

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08238

研究課題名（和文）ネフロン数と単一ネフロンパラメータの臨床応用

研究課題名（英文）Clinical application of nephron number and nephron parameters

研究代表者

坪井 伸夫（Tsuboi, Nobuo）

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40408422

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）：本研究により、各種進行性腎疾患のネフロン数とネフロン関連指標の解析を行い学会報告と誌上報告した（IgA腎症患者245例、膜性腎症患者106例、肥満関連糸球体症48例、糖尿病性腎症80例）。さらに、上記各種疾患群において、糸球体ポドサイト数と体積を計測（ポドメトリクス解析）を進めている。ポドメトリクス指標ネフロン指標と密接に関連し各種疾患の進行に密接に関連していることが明らかになりつつある。いずれも、画像検査データと生検標本を用いた臨床的アプローチによる初めての知見である。臨床応用へ向けて解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓の構造と機能の維持に必須の解剖学的単位であるネフロン数やポドサイト数を臨床的に定量化することはこれまで技術的に困難であった。我々はこれまでに臨床的アプローチによりネフロン数とポドサイト数を定量化する方法を確立し、各種腎疾患の病態との関連について検討を行ってきた。この方法を応用することで、各個人のネフロン数と疾患病態や予後との解析、腎疾患患者における単一ネフロンGFRをはじめとした単一ネフロン指標の解析が初めて可能となった。また、同一対象においてネフロン数、単一ネフロン指標とポドサイト数を計測した既報研究はなく、相互の関連についての初めての知見となった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have analyzed the number of nephrons and nephron-related parameters in various progressive kidney diseases and reported them in academic conferences and journals (245 patients with IgA nephropathy, 106 patients with membranous nephropathy, 48 patients with obesity-related glomerulopathy, and 80 patients with diabetic nephropathy). In addition, we are measuring the number and volume of glomerular podocytes (podometric analysis) in various disease groups. We found that podometric parameters are closely related to nephron parameters and closely related to the progression of various kidney diseases. These are the first findings from a clinical approach using imaging data and biopsy specimens. Analysis is underway for clinical application.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ネフロン ポドサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行性腎障害を呈する原因疾患は多岐にわたり、その多くが緩徐に末期腎不全に至る難治性疾患である。腎臓はその機能単位であるネフロンの集合体からなる臓器である。ヒトのネフロン数には生来の個体差があり、個人のネフロン数は、機能ネフロンの減少を病態として共有する多くの進行性腎疾患において、腎不全に至る感受性を規定する重要な因子と考えられている。申請者らは、標準法である Dissector/Fractionator (D/F) 法により、日本人を対象として初めて総ネフロン数(腎)を計測し報告した。しかし、D/F 法によるヒト総ネフロン数の計測はバイアスが少なく正確と考えられるが、剖検腎でしか解析できないうえ多大な労力と時間を要する。したがって、解析数が限られること、腎予後との関連を明らかにできないなどの限界がある。一方、申請者らは総ネフロン数のサロゲートとして、腎生検標本上のネフロン密度の解析を行い、縦断的追跡研究によって総腎濾過機能が正常時の低ネフロン密度は長期腎予後不良と関連することなどを報告してきたが、ネフロン密度のみの評価では腎皮質体積が反映されないため、総ネフロン数の指標としては不十分であった。

最近、米国のグループが造影 CT 画像データと腎生検標本を組み合わせることでヒト生体において総ネフロン数を計測する方法を考案した。この方法は、総ネフロン数の計測に加えて、腎病態生理に重要な意義をもつ SNGFR の推算を可能とした (Denic A. N Engl J Med 2017)。一方で、本法は腎皮質体積の計測に造影剤を用いた動脈相 CT 画像データを必要とした。このため、潜在的に腎毒性のある造影剤の使用は腎疾患患者には広く適用できないという限界があり、これまで計測対象は腎移植ドナーに限られていた。申請者はこの方法を腎疾患患者に適用するために「非造影」CT+腎生検を用いた新規法を開発した。これによって、腎疾患患者の総ネフロン数と単一ネフロン指標の推算が可能となり、実験腎臓病学において提示され長らく検証されてこなかった、ネフロン数減少による腎障害進展機序 (Hostetter TH, Brenner BM Am J Physiol 1981) を臨床的に検証するための方法基盤が確立された。

近年の腎臓病研究は、糸球体ポドサイトが、腎機能の維持に極めて重要であることを示している。ポドサイトの主要な役割は糸球体の構造維持と濾過機能である。ポドサイトの障害・脱落は様々な腎障害発症機序による糸球体硬化と高度蛋白尿への進展に直結し、尿細管組織障害から腎機能廃絶に至る共通過程の一つと考えられている。しかし、慢性腎疾患患者が腎不全へ至る過程において SNGFR が如何なる動態を呈するのかについては、これまでネフロン数および単一ネフロン指標を臨床的に解析する手段がなく、明らかにされてこなかった。そのため、ポドサイト数と濾過機能不全の過程としての SNGFR の調節異常 (過剰または過少濾過) との関連を示した既報研究はない。

2. 研究の目的

進行性腎疾患患者を対象としてネフロン数・ポドサイト数関連指標と治療反応性・腎予後との関連を明らかにし、実臨床において有用性の高い予後予測式モデルを構築する。

3. 研究の方法

研究対象： 生検診断の得られた IgA 腎症、特発性膜性腎症、特発性巣状糸球体硬化症、特発性膜性増殖性糸球体腎炎、ループス腎炎、糖尿病性腎症例を対象疾患とする。採取された皮質面積が 2 mm² 未満または非全節性硬化糸球体が 5 個未満の症例は除外する。

対象症例数：当該施設附属 4 病院において、デジタル化 CT データが得られる 2007 年から

2020年に実施された腎生検数は約4,000例であり、そのうち約8割で生検前に非造影CTが実施されている。単一疾患で約4割を占めるIgA腎症のみで1,000例以上となる。臨床背景と治療内容を加味したCOXハザードモデルを想定したサンプル数として十分である。

腎皮質体積の計測：解析ソフト（ITK-SNAP）を用いて非造影CTデータから腎臓の三次元立体像を構築し、腎実質体積（PV）を計測する。PVから以下に示す確立された回帰式を用いて、腎皮質体積（CV）を推算する（Sasaki T, Tsuboi N et al. Sci Rep, 2019）。

$$\text{Estimated CV (cm}^3\text{)} = -1.3 \text{ (intercept)} + 0.71 \times \text{PV (cm}^3\text{)}$$

体積糸球体密度の算出：ソフト（WinROOF）で計測した平面糸球体密度と糸球体面積から体積糸球体密度（NSG density）を算出する（Denic A. J Am Soc Nephrol 2017）。

$$\text{NSG density} = \frac{1}{\beta} \times \sqrt[2]{\frac{\left(\frac{\text{Total number of NSG}}{\text{Area of cortex}}\right)^3}{\frac{\text{Total area of NSG}}{\text{Area of cortex}}}}$$

単一ネフロン指標の算出：両腎皮質体積と体積糸球体密度を掛け合わせ、総ネフロン数を算出する。総腎濾過機能（eGFR）と総蛋白排出量（UPE）を非全節硬化糸球体数で除してSNGFRとSNUPEを算出する。

ポドサイト数の計測：パラフィン包埋切片（3μm）を核（WT-1）及び細胞表面マーカー（Synaptopodin）の二重染色によりポドサイトを同定、核形態を解析し、切片厚×糸球体容積中の核よりポドサイト数を計測する（Venkatareddy. J Am Soc Nephrol 2014）。

横断的解析：得られた計測結果について、後方視的に予後と関連する臨床病理所見との相関を明らかにする。腎移植ドナー生検標本を計測値の比較健常対照群に設定する。

縦断的解析：eGFR40%減少または末期腎不全を腎イベントとした追跡解析を行う。1年以上追跡例について中央値で約7年の観察が可能と考えられる。

4. 研究成果

これまでに、我々が独自に考案した新規法を用いて、肥満関連糸球体症(ORG)48例及び、ステロイド感受性微小変化型ネフローゼ75例の総ネフロン数、SNGFRとSNUPEを計測し報告した。これらの研究により、ORG, MCDにおけるネフロン数、単一ネフロンパラメータのそれぞれの病態における意義について報告した。その後、IgA腎症患者245例、膜性腎症患者106例を対象とした同様の解析を進めてきた。IgA腎症患者ではネフロン数がCKD病期の進行により著しく減少すること、また、IgA腎症の多彩な糸球体病変によって単一ネフロンパラメーターが影響を受けることなどを初めて明らかにし報告した(Marumoto H, Tsuboi N et al. Kidney 360, 2021)。膜性腎症の解析では、本疾患の特徴である基底膜病変病期の進行につれて単一ネフロンGFRが低下することを初めて示し報告した(Okabayashi Y, Tsuboi N et al. Kidney 360 2023)。これは、本疾患の動物モデルであるHymann腎症モデルにおけるマイクロパンクチャー法を用いた検討結果に合致する。糖尿病性腎症患者80例ほどの対象について、ネフロン数、単一ネフロンパラメーターの解析を進め報告した(Miura A et al. ASN2023 oral presentation)。さらに、上記各種疾患群において、糸球体ポドサイト数と体積の計測(ポドメトリクス解析)を進めている。ポドメトリクス指標のうちポドサイトの密度がORGの進行に最も強く関連していることを明らかにした。ORG患者におけるポドメトリクス解析の研究結果については、現在論文投稿審査中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Haruhara Kotaro, Kanzaki Go, Sasaki Takaya, Hatanaka Saeko, Okabayashi Yusuke, Puelles Victor G., Harper Ian S., Shimizu Akira, Cullen-McEwen Luise A., Tsuboi Nobuo, Yokoo Takashi, Bertram John F.	4. 巻 102
2. 論文標題 Associations between nephron number and podometrics in human kidneys	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 1127 ~ 1135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2022.07.028	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 Haruhara Kotaro, Kanzaki Go, Tsuboi Nobuo	4. 巻 46
2. 論文標題 Nephrons, podocytes and chronic kidney disease: Strategic antihypertensive therapy for renoprotection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 299 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-022-01061-5	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 Yusuke Okabayashi, Nobuo Tsuboi, Hirokazu Marumoto, Takaya Sasaki, Kotaro Haruhara, Go Kanzaki, Kentaro Koike, Hiroyuki Ueda, Akira Shimizu, Victor G. Puelles, Vivette D'Agati and Takashi Yokoo.	4. 巻 -
2. 論文標題 Single-Nephron GFR in Different GBM Stages of Membranous Nephropathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Kidney 360 (in press)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 坪井伸夫 岡林祐典	4. 巻 92 (5)
2. 論文標題 予防医学から見た腎疾患診療 肥満：腎血行動態・形態学的変化と腎障害	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 838-842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 坪井伸夫 丸本裕和	4. 巻 92 (6)
2. 論文標題 IgA腎症-最新の知見 総ネフロン数と単一ネフロンGFR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 993-997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 坪井伸夫	4. 巻 16 (5)
2. 論文標題 ネフロン数と高血圧・腎機能連関	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 腎臓内科	6. 最初と最後の頁 611-617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Marumoto Hirokazu, Tsuboi Nobuo, D'Agati Vivette D., Sasaki Takaya, Okabayashi Yusuke, Haruhara Kotaro, Kanzaki Go, Koike Kentaro, Shimizu Akira, Kawamura Tetsuya, Rule Andrew D., Bertram John F., Yokoo Takashi	4. 巻 2
2. 論文標題 Total Nephron Number and Single-Nephron Parameters in Patients with IgA Nephropathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney360	6. 最初と最後の頁 828 ~ 841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34067/KID.0006972020	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 Tsuboi Nobuo, Okabayashi Yusuke	4. 巻 41
2. 論文標題 The Renal Pathology of Obesity: Structure-Function Correlations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Seminars in Nephrology	6. 最初と最後の頁 296 ~ 306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semnephrol.2021.06.002	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 Tsuboi Nobuo	4. 巻 46
2. 論文標題 Determinants of the Glomerular Maximal Size Threshold	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney and Blood Pressure Research	6. 最初と最後の頁 393 ~ 395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000516612	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 Haruhara Kotaro, Sasaki Takaya, de Zoysa Natasha, Okabayashi Yusuke, Kanzaki Go, Yamamoto Izumi, Harper Ian S., Puellas Victor G., Shimizu Akira, Cullen-McEwen Luise A., Tsuboi Nobuo, Yokoo Takashi, Bertram John F.	4. 巻 32
2. 論文標題 Podometrics in Japanese Living Donor Kidneys: Associations with Nephron Number, Age, and Hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 1187 ~ 1199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2020101486	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 Tsuboi Nobuo, Sasaki Takaya, Okabayashi Yusuke, Haruhara Kotaro, Kanzaki Go, Yokoo Takashi	4. 巻 44
2. 論文標題 Assessment of nephron number and single-nephron glomerular filtration rate in a clinical setting	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 605 ~ 617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-020-00612-y	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8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Haruhara K, Kanzaki G, Sasaki T, Hatanaka S, Okabayashi Y, Shimizu A, Tsuboi N, Yokoo T.
2. 発表標題 Podometrics in different cortical zones of the human kidney: The effect of age and hypertension.
3. 学会等名 The 29th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坪井伸夫
2. 発表標題 単一ネフロンあたりの塩分排泄量の推算と腎臓病診療への臨床応用
3. 学会等名 第 34 回ソルトサイエンス研究財団助成研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦茜 岡部匡裕 佐々木峻也 春原浩太郎 坪井伸夫 横尾隆
2. 発表標題 顕性糖尿病性腎症におけるネフロン数と単一ネフロン動態
3. 学会等名 第33回日本糖尿病生腎症研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nobuo Tsuboi, Hirokazu Marumoto, Takaya Sasaki, Yusuke Okabayashi, Kotaro Haruhara, Go Kanzaki, Kentaro Koike, Hiroyuki Ueda, Tetsuya Kawamura, Takashi Yokoo
2. 発表標題 Total number of functional glomeruli at the biopsy diagnosis and disease outcomes in patients with IgA nephropathy: A retrospective observational study
3. 学会等名 International IgA nephropathy symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobuo Tsuboi, Hirokazu Marumoto, Kotaro Haruhara, Takaya Sasaki, Yusuke Okabayashi, Go Kanzaki, Kentaro Koike, Takashi Yokoo
2. 発表標題 Single-nephron salt excretion and nighttime hypertension: A cross-sectional study in patients with IgA nephropathy
3. 学会等名 Annual meeting of the American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kotaro Haruhara ^{1, 2} , Go Kanzaki ² , Yusuke Okabayashi ² , Takaya Sasaki ² , Saeko Hatanaka ² , Akira Shimizu ³ , Luise A. Cullen-McEwen ¹ , Nobuo Tsuboi ² , Takashi Yokoo ² and John F. Bertram ^{*1}
2. 発表標題 Podometrics in different cortical zones and associations with the number of non-sclerotic glomeruli
3. 学会等名 annual meeting of the American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪井伸夫
2. 発表標題 慢性腎臓病の病態とネフロン数
3. 学会等名 日本腎臓学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 春原浩太郎 神崎剛 畑中彩恵子 佐々木峻也 岡林佑典 清水章 坪井伸夫 横尾隆
2. 発表標題 ポドサイト数と大きさの腎皮質領域別解析：剖検腎の検討
3. 学会等名 日本腎臓学会総会
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	清水 章 (Shimizu Akira) (00256942)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分 担 者	春原 浩太郎 (Haruhara Kotaro) (20827034)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	

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