

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16172

研究課題名(和文) EGR-1を用いた回復可能な傷害ポドサイトの検出

研究課題名(英文) Detection of recoverable injured podocytes using EGR-1 staining

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) 3,500,000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ポドサイト関連mRNA量と正相関、ポドサイト関連タンパクの染色性と逆相関し、ヒトにおいてもポドサイト傷害との関連が示された。ポドサイトEGR-1発現率は糸球体腎炎患者で高い傾向にあり、また糸球体腎炎の急性病変と関連し、特に急性の傷害で発現すると考えられた。IgA腎症あるいはループス腎炎患者では、ポドサイトのEGR1発現率が高くとともに、多くの症例で治療により尿蛋白減少を達成しており、EGR-1陽性で表現される傷害ポドサイトの可塑性が示唆された。以上より、回復可能な傷害ポドサイトの検出にEGR-1染色が有用な可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓の濾過装置である糸球体の重要な構成細胞であるポドサイトを保護することは、腎臓病の進行を抑える上で重要である。ポドサイトは傷害を受け続けると糸球体から剥がれ落ち、かつ再生できないため、早期に傷害ポドサイトを検出し、剥がれ落ちる前に保護することが望まれる。本研究により、糸球体疾患患者においてEGR-1が回復可能な傷害ポドサイトを検出できるマーカーとなり得る可能性を見出した。EGR-1染色を行うことで、糸球体疾患患者のポドサイト傷害の程度を可視化することが可能となり、また、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、個々の患者にあわせた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, podocyte EGR-1 expression was positively correlated with urinary protein level and urinary podocyte-related mRNA levels and inversely correlated with expression of podocyte-related protein, suggesting an association between podocyte EGR-1 expression and podocyte injury. Podocyte EGR-1 expression tended to be higher in patients with glomerulonephritis and was associated with histological acute lesions of glomerulonephritis. EGR-1 in podocytes may be expressed by acute injury. Most patients with IgA nephropathy or lupus nephritis had a reduction of urinary protein with treatment, even in patients with a high percentage of EGR-1 positive podocytes. These findings suggest the reversibility of injured podocytes expressing EGR-1. Thus, EGR-1 staining may be useful in detecting reversible injured podocytes.

研究分野：腎臓学

キーワード：ポドサイト ポドサイト傷害 EGR-1 糸球体疾患 糸球体腎炎 ネフローゼ症候群 慢性腎臓病 IgA腎症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (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 **1,330** 万人と推測されており、これは本邦の成人人口の **12.9%**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 **4** 万人を超え、年々透析患者数が増加している。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糸球体上皮細胞であるポドサイトに傷害が生じ、ポドサイトが脱落していく。ポドサイトは生体内では増殖できず、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。すると残存糸球体への負荷が強まり、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という悪循環に陥る。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の一助となると考えられる。

マウスではデスミンがポドサイト傷害マーカーとして用いられるが、現時点で確立したヒト組織におけるポドサイト傷害マーカーは存在していない。ポドサイトの特異的な構造であるスリット膜のタンパクであるネフリンやポドシンがポドサイトの傷害マーカーとして用いられることがあるが、これらはポドサイト傷害と脱落を分けて評価できない。現在生じているポドサイト傷害を同定するために、傷害のみを同定できるマーカーが望まれる。ただし、傷害が持続するとポドサイトは糸球体から脱落してしまうため、とくにポドサイトを保護するためには「まだ回復可能な傷害ポドサイトを検出するマーカー」が好ましい。

研究代表者らはポドサイト傷害モデルマウスを用いた実験で、傷害ポドサイトにおいて、尿蛋白が顕著となる前の「傷害早期」より転写因子である **EGR-1** が発現上昇し、その後ネフリンなどのポドサイトマーカーの減弱と共に **EGR-1** の発現が低下していくことを見出した(文献 **1**)。正常ポドサイトでは **EGR-1** は発現していなかった。また、**EGR-1** は種を超えて保存されており、ヒトの傷害ポドサイトでも発現する可能性があった。実際、少数例の検討で、膜性腎症、**IgA** 腎症およびループス腎炎など各種ヒト糸球体疾患においても **EGR-1** がポドサイトに発現していた。しかしながら、まだ多くの糸球体疾患症例での検証がされておらず、また腎予後との関連を調査する必要がある。

### 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、**EGR-1** がヒトの糸球体のポドサイト傷害を表しうるかを検証することを目的とした。具体的には 糸球体疾患患者のポドサイトで **EGR-1** が発現上昇しているか、ポドサイトにおける **EGR-1** 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、ポドサイトにおける **EGR-1** の発現程度が腎予後と関連するか、を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### [1] 糸球体疾患患者におけるポドサイト **EGR-1** 発現

東京慈恵会医科大学附属病院で **2018** 年 **6** 月から **2021** 年 **12** 月の間に腎生検で糸球体疾患と診断された成人症例を対象に、腎生検組織に対して **EGR-1** 染色を行い、ポドサイトにおける **EGR-1** 陽性割合 (**%EGR1pod**) を測定した。コントロールを、血尿あるいは尿蛋白精査のために腎生検を施行したものの、糸球体に明らかな異常の無かった症例とした。尿細管間質炎症例ならびに腎移植症例は除外した。臨床パラメータとして腎機能、尿蛋白量および血尿をカルテより抽出、尿中ネフリン・ポドシン mRNA 量および尿中ポドカリキシン量を腎生検時に得た尿より測定、組織パラメータとして全節性硬化糸球体率、分節状糸球体硬化症率、細胞性/線維細胞性半月体形成糸球体率、線維性半月体形成糸球体率、糸球体ポドシン発現程度、糸球体あたりのポドサイト数および尿細管間質障害度を腎生検組織より測定し、**%EGR1pod** とこれらのパラメータを各々比較した。

#### [2] **IgA** 腎症患者におけるポドサイト **EGR-1** 発現

[1] のコホートのサブグループ解析として、**IgA** 腎症患者において、**%EGR1pod** と各種臨床パラメータ・組織パラメータ ([1] の項目に加えて、管内細胞増多を伴う糸球体率を追加) との比較を行った。また、ベースラインの尿蛋白クレアチニン比 (**UPCR**) **0.3 g/g** 以上で **1** 年以上フォローされた症例を対象に、**2** 年間の尿蛋白寛解 (定義: 連続 **2** 回の外来通院で **UPCR** **<0.3 g/g** を達成) における **%EGR1pod** のハザード比を **Cox** 比例ハザードモデルを用いて検証した。

#### [3] ループス腎炎患者におけるポドサイト **EGR-1** 発現

東京慈恵会医科大学附属病院で **2001** 年 **1** 月から **2020** 年 **3** 月の間に腎生検でループス腎炎と診断された症例を対象に、腎組織の **EGR-1** 染色を行った。糸球体の障害が強く、**%EGR1pod** の算出が困難な症例があったため、**EGR-1** 陽性のポドサイトを **1** つでも含む糸球体の割合

を%**EGR1glo**と定義し、これと、臨床パラメータとして**SLEDAI**スコア、腎機能、尿蛋白量、血清補体値、血清アルブミン値、血中白血球数、ヘモグロビン値および血小板数を、組織パラメータとして全節性硬化系球体率、分節状系球体硬化症率、細胞性/線維細胞性半月体形成系球体率、線維性半月体形成系球体率、管内細胞増多を伴う系球体率、フィブリノイド壊死を伴う系球体率および尿細管間質障害度を、各々比較した。また、ループス腎炎 **III, IV, V** 型の患者で、**UPCR >0.5 g/g** かつ免疫抑制治療を受け**1**年以上フォローされた症例を対象に、**1**年間の尿蛋白減少 (**UPC 0.5g/g**) および**10**年間の腎予後 (**eGFR 30%**以上の低下) と%**EGR1glo**の関連を**Cox** 比例ハザードモデルを用いて検証した。

#### [4] 微小変化型ネフローゼ症候群および原発性巣状分節性系球体硬化症患者におけるポドサイト **EGR-1** 発現

東京慈恵会医科大学附属病院で**2001**年**1**月から**2020**年**3**月の間に腎生検で微小変化型ネフローゼ症候群あるいは原発性巣状分節性系球体硬化症患者と診断されたネフローゼ症候群発症症例を対象に、腎組織の**EGR-1**染色を行い、%**EGR1pod**を比較した。

### 4. 研究成果

#### [1] 系球体疾患患者におけるポドサイト **EGR-1** 発現

**102**名の系球体疾患患者の解析により、各種系球体疾患 (**IgA**腎症, **IgAN**; ループス腎炎, **LN**; **ANCA**関連系球体腎炎, **ANCA-GN**; 微小変化型ネフローゼ症候群, **MCD**; 原発性巣状分節性系球体硬化症, **pFSGS**; 膜性腎症, **MN**) 患者の系球体においてポドサイトの **EGR1** 発現が確認され、その発現率 (%**EGR1pod**) はコントロール (微小変化系球体, **MGA**) と比べて高い傾向にあった (図1)。%**EGR1pod** は尿蛋白、尿中ネフリン mRNA 量および尿中ポドシン mRNA 量と有意な相関を示した。組織所見では%**EGR1pod** は細胞性/線維細胞性半月体形成系球体率と有意に正相関し、系球体ポドシン発現とは有意に逆相関した (図2)。以上より、ポドサイトの **EGR-1** 発現が、ヒト系球体疾患においてもポドサイト傷害を示し、ポドサイト傷害マーカーとなり得ることが示された。ポドシン染色では脱落したポドサイトと傷害ポドサイトを区別することが困難であり、実際、系球体のポドシン発現は系球体のポドサイト数とも関連していた。一方、%**EGR1pod** は系球体のポドサイト数と相関を呈さず、**EGR-1** 染色はポドサイト傷害のみを観察できる可能性が示唆された。

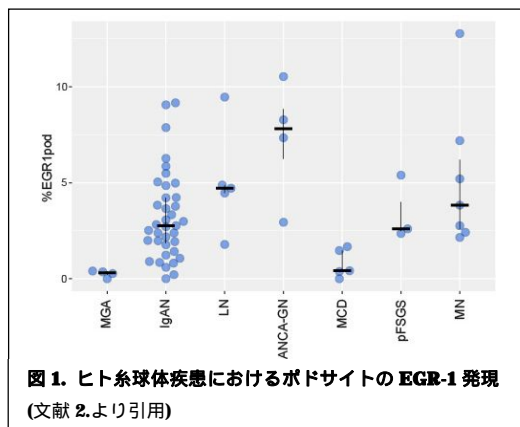


図1. ヒト系球体疾患におけるポドサイトの **EGR-1** 発現 (文献2より引用)

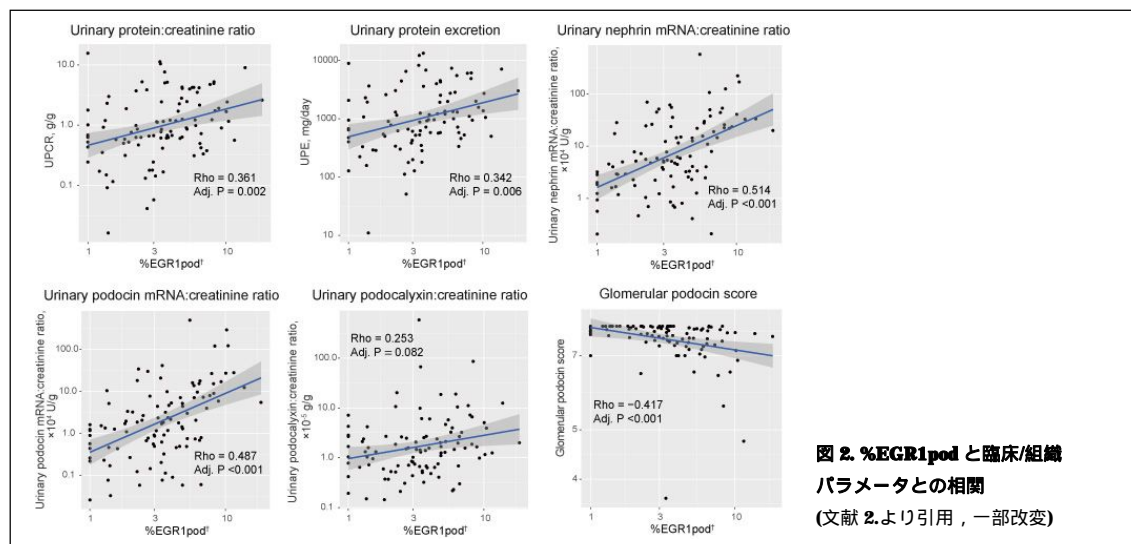


図2. %**EGR1pod** と臨床/組織パラメータとの相関 (文献2より引用、一部改変)

#### [2] **IgA** 腎症患者におけるポドサイト **EGR-1** 発現

**IgA**腎症患者**37**名において、%**EGR1pod** は尿蛋白量、尿中ネフリン・ポドシン mRNA 量、尿中ポドカリキシン量、細胞性/線維細胞性半月体形成系球体率および管内細胞増多を呈する系球体率と正相関、系球体ポドシン発現と逆相関する傾向にあった。**Oxford**分類では**C**病変を有さない患者と比して、**C**病変を有する患者の%**EGR1pod**が高値であった。ポドサイトにおける**EGR1**発現は**IgA**腎症の疾患活動性に関連しており、この結果は急性病変がポドサイト傷

害に関連していたという過去の報告に一致していた (文献 3-5) . IgA 腎症患者 33 名による縦断解析では ,%EGR1pod が高値であることが 2 年間の尿蛋白寛解により強く関連しており (図 3A) , 傷害ポドサイトは ,その傷害が強くとも回復しうる可能性が示唆された .過去の論文においても ,治療によって尿中ポドサイト関連 mRNA の減少が示されている (文献 5) .本研究では ,特に残存ポドサイト数が多く ,かつ%EGR1pod が高い症例で寛解しやすく (図 3B) ,発症早期かつ病勢の強い症例に免疫抑制治療を行うことで ,ポドサイトを保護できることが示唆された .

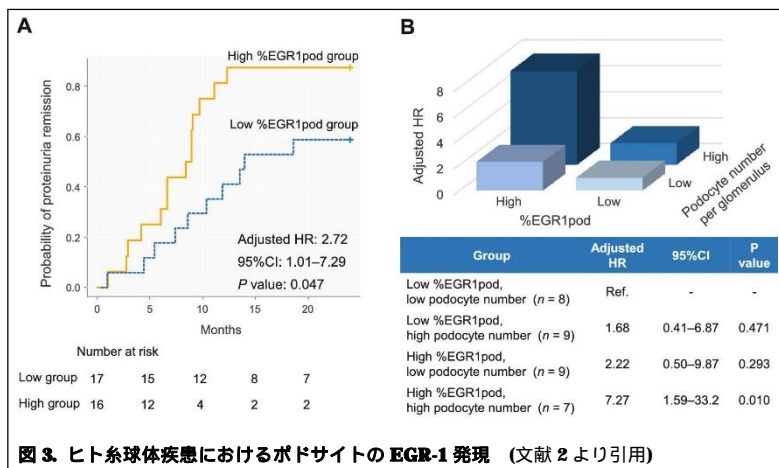


図 3. ヒト糸球体疾患におけるポドサイトの EGR-1 発現 (文献 2 より引用)

### [3] ループス腎炎患者におけるポドサイト EGR-1 発現

ループス腎炎患者 75 名を対象に解析した .%EGR1glo は有意に SLEDAI スコア ,尿蛋白量 ,細胞性/線維細胞性半月体形成糸球体率 ,管内細胞増多を伴う糸球体率 ,フィブリノイド壊死を伴う糸球体率と相関 ,腎機能と逆相関していた .ループス腎炎患者においても ,疾患活動性とポドサイト傷害が関連しており ,過去の論文と一致する結果であった (文献 6-8) .42 例を対象とした縦断解析では ,%EGR1glo は 1 年間での UPCR <0.5 g/g の達成には関連しなかったが ,10 年間での eGFR 30%以上の低下には関連しており ,%EGR1glo が高い症例ほど腎予後が不良であった .この関係性はベースラインの腎機能および尿蛋白 ,細胞性/線維細胞性半月体形成糸球体率および尿細管間質障害度で補正しても変化なかった .

### [4] 微小変化型ネフローゼ症候群および原発性巣状分節性糸球体硬化症患者におけるポドサイト EGR-1 発現

微小変化型ネフローゼ症候群患者 36 例および原発性巣状分節性糸球体硬化症患者 9 例を対象に ,腎組織の EGR-1 染色を施行した .%EGR1pod は原発性巣状分節性糸球体硬化症患者で有意に高値であった .原発性巣状分節性糸球体硬化症患者は微小変化型ネフローゼ症候群患者と比して予後が不良であることが多く ,ポドサイト傷害の強さがこれに影響している可能性がある .また ,微小変化型ネフローゼ症候群と原発性巣状分節性糸球体硬化症はしばしば鑑別困難であるが ,ポドサイトの EGR-1 発現の多寡によって鑑別できる可能性が示唆された .ただし ,症例数が少なく ,今後症例を増やしての解析が望まれる .

## 文献

1. Okabe M, Motojima M, Miyazaki Y, Pastan I, Yokoo T, Matsusaka T. Global polysome analysis of normal and injured podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2019;316:F241-F252.
2. Okabe M, Koike K, Yamamoto I, Tsuboi N, Matsusaka T, Yokoo T. Early growth response 1 as a podocyte injury marker in human glomerular diseases. *Clin Kidney J.* 2024;17:sfad289.
3. Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Cumulative excretion of urinary podocytes reflects disease progression in IgA nephropathy and Schönlein-Henoch purpura nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:231-8.
4. Asao R, Asanuma K, Kodama F 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;7:1385-93.
5. Fukuda A, Sato Y, Iwakiri T et al. Urine podocyte mRNAs mark disease activity in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30:1140-50.
6. Rezende GM, Viana VS, Malheiros DMAC, et al. Podocyte injury in pure membranous and proliferative lupus nephritis: distinct underlying mechanisms of proteinuria? *Lupus.* 2014;23:255-262.

- 7. Perysinaki GS, Moysiadis DK, Bertias G, et al. Podocyte main slit diaphragm proteins, nephrin and podocin, are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology. *Lupus*. 2011;20:781–791.**
- 8. Wang Y, Yu F, Song D, Wang S-X, Zhao M-H. Podocyte involvement in lupus nephritis based on the 2003 ISN/RPS system: a large cohort study from a single centre. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53:1235–1244.**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okabe Masahiro, Koike Kentaro, Yamamoto Izumi, Tsuboi Nobuo, Matsusaka Taiji, Yokoo Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Early growth response 1 as a podocyte injury marker in human glomerular diseases	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Clinical Kidney Journal	6. 最初と最後の頁 sfad289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ckj/sfad289	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 Yamamoto Kazuyoshi, Okabe Masahiro, Tanaka Keiko, Yokoo Takashi, Pastan Ira, Araoka Toshikazu, Osafune Kenji, Udagawa Tomohiro, Koizumi Masahiro, Matsusaka Taiji	4. 巻 323
2. 論文標題 Podocytes are lost from glomeruli before completing apoptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F515 ~ F526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajprenal.00080.2022	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 岡部匡裕1, 松阪泰二2	4. 巻 15
2. 論文標題 ポドサイト傷害の糸球体内伝搬	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 腎臓内科	6. 最初と最後の頁 698 ~ 703
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 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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Masahiro Okabe, Kentaro Koike, Nobuo Tsuboi, Taiji Matsusaka, Takashi Yokoo
2. 発表標題 Podocyte Injury Marker EGR1 in Lupus Nephritis
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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 微小変化型ネフローゼ症候群および巣状分節性糸球体硬化症におけるポドサイトEGR1発現
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023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 ループス腎炎におけるポドサイト傷害マーカーとしてのEGR1の意義
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

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

〔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
---------	---------