

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791038

研究課題名(和文)尿沈渣中の炎症関連分子mRNA発現パターンによる腎系球体病変診断法の開発

研究課題名(英文)Measurement of mRNA pattern of inflammatory functional molecules in urinary sediment

研究代表者

敦賀 和志(TSURUGA, KAZUSHI)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助手

研究者番号：80587014

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)：ウイルス感染症が病勢悪化や発症の機転となり得るIgA免疫複合体関連腎炎(IgA腎症、紫斑病性腎炎)患者から得られた尿沈渣細胞を用いて炎症関連分子群のmRNAの発現を検討した。一部症例の尿沈渣をマイクロアレイにより網羅的なmRNA発現の解析を行った。非炎症性腎疾患に比べ腎炎群ではRIG-I, CCL5, FKN, MCP-1の発現は高値でありFKNは腎組織の急性化・慢性化スコアとの有意な相関が確認された。腎組織の重症例ほどこれら分子群がメサンギウム細胞での染色性が強い傾向が確認された。尿沈渣に発現する炎症関連分子群 mRNA発現の測定は、将来的に腎疾患の非侵襲的な病勢評価につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Viral infections may trigger the onset and worsening of inflammatory conditions of some glomerulonephritis (GN). We examined mRNA expressions of proinflammatory chemokines in urinary sediment from patients with IgAN and PN. Expression retinoic acid inducible-gene 1 (RIG-I), cc chemokine ligand 5 (CCL5), fractalkine (FKN), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) were higher IgAN compared to non-inflammatory renal disease. Moreover, we observed a significant correlation between the expression of FKN and histologically grades of acute and chronic scores. Intense glomerular FKN expression was observed in biopsy specimens from patients with high activity scores. Although further studies are needed, these preliminary observations suggested that measurement of mRNA expressions of proinflammatory chemokines, such as FKN, in urinary sediment could be used as a non-invasive method for predicting the disease activity of GN.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学小児科学

キーワード：小児腎・泌尿器科学 尿沈渣細胞

1. 研究開始当初の背景

多くの腎系球体疾患の病因の解明は未だ不十分であるが、IgA 腎症 (IgAN) やループス腎炎 (LN) などの免疫複合体沈着型腎炎はウイルス感染や自己抗原への暴露を契機として発症・悪化することから、自然免疫系との関わりが想定される。これらの腎疾患では Toll-like receptors (TLRs) の活性化を起点とし、腎組織局所での炎症性サイトカイン産生が重要な役割を担っているが、その背景には Th1/Th2 バランスの不均衡も存在すると想定される。これまで申請者らのグループでは培養ヒトメサングウム細胞での TLR3 の活性化を起点とし各種炎症性ケモカイン発現に至る経路群の解明、IgAN や IgAN 関連腎炎である紫斑病性腎炎 (PN) 患者から得られた尿沈渣細胞での Th1/Th2 バランスに関する T-bet mRNA の発現亢進、慢性腎炎症候群における尿上清での炎症性ケモカインタンパクの検討、ループス腎炎 (LN) における尿沈渣細胞での retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-1) の mRNA 発現亢進などを継続して検討し報告してきている。これまでの研究成果から、尿沈渣細胞中の炎症関連遺伝子群の発現は腎病変と相関する可能性があり、これを検討することが有望な非侵襲的検査法の開発へつながるとの感触が得られた。

2. 研究の目的

尿沈渣細胞での炎症関連遺伝子群の絞り込みの足掛かりとするために、TLR3 の活性化を契機とする炎症性ケモカイン発現が病態に関与すると想定され、かつ診療頻度の高い IgAN・PN・LN を対象としてコントロール群と比較し、炎症に関与する遺伝子群の発現傾向をマイクロアレイ法で網羅的に検討する。

その結果をもとに、各疾患群に特徴的な変動を示した候補遺伝子群をリアルタイム PCR 法で比較検討し、疾患における病態を反映する遺伝子発現の傾向を検討する。さらに、一

部の代表的症例では時間的経過を追い、治療前・後、再燃時などの変化を検討し、検体採取時に腎生検が可能であった症例については、その病理所見と尿沈渣からの遺伝子群発現との相関を検討する。得られた成果から、将来的に尿沈渣細胞の遺伝子群発現を検索することで、腎生検という侵襲的検査を最低限の施行にとどめることが可能となるような、患者サイドに立った有益な検査法の開発につながる足掛かりを得る。

3. 研究の方法

(1) 尿沈渣細胞を用いた mRNA 発現の解析：腎生検目的で当科へ入院した患者を中心に早朝尿を採取。尿沈渣細胞中の T-bet, GATA3, FOXP3, RIG-1 の mRNA 発現を検討する。具体的には、尿検体を 3000 G, 30 分遠心後の沈渣細胞を RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Canada) を用い total RNA を抽出。さらに iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories) を用いて cDNA を制作しマイナス 80 で保存した。リアルタイム PCR は Chromo4 (Bio-Rad Laboratories) を使用し、それぞれの対応 primer (Forward, Reverse) を用いて施行した。

(2) 慢性腎炎患者における治療経過による mRNA 発現の検討：当科で加療中の慢性腎炎症候群患者の尿沈渣を経時的 (治療開始前、治療開始直後、安定期、増悪期など) に調査し、その遺伝子発現を比較・検討した。また腎生検を行ったものに関しては、組織所見との相関が見られるか検討した。

(3) 病理所見との相関を検討：腎生検によって得られた組織を評価した。それぞれの疾患により、Grade 分類、急性化病変、慢性化病変、間質病変について評価をし、尿沈渣の結果との相関を検討した。尿沈渣 mRNA で発現の高かった遺伝子について、凍結標本を蛍光抗体法によってその局在と程度を検討した。

(4) 腎炎患者の尿沈渣細胞から：マイクロア

レイ法による遺伝子発現の比較・検討：炎症に関する他の遺伝子発現の傾向をマイクロアレイ(外部委託)により疾患特性を検討し、得られた情報を基に、それまで得られた検体を中心に遺伝子発現を調査した。

4. 研究成果

(1) 非炎症性腎疾患(菲薄基底膜病, Nutcracker 症候群)を対照として IgAN, PN から得られた尿沈渣細胞 mRNA の発現は RIG-I, CCL5, FKN, MCP-1 が腎炎群で有意に高値であった。これらの中で腎組織スコアと有意な相関を示すのは FKN であった。一方、他の分子群はいずれも臨床検査項目の尿蛋白, 尿潜血, 血清総蛋白, 血清アルブミン, 血液尿素窒素, 血清クレアチニンや腎組織スコアとの有意な相関はみられなかった。検討症例数が少ないこと, IgAN では尿蛋白量も少なく比較的軽症例が多かったこと, 発症から検体採取までの期間が一定でないことなどが結果に影響した可能性が想定された。発現の高かった RIG-I, CCL5, FKN, MCP-1 について蛍光抗体法による組織染色を行った結果, IgAN, PN いずれも疾患活動性の高いものほどより強い染色性が確認された。

(2) IgAN, PN, 非炎症性腎疾患で FKN と MCP-1 について尿沈渣での mRNA 発現と尿上清でのタンパクの発現を同時に測定したが, 検討数が少なかったため有意な相関は確認されなかった。

(3) 代表的症例の尿沈渣細胞を用いマイクロアレイにより炎症関連分子群発現の傾向を解析した。非炎症性疾患群と IgAN の比較では, これまでの実験で発現が高値であった分子について, T-bet 1.41x, RIG-I 0.5x, FKN 1.25x, MCP-1 0.99x であった。この他に Fibronectin 1, Myosin XVIII B, Ret finger protein-like 4A などの発現が高値であった。PN では T-bet 2.20x RIG-I 0.39x FKN 0.31x, MCP-1 0.21x であった。Girdin, Sperm protein

associated with the nucleus, CC chemokine receptor type 2 などの発現が高値であった。

(4) 尿沈渣に発現するウイルス感染で誘導される FKN に代表される炎症関連分子群 mRNA 発現の測定は, 将来的に腎疾患の非侵襲的な病勢評価につながる候補となる可能性が示唆された。尿沈渣中には多彩な分子群を様々なレベルで発現しており, IgA 免疫複合体腎炎間や病期によりその発現は異なる可能性が高い。

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 11 件)

1. Imaizumi T, Aizawa T, Hayakari R, Xing F, Meng P, Tsuruga K, Matsumiya T, Yoshida H, Wang L, Tatsuta T, Tanaka H. Tumor necrosis factor- α synergistically enhances polyinosinic-polycytidylic acid-induced toll-like receptor 3 signaling in cultured normal human mesangial cells: possible involvement in the pathogenesis of lupus nephritis. Clin Exp Nephrol (査読有), 10.1007/s10157-014-0956-3 (online ahead of print), 2014
2. Tanaka H, Aizawa T, Watanabe S, Oki E, Tsuruga K, Imaizumi T. Efficacy of mizoribine-tacrolimus-based induction therapy for pediatric lupus nephritis. Lupus (査読有), doi:10.1177/0961203314528553 (online ahead of print), 2014
3. Aizawa T, Imaizumi T, Tsuruga K, Watanabe S, Chiba Y, Matsumiya T, Yoshida H, Tanaka H. Mizoribine selectively attenuates monocyte chemoattractant protein-1 production in cultured human glomerular mesangial cell: A possible benefit of its use

- in the treatment of lupus nephritis. *Nephrology (Carlton)* (査読有), 19, 47-52, 2014
4. Aizawa T, Imaizumi T, Tsuruga K, Watanabe S, Kumagai N, Yuki Chiba, Yoshida H, Ito E, Tanaka H. Urinary fractalkine and monocyte chemoattractant protein-1 as possible predictors of disease activity of childhood glomerulonephritis. *Tohoku J Exp Med* (査読有), 231, 265-270, 2013
 5. Watanabe S, Imaizumi T, Tsuruga K, Aizawa T, Ito T, Matsumiya T, Yoshida H, Ito E, Tanaka H. Glomerular expression of myxovirus resistance protein 1 (Mx1) in human mesangial cells: possible activation of innate immunity in the pathogenesis of lupus nephritis. *Nephrology (Carlton)* (査読有), 18, 833-837, 2013
 6. 敦賀和志, 田中 完. IgA 免疫複合体沈着型腎炎症候群の尿沈渣細胞から得られる炎症関連分子群 mRNA の検討: ”ウイルス感染”と病態との関わりから. *日本小児腎臓病学会雑誌* (査読有), 26, 245-249, 2013
 7. Imaizumi T, Aizawa-Yashiro T, Watanabe S, Matsumiya T, Yoshida H, Tatsuta T, Xing F, Meng P, Hayakari R, Tsuruga K, Tanaka H. TLR4 signaling induces retinoic acid inducible gene-1 and melanoma differentiation-associated gene 5 in mesangial cells. *J Nephrol* (査読有), 26, 886-893, 2013
 8. Imaizumi T, Aizawa-Yashiro T, Matsumiya T, Yoshida H, Watanabe S, Tsuruga K, Tatsuta T, Xing F, Hayakari R, Meng P, Tanaka H. Interaction between interferon-stimulated gene 56 and melanoma differentiation-associated gene 5 in toll-like receptor 3 signaling in normal human mesangial cells. *Am J Nephrol* (査読有), 37, 118-125, 2013
 9. Aizawa-Yashiro T, Imaizumi T, Tsuruga K, Watanabe S, Matsumiya T, Hayakari R, Yoshida H, Satoh K, Ito E, Tanaka H. Glomerular expression of fractalkine is induced by polyinosinic-polycytidylic acid in human mesangial cells: possible involvement of fractalkine after viral infection. *Pediatr Res* (査読有), 73, 180-186, 2013
 10. Tanaka H, Watanabe S, Aizawa-Yashiro T, Oki E, Kumagai N, Tsuruga K, Ito E. Long-term tacrolimus-based immunosuppressive treatment for young patients with lupus nephritis: a prospective study in daily clinical practice. *Nephron Clin Pract* (査読有), 121, c165-c173, 2012
 11. Imaizumi T, Aizawa-Yashiro T, Tsuruga K, Tanaka H, Matsumiya T, Yoshida H, Tatsuta T, Xing F, Hayakari R, Satoh K. Melanoma differentiation-associated gene 5 regulates the expression of a chemokine CXCL10 in human mesangial cells: implications for chronic inflammatory renal diseases. *Tohoku J Exp Med* (査読有), 228, 17-26, 2012
- [学会発表](計 2件)
1. 敦賀和志, IgA 免疫複合体沈着型腎炎症候群の尿沈渣細胞から得られる炎症関連分子群 mRNA の検討: ウイルス感染と病態との関わり, 第 48 回小児腎臓病学会, 2013 年 6 月 28- 29 日, 徳島市
 2. 敦賀和志, IgA 免疫複合体沈着型腎炎症候群の尿沈渣細胞から得られる炎症関連分子群 mRNA の検討: ウイルス感染と病態との関わり, 第 23 回東北小児腎臓病研究会, 2013 年 3 月 9 日, 新潟市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

敦賀 和志 (TSURUGA KAZUSHI)

弘前大学・大学院医学研究科・助手

研究者番号：80587014