

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659279

研究課題名(和文)慢性腎臓病患者の予後予測スコアリングシステムの樹立

研究課題名(英文)Establishment of the scoring system for predicting the prognosis of CKD patients.

研究代表者

安部 尚子 (ABE, Naoko)

徳島大学・大学病院・特任助教

研究者番号：70623271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：世界的な規模でCKD患者が増加し、末期腎不全に至ることで重大な健康問題となっている。現在のスクリーニング検査としてのアルブミンやクレアチニンの測定では、相当数の患者の診断が正しく行うことができない。我々はまず、さまざまなCKD患者の尿からエクソソームを単離した。次いで、タンパク尿の多い患者尿より、ポドサイト由来のエクソソーム内タンパク質(PDEFs)の発現を調べた。PDEFsの検出された患者では、糖尿病性腎症などの進行性の腎障害であることが判明した。尿中のPDEFsの発現量は糸球体内での同タンパク質の発現量の減少と相関していた。PDEFの評価・解析はCKDとCVDの関係理解に有用である

研究成果の概要(英文)：The worldwide rise in the number of patients with chronic kidney disease (CKD) and consequent end-stage renal failure is a global public health problem. Current screening strategies, based on creatinine or albuminuria, fail to identify a considerable number of subjects with CKD. We first isolate exosomes from various CKD patients. We then examined the expression of podocyte-derived exosomal transmembrane factors (PDEFs) in urine from various CKD patients with gross proteinuria. While extent of albuminuria was not different, progressing renal diseases such as diabetic nephropathy exhibited high levels of urinary PDEFs. Glomerular expression of PDEFs was decreased in accordance with the amount of PDEFs in urine of the patients. The higher amount of urinary PDEFs secreted, the earlier the renal function declined. Evaluation and analysis of PDEFs would provide some clues to understanding the molecular linkage between CKD and CVD.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：CKD 慢性腎臓病 予後 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

進行性の慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease、CKD) は不可逆的な糸球体硬化に陥り、末期腎不全、透析導入へと進行するだけでなく、心筋梗塞・脳卒中といった心血管イベント・死亡の重要なリスクとなる。このような生命を脅かし、医療費の高騰を招く CKD の進展を抑制するために、より早期の診断と治療開始の重要である。しかし、アルブミン尿はほぼすべての腎疾患で見られるなど、鑑別には有用ではなく、個々の CKD 患者の腎機能低下の進行速度は予測できない。肝では、Child-Turcotte-Pugh スコアリングシステムなどの合併症のリスク、生命予後を予測したり、患骨髄異形成症候群では、高齢、血小板減少、貧血等により、予後不良である患者を識別するスコアリングシステムが運用されているが、CKD においては予後予測のためのこのようなシステムがない。新たな病態形成に關与するマーカー分子の尿中での測定と、現在用いられている尿タンパク量、GFR、年齢、治療内容、血圧などと組み合わせた複合マーカーによって、長期の経過をたどる CKD 患者の予後予測を随時可能とするスコアリングシステムが求められていた。

## 2. 研究の目的

生活習慣の多様化にともない腎臓病の病態も複雑化し、肥満・高血圧・糖尿病・脂質異常症・高尿酸血症をあわせもつ慢性腎臓病患者も多い。さらに、年齢・治療法・疾患活動性などもさまざまである。腎生検で診断を得た後も、これら多くの要因の変化により、その予後は変化しうる。したがって、尿タンパク量・腎機能・血圧など既存のリスクファクターに加えて、非侵襲的に得られ病態をリアルタイムに反映する尿

中バイオマーカーを合わせて、長期的に慢性腎臓病患者の末期腎不全ないしは心血管事故、さらには死亡などの予後を予測するスコアリングシステムを樹立する。

## 3. 研究の方法

腎機能低下は、原疾患の種類と活動性・進行度、また患者の年齢・性別をはじめ、食事・体重・治療薬剤などの影響も重要である。生活習慣病としての肥満・高血圧・糖尿病・脂質異常症・高尿酸血症をあわせもつ慢性腎臓病患者も多く、その予後は多様で複雑である。こうした多因子が腎・心血管事故・生命予後に及ぼす影響を評価するために、部位別に腎障害の程度を反映する尿中バイオマーカーを選定し、それらの簡易尿中バイオマーカー測定法を確立する。また、一方で、さまざまな CKD 患者の尿・腎組織サンプルのバンク化をすすめる。その上で、尿中バイオマーカータンパクの経時的な評価とパネル化を樹立するとともに、CKD 治療の結果を用いた治療過程におけるバイオマーカーの測定・解析を行い、分子病態の変化として、各腎疾患をとらえる礎を築く。

## 4. 研究成果

### (1) 尿中バイオマーカーの選定および経時的な評価とパネル化

これまでに行った、ネフローゼ症候群、腎不全、糸球体腎炎、ループス腎炎などの尿サンプルを用いたエクソソーム解析により、候補分子となっている Nephritin、Podocin、CD2AP (CD2 associated protein)、Tpmg、Afadin、Synaptopodin などのポドサイトの特異的な分子、メサンギウム障害のマーカーである Smad1、尿管障害に対して Snail、AQP2 などの CKD 患者尿での発現の有無を Western

blot によって確認した。また、CKD 患者の腎生検組織において、これらタンパク質の発現部位を免疫組織学的解析によって原疾患ごとに特定し、腎予後の悪化に連動して発現量の変化する分子群を特定し、ELISA などを用いた測定システム樹立を行った。

#### (2) 簡易尿中バイオマーカー測定法の確立

外来の随時尿などの少量 (10-20ml) の尿を用いた簡便かつ迅速な測定法として、尿の採取法・保存法・添加するプロテアーゼの選択、測定にもちいる抗体量の調整などの最適化を行い、従来法で得られたサンプルとの比較によっても、エクソゾーム内のタンパク発現に差異がないことを確認した。

#### (3) 各種腎疾患患者の尿・腎組織サンプルのバンク化ならびに CKD 治療の結果を用いた治療過程におけるバイオマーカーの測定・解析

腎生検により、確定診断の得られた腎疾患患者尿サンプルのバンク化、ならびにその背景となる臨床データを匿名化・バンク化を行い、腎生検にて得られた病理組織学的な病期、重症度、活動性と、各マーカー候補分子の組織内での発現量との相関を解析した。病勢・治療内容・治療への反応性などを反映するマーカーの同定を進め、尿タンパク、尿潜血、腎機能、糸球体内圧上昇など、腎構成細胞障害を反映するマーカーの特定を行った。特に、糸球体上皮細胞である podocyte 由来の podocyte-derived signal transduction factors (PDSTFs) の発見により、腎機能低下を早期に予測する尿中マーカーを同定し、ヒト各種腎障害において、3 年後の腎機能低下を予測しうることを統計学的に示すことができた。個々の CKD 患者に適応可能な尿中バイオマーカーパネルの基盤を作成できた。

#### 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 2 件)

Dual involvement of growth arrest-specific gene 6 in the early phase of human IgA nephropathy.

Nagai K, Miyoshi M, Kake T, Fukushima N, Matsuura M, Shibata E, Yamada S, Yoshikawa K, Kanayama HO, Fukawa T, Yamaguchi K, Izaki H, Mima A, Abe N, Araoka T, Murakami T, Kishi F, Kishi S, Tominaga T, Moriya T, Abe H, Doi T.

PLoS One. 2013 Jun 24;8(6):e66759. . doi: 10.1371/journal.pone.0066759、査読有

Scleraxis modulates bone morphogenetic protein 4 (BMP4)-Smad1-smooth muscle actin (SMA) signal transduction in diabetic nephropathy.

Abe H, Tominaga T, Matsubara T, Abe N, Kishi S, Nagai K, Murakami T, Araoka T, Doi T.

J Biol Chem. 2012; 287(24):20430-20442、査読有

[学会発表](計 3 件)

Multiple regulatory pathways of BMP-Smad axis through a sclerosis-specific basic HLH transcription factor in diabetic nephropathy

Yui Fujita, Akiko Sakurai, Tatsuya Tominaga, Sanae Hayashi, Naoko Abe, Toshio Doi, Hideharu Abe

第 86 回日本生化学会大会

2013.9.11-13 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

腎機能低下予測バイオマーカーとしての

ポドサイト由来エクソソーム内転写因子

安部尚子、安部秀斉、土井俊夫

第 53 回 日本臨床化学会年次学術集会

2013.8.30-9.1 あわぎんホール(徳島県 徳島市)

Predictive biomarkers for kidney function declines: podocyte-derived exosomal transcriptional factors

安部尚子、林早苗、土井俊夫、安部秀斉

第 35 回 日本分子生物学会年会

2012.12.11-14 福岡国際会議場・マリメッセ福岡(福岡県 福岡市)

〔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

<http://www.tokudai-kidney.jp/achievements/index.htm>

t/index.htm

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安部 尚子 (ABE, Naoko)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号: 70623271

### (2) 研究分担者

土井 俊夫 (DOI, Toshio)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号: 60183498

### (3) 連携研究者

なし