

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2016

課題番号：23590702

研究課題名(和文)尿解析による腎疾患の診断に関する検討

研究課題名(英文)Evaluating state of renal disease by analyzing urine

研究代表者

尾田 高志(OODA, TAKASHI)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：90531187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：腎疾患の最終診断は、主に腎生検にゆだねられているが、腎生検は侵襲的な検査で、10個前後の糸球体形態から全体を予測する方法自体に限界も指摘されている。一方、尿検査は非侵襲的で、腎疾患の診断・予後判定上の有用性が考えられる。そこで尿沈渣中の細胞を免疫細胞学的あるいはmRNAの発現レベルにより検討した。その結果、尿沈渣中のCLDN1、CD68、NE陽性細胞数、尿沈渣中のAQP2で補正したCLDN1 mRNAレベル、CD68 mRNAレベルおよび尿沈渣中のAQP2で補正したM2 M 関連のmRNAレベルが、半月体形成など腎疾患の活動性と相関し、腎疾患の病状把握、治療薬の調整の際に有用であると思われた。

研究成果の概要(英文)：Urine tests are non-invasive and may reflect the general condition of the whole kidney better than do renal biopsy results, so the urinary sediments of patients who underwent kidney biopsy in our hospital were analyzed in relation to their renal histological conditions. Claudin1 is a tight-junction protein specifically expressed by epithelial cells of Bowman's capsule. Claudin1-, CD68- and NE-positive cell counts were higher in patients with glomerular crescents (especially cellular crescents) than in patients without crescents, and relative levels of mRNA for CD68 and the M2 M markers were also higher in patients with glomerular crescents. These data suggest that IF staining for claudin1, CD68 and NE in urinary sediments and the relative levels of mRNA for CD68 and M2 M markers in urinary sediments are useful for evaluating the state of glomerular diseases.

研究分野：腎臓内科

キーワード：尿 腎疾患 疾患活動性 尿沈渣 半月体

## 1. 研究開始当初の背景

各種腎疾患から末期腎不全へと進行する患者は増加し続けており、1兆円を越す医療費の原因として医療経済上も重大な問題となっている。腎疾患の診療上重要なのは、疾患が進行性であるか否かの判断に基づき治療法を選択することにあるが、現在、この最終判断は腎生検にゆだねられている。腎生検法は各種器具の進歩に伴い着実に安全性は増しているものの出血合併症は不可避であり、非常に侵襲的な検査である。また、腎疾患は一般に急性増悪期や寛解期などを繰り返して徐々に進行するため、経過中に正しい病状の把握が必要となるが、上記のような危険性のため腎生検を繰り返し実施するのは容易なことではない。さらに、腎生検は200万個といわれる糸球体のわずか10個前後の形態から全体を予測するものであり、その方法自体に診断上の限界が指摘されている。すなわち、進行性腎疾患においては経過中に変わるその病状に応じて、投与薬を適切に使い分けることが、より良い治療につながるものと考えられるが、腎生検を診断・病状把握の基盤とする現在の検査体系では的確で機敏な病状把握は不可能である。一方、尿はすべての糸球体および尿細管、すなわち腎臓全体の状況を反映して変化する可能性から腎疾患の診断・予後判定上の有用性が考えられる。また、尿検査は侵襲がなく、必要な時に手軽に何度でも繰り返し実施が可能である。このように尿検査は大きな有用性を秘めた検査であるにもかかわらず、実はその系統だった詳細な解析は極めて少ない。

## 2. 研究の目的

尿沈渣においては、赤血球、白血球、円柱などが一般の尿検査で評価されるが、このうち白血球の分画であるマクロファージ、好中球やリンパ球などが各種腎疾患の発症・進展に関与していることが報告されている。尿沈

渣にはこれら外来の細胞ばかりでなく、尿管上皮細胞、ボウマンの上皮細胞、足細胞(ポドサイト)など腎固有の細胞の混入もみられる。本研究では尿沈渣中の細胞成分を系統的に解析することにより、より正確な腎疾患の診断や予後判定を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

腎生検目的で入院した患者の早朝尿を集め、沈渣細胞を各種細胞マーカーを用いた蛍光免疫染色で同定。マーカーとしては、好中球：好中球エラスターゼ(NE)、マクロファージ：CD68、T細胞：CD3、ボウマン嚢上皮：クロードイン1(CLDN1)、ポドサイト：シナプトポディン、尿管上皮：サイトケラチンなどを使用した。各種陽性細胞数と、半月体形成など腎生検の組織所見、尿中赤血球数や尿蛋白量など臨床検査所見、組織診断分類との関係性を評価した。さらに尿沈渣細胞のmRNA発現をリアルタイムRT-PCR法で定量し、腎生検の組織所見との相関を検討した。最後に、マクロファージ(M)のフェノタイプであるM1、M2と関連するマーカー等のmRNA発現と腎生検の組織所見との相関を評価した。

## 4. 研究成果

シナプトポディン、サイトケラチン、CD3の免疫染色では、腎疾患の違いあるいは病状の違いによる有意な変化を認めなかった。一方、CLDN1、CD68、NE陽性細胞数は、半月体のある症例において半月体のない症例と比較し、有意に増加していた。しかし、硬化糸球体が高度な症例と軽度な症例との間で有意な差を認めなかった。また半月体の性状では、CLDN1陽性細胞数は、半月体なし症例と比較し、細胞性半月体症例において有意に増加していた。CD68陽性細胞数は、半月体なし症例と比較し、細胞性半月体症例、線維細胞

性半月体症例において有意に増加していた。NE 陽性細胞数は、半月体なし症例と比較し、細胞性半月体症例において有意に増加していた。そこで、CLDN1、CD68、NE 陽性細胞数と半月体の有無との関係を調べるロジスティック解析を行い、ROC 曲線を作成した。CLDN1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数と半月体の存在とのロジスティック解析においてそれぞれ  $P=0.005$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.001$  と有意であり、ROC 曲線の AUC はそれぞれ 0.603、0.699、0.655、オッズ比はそれぞれ 1.023、1.022、1.017 であった。図 1 に代表的な CD68 に関する ROC 曲線の結果を示す。

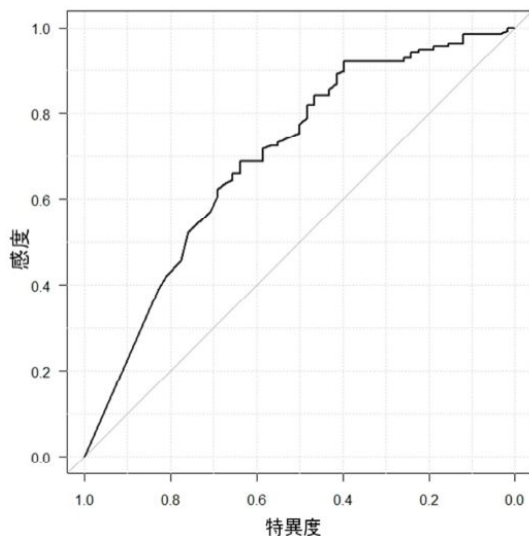


図 1. CD68 陽性細胞数と半月体形成に関する ROC 曲線 ( $P<0.001$ ,  $AUC=0.699$ )

臨床所見との関連性の検討においては、CLDN1 陽性細胞数は、CD68、NE 陽性細胞数と異なり、尿蛋白の増加に伴い有意に増加していた。また CLDN1、CD68、NE 陽性細胞数は尿中赤血球数の増加に伴い、有意に増加していた。

ついで、沈渣細胞から抽出した mRNA に関して、real time-RT-PCR による定量結果を解析した。M1 マクロファージと関連する iNOS、IL-6 mRNA レベルを AQP2 で補正した値と半月体の有無および糸球体硬化の程度との関

係を評価したところ、AQP2 で補正した iNOS、IL-6 mRNA レベルは半月体の有無では有意な差がみられなかった。また、糸球体硬化が高度の症例と糸球体硬化が軽度の症例との間でも有意な差がみられなかった。一方、AQP2 で補正した M2 マクロファージと関連する CD163、CD204、CD206、IL-10 mRNA レベルと半月体の有無および糸球体硬化の程度との関係では、CD163、CD204、CD206、IL-10 mRNA レベルは半月体がある症例で、半月体のない症例と比較して、有意に高値であった。AQP2 で補正した CD163、CD204、CD206、IL-10 mRNA レベルは、糸球体硬化が高度の症例と軽度の症例との間で有意な差がみられなかった。

AQP2 で補正した尿沈渣中 CD163、CD204、CD206、IL-10 mRNA レベルが半月体の有無をどれだけ予測できるかを評価するために、ロジスティック解析を行い、ROC 曲線を描いた。AQP2 で補正した CD163、CD204、CD206、IL-10 mRNA レベルと半月体陽性とのロジスティック解析においてそれぞれ  $P<0.001$ 、 $P=0.029$ 、 $P=0.004$ 、 $P<0.001$  と有意な所見あり、ROC 曲線の AUC はそれぞれ 0.747、0.722、0.698、0.697、オッズ比はそれぞれ 1.023、1.010、1.140、1.926 であった。すなわち、M1 マクロファージと関連する iNOS、IL-6 は、半月体の有無で有意差を認めなかったのに対し、M2 マクロファージのマーカーである CD168、CD204、CD206、M2 マクロファージが主に分泌する IL-10 mRNA は半月体の存在する症例において、半月体のない症例と比べて高値であったため、半月体の存在と関連する尿沈渣中のマクロファージは M2 マクロファージが優位である可能性が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Uchida T, Oda T, Takechi H, Matsubara H, Watanabe A, Yamamoto K, Oshima N, Sakurai Y, Kono T, Shimazaki H, Tamai S, Kumagai H. Role of tubulointerstitial plasmin in the progression of IgA nephropathy. *J Nephrol*. 2016; 29(1):53-62. 査読あり
2. Chiba T, Matsuo H, Kawamura Y, Nagamori S, Nishiyama T, Wei L, Nakayama A, Nakamura T, Sakiyama M, Takada T, Taketani Y, Suma S, Naito M, Oda T, Kumagai H, Moriyama Y, Ichida K, Shimizu T, Kanai Y, Shinomiya N. NPT1/SLC17A1 is a renal urate exporter in humans and its common gain-of-function variant decreases the risk of renal underexcretion gout. *Arthritis Rheumatol*. 2015; 67(1):281-7. 査読あり
3. Oshima N, Onimaru H, Yamamoto K, Takechi H, Nishida Y, Oda T, Kumagai H. Expression and functions of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic receptors on the bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla. *Hypertens Res*. 2014; 37(11):976-83. 査読あり
4. Oshima N, Onimaru H, Takechi H, Yamamoto K, Watanabe A, Uchida T, Nishida Y, Oda T, Kumagai H. Aldosterone is synthesized in and activates bulbospinal neurons through mineralocorticoid receptors and ENaCs in the RVLM. *Hypertens Res*. 2013; 36(6):504-12. 査読あり
5. Takechi H, Oda T, Hotta O, Yamamoto K, Oshima N, Matsunobu T, Shiotani A, Nagura H, Shimazaki H, Tamai S, Sakurai Y, Kumagai H. Clinical and immunological implications of increase in CD208+ dendritic cells in tonsils of patients with immunoglobulin A nephropathy. *Clinical and*

immunological implications of increase in CD208+ dendritic cells in tonsils of patients with immunoglobulin A nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2013; 28(12):3004-13. 査読あり

6. Kushiyama T, Oda T, Yamamoto K, Higashi K, Watanabe A, Takechi H, Uchida T, Oshima N, Sakurai Y, Miura S, Kumagai H. Protective effects of Rho kinase inhibitor fasudil on rats with chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013; 304(11):F1325-34. 査読あり
7. Oda T, Yoshizawa N, Yamakami K, Sakurai Y, Takechi H, Yamamoto K, Oshima N, Kumagai H. The role of nephritis-associated plasmin receptor (NAP1r) in glomerulonephritis associated with streptococcal infection. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:417675. doi: 10.1155/2012/417675. Epub 2012 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 山本 浩仁郎, 尾田 高志, 伊藤 誓悟, 千田 将光, 只野 裕己, 松原 秀史, 武智 華子, 大島 直紀, 熊谷 裕生 各種腎疾患患者における尿沈渣中マクロファージ関連 mRNA 発現の検討. 氷川フォーラム 2013.5.25, 大宮, 埼玉
2. 山本 浩仁郎, 尾田 高志, 伊藤 誓悟, 千田 将光, 只野 裕己, 松原 秀史, 武智 華子, 大島 直紀, 熊谷 裕生 腎生検患者の尿沈渣におけるマクロファージサブタイプの検討. 日本腎臓学会学術集会 2013.5.10-5.12, 有楽町, 東京
3. Yamamoto K, Oda T, Senda M, Tadano H, Matsubara H, Uchida T, Watanabe A, Takechi H, Oshima N, Sakurai Y, Kumagai H. Evaluation of disease state of various glomerulonephritis by the

levels of claudin1 and CD68 mRNA in urine. American Society of Nephrology, 2012.10.30-11.4, San Diego, USA.

4. 山本 浩仁郎, 尾田 高志, 千田 将光, 只野 裕己, 松原 秀史, 内田 貴大, 渡辺 篤史, 武智 華子, 大島 直紀, 三浦 総一郎, 熊谷 裕生 腎生検患者の尿沈渣における Claudin1 陽性細胞数の検討. 日本腎臓学会学術集会 2012.6.1-6.3, 横浜, 神奈川

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

尾田 高志 (Oda, Takashi)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90531187

### (2)研究分担者

熊谷 裕生 (Kumagai, Hiroo)  
防衛医科大学校・内科学・教授  
研究者番号：50170048

櫻井 裕 (Sakurai, Yutaka)  
防衛医科大学校・衛生学公衆衛生学・教授  
研究者番号：00235227

山上 和夫 (Yamakami, Kazuo)  
防衛医科大学校・衛生学公衆衛生学・  
准教授  
研究者番号：20531437

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )