

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16002

研究課題名(和文)尿細管由来蛋白を指標とした慢性腎臓病の予後予測と線維化進展機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of renal fibrosis and prognosis in chronic kidney disease by analyzing factors originated from tubular epithelium

研究代表者

田中 景子(TANAKA, Keiko)

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号：80794370

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)：トレフォイルファクター(TFF)は消化管粘膜上皮を含む各種上皮細胞から産生される蛋白であり、mucinとともに粘膜の恒常性維持、傷害修復過程に重要な役割を果たす。TFF3は腎尿細管で発現するとされ、その意義について検討した。IgA腎症患者において、TFF3は尿細管上皮細胞、とくにUromodulin発現部位とオーバーラップしていた。さらに腎組織RNA発現量は、尿中TFF3濃度、尿細管間質障害マーカーと間質線維化スコアと有意に相関していた。培養尿細管上皮細胞を用いたTFF3発現調節機構については有意な結果が得られず、今後の検討課題であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病の中でも、日本人に多いIgA腎症において、その腎予後は間質障害度や線維化と関連があるとされるが、その機序や予後予測因子は明らかになっていない。今回TFF3が、IgA腎症における間質障害、とくに間質線維化を反映し、尿中TFF3増加がIgA腎症の腎予後予測因子となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Trefoil factor (TFF) is a small peptide that is involved in mucosal protection. TFF3 is widely expressed in multiple tissues including kidney. Previous studies have reported that the urinary TFF3 levels are significantly increased in patients with chronic kidney disease (CKD). The aim of this study is to elucidate the significance of TFF3 in CKD patients. The renal TFF3 mRNA was significantly associated with the urinary TFF3 excretion and the tubulointerstitial fibrosis score in patients of IgA nephropathy (IgAN). Immunostaining of the renal biopsy specimen of IgAN patients revealed that TFF3 is located in the renal tubular epithelial cells. The locations were almost the same as those that showed uromodulin positivity. The urinary TFF3 levels were positively correlated with the levels of urinary biomarkers of tubulointerstitial injury in such patients. TFF3 was associated with renal tubulointerstitial fibrosis, and may be valuable as a prognostic factor in IgAN patients.

研究分野：腎臓病

キーワード：慢性腎臓病 尿細管間質線維化 トレフォイルファクター

## 1. 研究開始当初の背景

トレフォイルファクター (TFF) は消化管粘膜上皮を含む各種上皮細胞から産生される蛋白であり、mucin とともに粘膜の恒常性維持、傷害修復過程に重要な役割を果たす。TFF1、2、3 に分類され、それぞれ発現部位や生理作用が異なっている。なかでも TFF3 は腎尿細管に発現する。我々は、慢性腎臓病患者の尿中 TFF3 が有意に増加している事に注目し、「TFF3 が腎尿細管上皮細胞に発現し、その保護因子として働き、その発現上昇が慢性腎臓病の予後予測因子となる」と仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

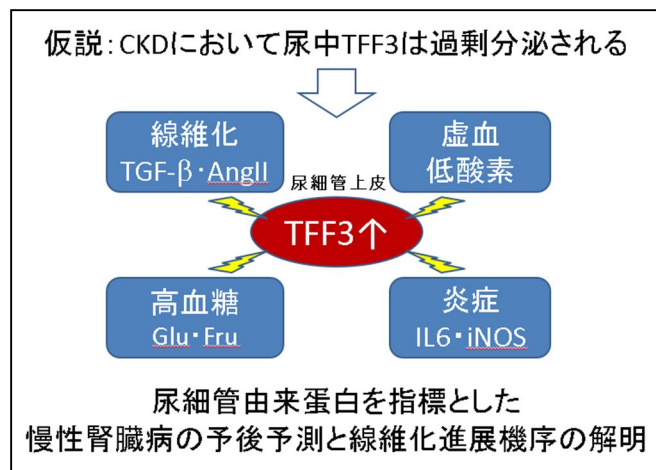
慢性腎臓病の進行と尿中 TFF3 濃度の増加が関連することを報告する研究は数編 (Leberhzer PLoS One 2015, Du PLoS One 2013) あるが、慢性腎臓病の進行、すなわち腎尿細管間質の線維化と、TFF3 との関連を研究する報告は過去にない。本研究の目的は、TFF3 の発現調節機構を明らかにし、TFF3 に線維化抑制機能・腎保護効果があるかどうか検討することである。また、尿中 TFF3 の腎予後予測因子としての意義を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養尿細管上皮細胞を用いた TFF3 発現調節機構の解明

#### 培養尿細管上皮細胞の各種刺激による TFF3 発現量の変化

慢性腎臓病の進行にかかわる、線維化 (TGF- $\beta$ 、Ang) 虚血・低酸素 (Tsuji BBRC 2014) 炎症 (IL-6、iNOS) 高糖濃度 (グルコース、フルクトース) 等の刺激を培養尿細管上皮細胞 (HK 細胞、mProx 細胞) に加え、TFF3 の発現量が増加しうるかを検討する (図)。TFF3 mRNA 量や TFF3 蛋白量は、real-time PCR 法、Western blotting 法や ELISA 法を用いる。刺激に対して尿細管上皮細胞で発現誘導される、FABP (脂肪酸結合蛋白)、VEGF (血管増殖因子)、HIF-1 (hypoxia-inducible factor)、CXCL (炎症性ケモカイン) や CTGF (線維化促進因子) 蛋白等の合成・分泌を同時に検出する。TFF3 とこれら因子発現との関連性を検討する。



TFF3 遺伝子の過剰発現、またはノ

ックダウンによる線維化抑制・進展効果

TFF3 の過剰発現、またはノックダウンにより、と同様の刺激で発現制御される各種因子の合成・分泌量の変化を刺激前後で比較し検討する。

TFF3 遺伝子の過剰発現による Ras/MAPK もしくは JAK/STAT3 経路の活性化

TFF3 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを培養細胞に感染させ、TFF3 を過剰発現させたのち、リン酸化 ERK1/2 とリン酸化 STAT3 の産生量を Western blotting 法や ELISA 法で検討する。

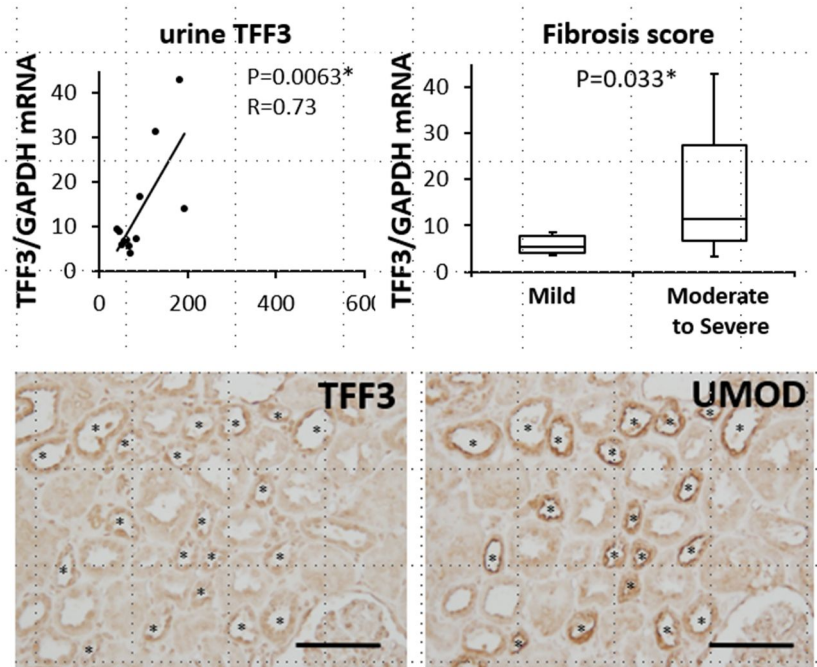
## (2) 慢性腎臓病(CKD)進展予測因子としての尿中 TFF3 増加の意義

外来患者を対象とし、尿中 TFF3 測定開始時点から、2 年後までの腎不全進行状況を追跡する。腎機能の低下速度の評価に加え、血清 Cr の 1.5 倍化、または eGFR の 30%低下や、透析・移植導入のアウトカム到達率をみる。測定開始時点と各フォローアップ時点では、本研究の標的バイオマーカーである尿中 TFF3 に加え、他の尿中因子（下記評価項目）も同時に測定し、経時的動向を比較検討する。尿中物質については、多項目同時測定可能であるマルチプレックスアッセイシステム (Bio-Plex) を利用する。

## 4. 研究成果

### (1) TFF3 の発現部位と尿細管間質線維化との関連性

当院腎生検患者 25 例 (IgA 腎症; 12 例、他の糸球体腎炎; 10 例、minor glomerular abnormalities; 3 例) の腎組織 RNA を解析し、尿中 TFF3 濃度、尿細管間質障害マーカーと組織障害スコアとの相関をみた。IgA 腎症患者において、TFF3 mRNA 量は、尿中への TFF3 分泌量と相関し、また尿細管間質障害マーカーや間質線維化スコアと有意に相関していた。さらに TFF3 は尿細管上皮細胞とくに Uromodulin 発現部位と同部位に発現する事を免疫染色で確認した。この研究成果を論文発表した。



### (2) 培養尿細管上皮細胞を用いた TFF3 発現調節機構の解明

慢性腎臓病に関連があるとされる、線維化(TGF- $\beta$ 、Ang)、炎症(IL-6、iNOS)、高糖濃度(グルコース)、尿毒素(インドキシル硫酸)で培養尿細管上皮細胞を刺激し TFF3 の遺伝子・蛋白発現解析を行ったが、予想に反し TFF3 の発現増加はみられなかった。

### (3) 慢性腎臓病(CKD)進展予測因子としての尿中 TFF3 増加の意義

慢性腎臓病患者の尿検体を使用し、尿中物質として GdIgA1 や各種サイトカインを測定した。GdIgA1 は ELISA で測定し、各種サイトカインはマルチプレックスアッセイシステム (Bio-Plex) を利用した。蛋白尿や腎機能と関連する可能性のあるサイトカインが明らかになり、新たな研究テーマにつながる可能性を見出した。しかし、尿中 TFF3 増加との関連性は明らかにならなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tanaka Keiko, Sugiyama Hitoshi, Yamanari Toshio, Mise Koki, Morinaga Hiroshi, Kitagawa Masashi, Onishi Akifumi, Ogawa-Akiyama Ayu, Tanabe Katsuyuki, Eguchi Jun, Ohmoto Yasukazu, Shikata Kenichi, Wada Jun	4. 巻 23
2. 論文標題 Renal expression of trefoil factor 3 mRNA in association with tubulointerstitial fibrosis in IgA nephropathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nephrology	6. 最初と最後の頁 855 ~ 862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nep.13444	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 -

1. 著者名 Yamanari Toshio, Sugiyama Hitoshi, Tanaka Keiko, Morinaga Hiroshi, Kitagawa Masashi, Onishi Akifumi, Ogawa-Akiyama Ayu, Kano Yuzuki, Mise Koki, Ohmoto Yasukazu, Shikata Kenichi, Wada Jun	4. 巻 2018
2. 論文標題 Urine Trefoil Factors as Prognostic Biomarkers in Chronic Kidney Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/3024698	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 -

1. 著者名 Ogawa-Akiyama Ayu, Sugiyama Hitoshi, Kitagawa Masashi, Tanaka Keiko, Onishi Akifumi, Yamanari Toshio, Morinaga Hiroshi, Uchida Haruhito Adam, Nakamura Kazufumi, Ito Hiroshi, Wada Jun	4. 巻 13
2. 論文標題 Serum cystatin C is an independent biomarker associated with the renal resistive index in patients with chronic kidney disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0193695	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 -

1. 著者名 Onishi Akifumi, Sugiyama Hitoshi, Kitagawa Masashi, Yamanari Toshio, Tanaka Keiko, Ogawa-Akiyama Ayu, Kano Yuzuki, Mise Koki, Tanabe Katsuyuki, Morinaga Hiroshi, Kinomura Masaru, Uchida Haruhito A., Wada Jun	4. 巻 2019
2. 論文標題 Urine 5MedC, a Marker of DNA Methylation, in the Progression of Chronic Kidney Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Disease Markers	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/5432453	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 -

1. 著者名 Ogawa-Akiyama Ayu, Sugiyama Hitoshi, Kitagawa Masashi, Tanaka Keiko, Kano Yuzuki, Mise Koki, Otaka Nozomu, Tanabe Katsuyuki, Morinaga Hiroshi, Kinomura Masaru, Uchida Haruhito A., Wada Jun	4. 巻 15
2. 論文標題 Podocyte autophagy is associated with foot process effacement and proteinuria in patients with minimal change nephrotic syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1~15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0228337	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 -

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