

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17282

研究課題名（和文）小児IgA腎症における肉眼的血尿による急性腎障害、CKD進展メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of acute kidney injury and CKD progression caused by gross hematuria in pediatric IgA nephropathy.

研究代表者

藤村 順也（Fujimura, Junya）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：10793713

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,300,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は肉眼的血尿に伴った急性腎障害（MH-AKI）における尿細管障害における鉄の組織障害からの病態の解明に鉄とアポトーシスに注目し、そのCKD進展機序を明らかにし、進展抑制に関与できる新規特異的治療法の開発の一助を目的とした研究である。

当初の予想より腎生検の残余検体の収集が遅れ、肉眼的血尿に伴う急性腎障害の経過中に腎生検を行った症例が少なく、各症例での凍結の残余検体の確保に難渋した。そこで、腎生検の残余検体の対象を凍結検体からパラフィン切片に変更し、パラフィン切片検体での各種マーカーや遺伝子発現量の定量的解析を行った。また、肉眼的血尿で腎障害症例の特徴と非腎障害例の比較も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児IgA腎症に合併する「肉眼的血尿に伴った急性腎障害（MH-AKI）」は予後不良な転帰をとる重大な病態であるにもかかわらず、その治療法は全く明らかになっていない。組織障害の主座は尿細管間質障害であり、本研究は肉眼的血尿に伴った急性腎障害（MH-AKI）における尿細管障害における鉄の組織障害からの病態の解明に鉄とアポトーシスに注目し、そのCKD進展機序を明らかにし、進展抑制に関与できる新規特異的治療法の開発の一助を目的とした研究である。

研究成果の概要（英文）：This study focused on iron and apoptosis to elucidate the pathogenesis from tissue damage of iron in tubular damage in acute kidney injury associated with gross hematuria (MH-AKI), to clarify the mechanism of CKD progression, and to help develop a new specific treatment that can be involved in inhibiting progression.

The collection of residual specimens from renal biopsies was slower than initially expected, and there were few cases in which renal biopsies were performed during the course of acute kidney injury associated with gross hematuria, making it difficult to secure frozen residual specimens for each case. Therefore, we changed the target of remaining specimens of renal biopsy from frozen specimens to paraffin sections, and performed quantitative analysis of various markers and gene expression levels in paraffin section specimens. We also compared the characteristics of renal failure cases with those of non-renal failure cases using gross hematuria.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：肉眼的血尿 鉄 アポトーシス CKD AKI 腎障害

1．研究開始当初の背景

小児 IgA 腎症に合併する「肉眼的血尿に伴った急性腎障害（MH-AKI）」は予後不良な転帰をとる重大な病態であるにもかかわらず、その治療法は全く明らかになっていない。組織障害の主座は尿細管間質障害であり、赤血球円柱による尿細管閉塞を高率に認めるといった知見を踏まえ、我々は「鉄」による組織障害に着目し先行研究を行ったところ、尿細管障害病変に一致して鉄染色が強く陽性となり、同部位へのマクロファージ集積を認める結果を得た。この結果をもとに、「鉄」が MH-AKI における慢性腎障害（CKD）進展機序の主病態であるとの考察に至った。

2．研究の目的

本研究では MH-AKI 合併日本人 IgA 腎症小児の腎生検残余検体から microdissection により鉄吸収細胞を抽出し、それらの single cell から間質線維化マーカー/活性酸素関連因子/ミトコンドリア障害関連因子/アポトーシス関連蛋白との関連を検討し、進展メカニズムの解明を行う。さらに未だ特異的治療法の存在しない MH-AKI の新規治療法の開発を目指す。

3．研究の方法

日本人小児 IgA 腎症における MH-AKI による CKD 進展メカニズムを明らかにするために以下のよう

に研究をすすめていく。
IgA 腎症小児のうち、MH-AKI 発症例と MH-AKI 非発症例それぞれにおける臨床情報と血液/尿検体を用いた臨床的解析。

生検組織を用いて鉄・マクロファージ染色（先行研究の継続）ならびにアポトーシス関連細胞の染色（TUNEL 染色）。

MH-AKI を発症した IgA 腎症小児の腎生検残余検体を用いて、鉄と間質線維化マーカー・活性酸素関連因子・ミトコンドリア障害関連因子・間質線維化促進因子・アポトーシス関連遺伝子の発現量を定量的に解析する。

MH-AKI を発症した IgA 腎症小児の腎生検残余検体を用いて、RAS 系阻害薬投与の有無による鉄・間質線維化マーカー・活性酸素関連因子・ミトコンドリア障害関連因子・間質線維化促進因子・アポトーシス関連遺伝子の発現量などの分子生物学的マーカーの定量を比較検討し解析する。

4．研究成果

IgA 腎症小児のうち、MH-AKI 発症例と MH-AKI 非発症例それぞれにおける臨床情報収集を継続して行った。IgA 腎症発症から MH-AKI に至るまでの期間、MH-AKI 発症直前から最終観察時までの早朝尿検査（尿蛋白、尿潜血、尿中 2MG、尿中 NGAL）、腎機能（血清クレアチニン・シスタチン C を用いた estimated glomerular filtration rate）を必須項目とする。これまでに MH-AKI の症例報告を行っている施設に研究協力依頼を行い、3 施設から残生検残余検体や臨床情報の提供を受けた。それらの解析を行った。確定的な結論はまだ得られていない。

生検組織を用いて TUNEL 染色を行い、アポトーシス細胞の存在を病理学的に明らかにする。さらに鉄・マクロファージ染色との二重線色を行い、過剰鉄とアポトーシス細胞との関連を証明する。しかし、凍結切片の収集にそう想定よりも難渋した。

MH-AKI を発症した IgA 腎症小児の腎生検残余検体を用いて、microdissection により鉄吸収細胞を抽出する。それらの single cell から定量 array PCR にて鉄と間質線維化マーカー（コラーゲン、フィブロネクチン等）RAS 系関連蛋白、活性酸素関連因子（ROS、HO、O⁻ など）ミトコンドリア障害関連因子（PGC-1 等）間質線維化促進因子（TGF- β 、PAI-1 等）アポトーシス関連遺伝子の発現量を定量的に解析する。これに関しても残余検体の収集に難渋することで予定通りには進行できなかった。

MH-AKI を発症した IgA 腎症小児の腎生検残余検体を用いて、RAS 系阻害薬投与の有無によって層別化し、蛋白尿や腎機能といった臨床的所見を比較検討する。さらに鉄吸収細胞と非鉄吸収細胞に分類し、鉄・間質線維化マーカー・RAS 系関連蛋白・アポトーシス関連遺伝子の発現量などの分子生物学的マーカーの定量を比較検討し解析する。最終的に MH-AKI を発症した IgA 腎症小児に対する RAS 系阻害薬分子生物学的効果を証明することを目的として

いたが、現時点ではそこまで到達できなかった。

進行状況に大きく影響したことは、腎生検の残余検体の収集の遅れである。当初考えていたよりも、肉眼的血尿に伴う急性腎障害の経過中に腎生検を行った症例自体が少なく、またそれぞれの症例における凍結の残検体の確保に難渋した。検体数確保のために、腎生検の残余検体の対象を凍結検体からパラフィン切片に変更を行うことで、検体確保がある程度、行えた。パラフィン切片における検体での各種マーカーや遺伝子発現量の定量的解析の準備にも想定よりも時間を要した。また、MH-AKI 症例、MH-AKI 非発症例における血液検査や尿検査などの臨床情報のデータシート化を行い、臨床的なデータを収集し、そちらについては解析を行っている状況である。臨床情報データシートと各検体で得られた各種マーカーや遺伝子発現量の定量的解析に関しては現時点で確定的な結論は得られていない。

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
研究協力者	飯島 一誠 (Iijima Kadumoto)		
研究協力者	野津 寛大 (Nozu Kandai)		
研究協力者	原 重雄 (Hara Shigeo)		

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
---------	---------