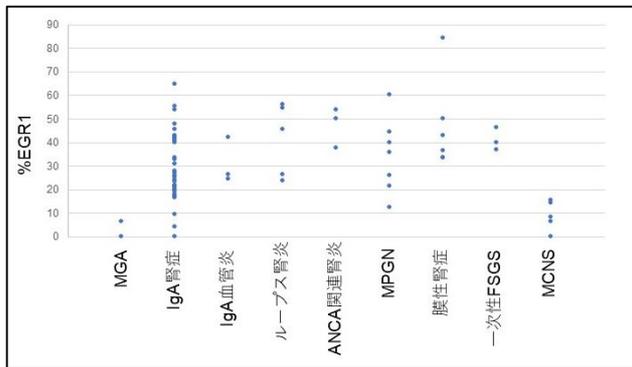


図 3. 各系球体疾患別の%EGR1
MGA, 系球体微小変化; MPGN, メサンギウム増殖性系球体腎炎; FSGS, 巣状分節性系球体硬化症; MCNS, 微小変化型ネフローゼ症候群

[4] IgA 腎症およびループス腎炎症例における，ポドサイト EGR-1 染色陽性と臨床組織的関連

IgA 腎症 35 例の解析では，%EGR-1 は尿蛋白/クレアチニン比，尿中尿中ポドシン mRNA/クレアチニン比と相関を認めた (各々 $Rho=0.413, 0.378$; $P=0.00137, 0.0253$) が，腎機能とは相関しなかった．MEST-C 分類では C 病変で C1 の方が C0 と比して %EGR-1 が有意に高かったが ($P<0.01$)，M, E, S, T 病変に有意差は認めなかった．また %EGR1 と細胞性/線維性半月体系球体率に相関を認めた ($Rho=0.502, P=0.0211$) が，全節性硬化系球体率や尿細管間質障害度とは相関を認めなかった．有意差は認めなかったものの，管内細胞増多を伴う系球体率と弱い相関性が示唆された ($Rho=0.303, P=0.0607$) ．

ループス腎炎 64 例の解析では，%EGR-1 は SLEDAI および尿蛋白量と正の相関を，eGFR とは逆相関を認めた (各々 $Rho=0.461, 0.519, -0.379$; $P<0.001, <0.0001, <0.00202$) が，血球や補体とは関連を認めなかった．組織では，IV 型で %EGR-1 は他の組織型より高値を示し ($P<0.0001$)，%EGR-1 は細胞性/線維細胞性半月体形成系球体率と相関を認めた ($Rho=0.545, P<0.0001$) 一方，全節性硬化系球体率や尿細管間質障害度とは相関を認めなかった．

IgA 腎症およびループス腎炎において，疾患活動性，特に急性病変とポドサイト EGR-1 発現が関連していた．これは IgA 腎症ならびにループス腎炎においてポドサイト傷害が疾患活動性ならびに急性病変と関連したという過去の報告に一致するものであり，ポドサイト EGR-1 発現がポドサイト傷害の染色マーカーとして有用と考えられる．(文献 1-4)

<引用文献>

1. Fukuda A, et al. Urine podocyte mRNAs mark disease activity in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30:1140–1150.
2. Asao R, et al. Relationships between levels of urinary podocalyxin, number of urinary podocytes, and histologic injury in adult patients with IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7:1385–1393.
3. dos Santos M, et al. Podocyte-associated mRNA profiles in kidney tissue and in urine of patients with active lupus nephritis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):4600–4613.
4. Rezende G.M., et al. Podocyte injury in pure membranous and proliferative lupus nephritis: Distinct underlying mechanisms of proteinuria? *Lupus*. 2014;23:255–262.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okabe Masahiro, Yamamoto Kazuyoshi, Miyazaki Yoichi, Motojima Masaru, Ohtsuka Masato, Pastan Ira, Yokoo Takashi, Matsusaka Taiji	4. 巻 320
2. 論文標題 Indirect podocyte injury manifested in a partial podocytectomy mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F922 ~ F933
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajprenal.00602.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Okabe Masahiro, Motojima Masaru, Miyazaki Yoich, Pastan Ira, Yokoo Takashi, Matsusaka Taiji	4. 巻 316
2. 論文標題 Global polysome analysis of normal and injured podocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F241 ~ F252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajprenal.00115.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 岡部 匡裕, 松阪 泰二	4. 巻 108
2. 論文標題 ポドサイトパチー	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本内科学会誌	6. 最初と最後の頁 116 ~ 123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/naika.108.116	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Masahiro Okabe, Nobuo Tsuboi, Taiji Matsusaka, Takashi Yokoo
2. 発表標題 EGR1 is an Injury Marker in Podocytes
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuyoshi Yamamoto, Masahiro Okabe, Taiji Matsusaka, Takashi Yokoo
2. 発表標題 Atypical Caspase 3-Dependent Death in Podocytes
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡部 匡裕, 坪井 伸夫, 松阪 泰二, 横尾 隆
2. 発表標題 ポドサイト障害マーカーとしてのEGR1発現の検証
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 和佳, 岡部 匡裕, 田中 景子, 横尾 隆, 松阪 泰二
2. 発表標題 ポドサイトの caspase3依存性非典型的細胞死
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamamoto Kazuyoshi, Okabe Masahiro, Yokoo Takashi, Matsusaka Taiji
2. 発表標題 Atypical Caspase 3-Dependent Death Process in Podocytes
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡部 匡裕、小池 健太郎、坪井 伸夫、松阪 泰二、横尾 隆
2. 発表標題 ポドサイトにおけるEGR1発現の臨床病理学的検証
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 和佳、岡部 匡裕、横尾 隆、松阪 泰二
2. 発表標題 ポドサイトの細胞死の特徴
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahiro Okabe, Kazuyoshi Yamamoto, Yoichi Miyazaki, Takashi Yokoo, Taiji Matsusaka
2. 発表標題 Angiotensin II Receptor Blocker Blocks Spreading Podocyte Damage in a Partial Podocytectomy Model.
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuyoshi Yamamoto, Masahiro Okabe, Takashi Yokoo, Taiji Matsusaka
2. 発表標題 P2X7 Expressed in Injured Podocytes May Spread the Kidney Injury Through Caspase 3
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 和佳, 岡部 匡裕, 横尾 隆, 本島 英, 松阪 泰二
2. 発表標題 二次的ポドサイト傷害を描出可能なモザイクマウスにおけるARBの劇的な腎保護
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 和佳, 岡部 匡裕, 横尾 隆, 松阪 泰二
2. 発表標題 障害ポドサイトにおけるP2X7の役割
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡部 匡裕, 宮崎 陽一, 横尾 隆, 松阪 泰二
2. 発表標題 正常ポドサイトに強発現する転写因子Dach1
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiro Okabe, Yoichi Miyazaki, Takashi Yokoo, Taiji Matsusaka
2. 発表標題 Transcription Factor Dach1 in Podocytes
3. 学会等名 American Society of Nephrology, Kidney Week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuyoshi Yamamoto, Masahiro Okabe, Taiji Matsusaka, Takashi Yokoo
2. 発表標題 P2X7-ATP May Mediate Propagation of Podocyte Damage
3. 学会等名 American Society of Nephrology, Kidney Week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岡部 匡裕、松阪 泰二	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社エル・アイ・シー	5. 総ページ数 411
3. 書名 モデル動物の作製と利用 - 循環器疾患2021 <下巻> 第2章 慢性腎臓病モデル, 第3節 原発性糸球体障害モデル, 第4項 ポドサイト傷害モデル	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------