

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461222

研究課題名(和文)慢性腎臓病における心腎連関を早期診断・モニタリングする新規バイオマーカーの確立

研究課題名(英文) Identification of novel biomarkers for early diagnosis and monitoring of cardio-renal syndrome in chronic kidney disease

研究代表者

鈴木 康弘 (Suzuki, Yasuhiro)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：20584676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：CKDにおける心腎連関を反映する新規バイオマーカーを探索した。CKD動物モデル組織検体からメタボローム解析法により線維化などの心病変を反映する候補物質を同定。大動脈縮窄モデルなど複数のモデルで血清中にこの候補物質が上昇することを同定した。また候補物質の代謝経路を解析するために線維芽細胞において刺激実験をおこない、候補物質の動態を検討した。さらに候補物質を、当院にて腹膜透析施行中の患者血清で測定。心エコー検査における心肥大所見と有意に相関( $P=0.001$ ,  $R^2=0.25$ )することを確認した。以上の実験を通して心線維化を早期から同定し、その進行を反映するバイオマーカーを同定できた。

研究成果の概要(英文)：We searched new biomarkers of cardio-renal syndrome in a mouse model with CKD. Some possible candidate substances reflecting CKD-related pathogenic changes in heart such as fibrosis were identified by metabolomics. The candidate substances were confirmed other animal models and in vitro experiments with a rat fibroblast cell line. When we also investigated serum candidate substances and echocardiography examinations in patients on peritoneal dialysis at our hospital, a significant correlation between the candidate substances and cardiac hypertrophy indicators were observed ( $P = 0.001$ ,  $R^2 = 0.25$ ). It was suggested that some of our identified substances might play roles as new biomarkers to predict progress of cardiac fibrosis in patients with CKD.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：CKD 心腎連関 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)は1200万人を超えるといわれ、国民病といっても過言ではない。そして腎障害の進行と並行して心血管病による死亡率が上昇し、透析患者でも死因の1位は心不全と、CKD患者の予後を規定する最重要因子は心臓病である(心腎連関)。しかし、現在までに心臓病を早期発見・モニタリングできる簡便で適切なバイオマーカーは未だ存在しない。

CKD患者において炎症が線維化を誘導すると考えられており、炎症自体も生命および心血管病の予後規定因子となることが知られている。我々も血液透析導入時の炎症マーカーが予後規定因子であることを報告した(Am J Nephrol 2012)。また、腹膜透析導入時の腎不全患者腹膜組織の解析で、腎不全ではマクロファージ浸潤が強く、腎不全に伴う臓器局所の炎症が腹膜にみられることをヒトで初めて証明した(Nephrol Dial Transplant 2012)。

また、我々はCKDにおける食塩摂取と炎症・線維化に着目し、5/6腎摘腎不全動物モデルに食塩負荷を行うことで、諸臓器の炎症性変化とともに、心臓線維化が進むモデルを初めて確立した(Lab Invest 2017)。この食塩負荷腎不全モデルにおいて、心臓など多臓器に炎症を伴い、心臓線維化・心肥大へと進行していくCKD患者の臨床像に近い病像を呈していると思われ、本研究の検討に合致するモデルと考え、研究を進めることとした。

## 2. 研究の目的

本研究は心腎連関に着目し、CKDにおける心臓病の発症や進行をモニタリング可能な新規のバイオマーカーを探索することを目的とした。そのための手法として、生体分析技術として極めて有用とされるメタボローム解析法を用い、心腎連関を反映する代謝物を網羅的に検索。候補物質の中から有用なものを選択し、心筋代謝面からバイオマーカーとして同定することで、CKD、HD患者にとって最重要な心臓線維化、心肥大を鋭敏に反映する新規バイオマーカーを開発することを目的とした。また、この研究でCKDに伴う臓器障害進展のメカニズムを解明し、最終的にはCKD患者の生命予後を改善することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) CKD動物モデルにおいてメタボローム解析を用いて心筋における代謝面から心臓障害特に心臓線維化をモニタリングできる新たなバイオマーカーの候補物質を探索した。具体的にはマウス5/6腎摘モデルを用いて、食塩水負荷の有無で、それぞれ4病期(0,2,4,8週)において心臓、大動脈、腹膜、皮膚、肝臓など各臓器から検体を採取し、各

組織における炎症や線維化を評価(免疫染色、リアルタイムPCR)。得られた検体を用いてメタボローム解析を行った。メタボローム解析は、その世界的権威である曽我朋義教授率いる世界最大のメタボロームセンター、慶應大学先端生命科学研究センターとの共同研究により実施した。このメタボローム解析によって得られた血清中の候補物質濃度と組織病変との相関を下記の項目において検討した。

候補物質との関連性を評価する項目

血液検査 (IL-6, TNF- 等)

血圧、心重量

免疫組織化学 (F4/80, CD68, ER-HR3, シリウスレッド, iNOS, CCR2, CD163, CD206等)

real time PCR(IL-6, MCP-1, TGF- $\beta$ , Sgk1, Nox-2, Nox-4, Gsr等)

(2) 心臓線維化に対し、Eplelenoneを用いて抑制実験を行い、心臓線維化の改善とともに、得られた候補物質の発現が減少するか検討した。

(3) 同定した候補物質において、アデニン負荷腎不全モデル、大動脈縮窄モデル、プレオマイシン投与モデルなどを用いて線維化・炎症との相関をさらに詳細に検討・確認し、バイオマーカーとして適正かどうか検証実験(バリデーションスタディ)を行った。

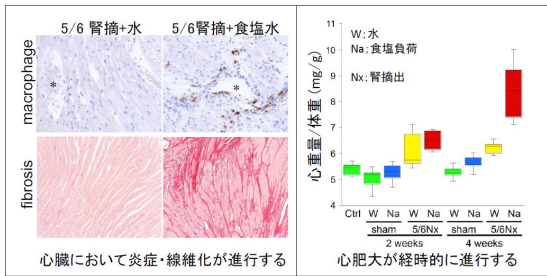
(4) 同定した候補物質の合成、分解など代謝経路の解析をするためにNRK-49F cellにて候補物質合成酵素阻害剤投与後にメタボローム解析を施行。バイオマーカー候補物質の生成、分解などの動態、および機能的役割などについて検討した。

(5) 同定した候補物質をCKD患者臨床検体へ応用し、バイオマーカーとしての有用性の臨床的評価をおこなった。当院にて腹膜透析施行中の患者血清で測定(n=53、平均年齢58.6歳、DM33.3%)。心臓病との相関を検討するために6カ月ごとに測定している心エコー検査のLVmass、心拡張障害指標(E/E')との相関を検討した。この研究を通して実臨床における心腎連関の新たなバイオマーカーとなるか、検討した。

尚、臨床研究に関しては、名古屋大学倫理委員会より承認を得ておこなった(承認番号1223)。

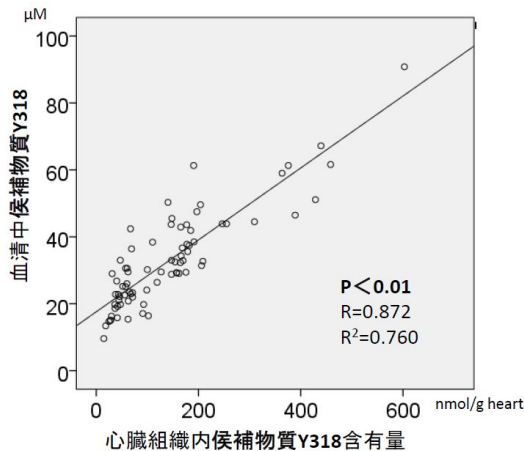
## 4. 研究成果

(1) 5/6腎摘モデルに塩負荷の有無で組織変化を比較検討し、腎不全モデルに食塩負荷をすることで4w、8wモデルにおいて、心重量増加、病理組織学的検討にて心臓線維化をみると、心肥大が進行することを確認した(図1)。

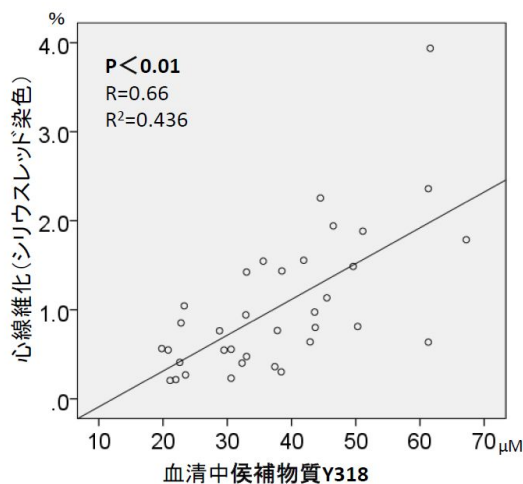


**図1 腎不全+食塩負荷モデル**

得られた組織検体、血清検体を用いてメタボローム解析を行い、573種の代謝物質の中から、心臓重量・線維化を反映し、モニタリングに適すると考えられるバイオマーカーの候補2物質(S311 MW=219, Y318 MW=131)を抽出することに成功した。さらにこの候補物質Y318は、マウス血清中と心臓組織内濃度が相関し(図2)、心筋線維化とも相関することを確認した(図3)。



**図2 マウス血清中と心臓組織内 Y318 濃度は相関する**



**図3 マウス血清中 Y318 濃度と心臓線維化とも相関する**

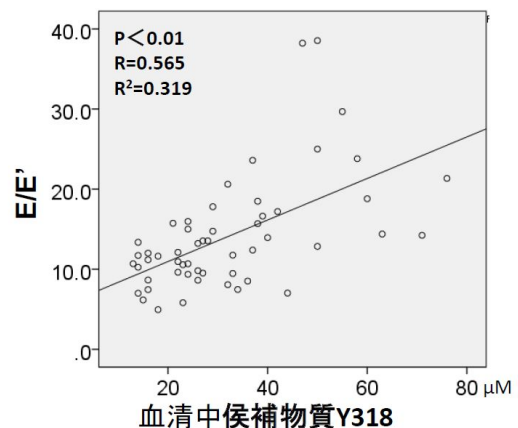
(2) Eplerenone を用いて心線維化の抑制実験を行い、心肥大が抑制されていることを確認した。この心臓組織検体および血清において

メタボローム解析を施行し、血清中の候補物質 Y318 が減少し、その前駆物質も減少していることを確認した。以上より Y318 は心臓線維化を反映するバイオマーカーとなりうることを確認できた。

(3) さらに、アデニン負荷腎不全モデル、大動脈縮窄モデルを用いて心線維化を誘導後に、同様にメタボローム解析した。アデニンモデルにおいても心線維化が進行しており、血清中候補物質濃度は上昇していた。大動脈縮窄モデルは腎機能が正常のため尿中の候補物質濃度も検討したところ、血中より速やかに尿中に上昇することを確認できた。プレオマイシン投与モデルを用いて皮膚線維化を誘導後に、同様に血清、尿においてメタボローム解析し、候補物質が上昇することを確認した。以上の実験で異なる線維化モデルにおいてもバイオマーカーとなることを確認した。

(4) 候補物質 Y318 で、候補物質の代謝経路(合成、分解)を解析するために線維芽細胞である NRK-49F cell にて Y318 合成酵素阻害剤投与後に細胞を抽出し、メタボローム解析を施行した。候補物質上流と思われる蛋白の発現が上昇しており、代謝経路を確認、同定した。

(5) 当院にて腹膜透析施行中の患者 (n=53、平均年齢 58.6 歳、DM33.3%)において同意をえたのち血清を採取し、候補物質を測定。日常臨床において定期的に施行している心エコー検査の所見から、LVmass、心拡張障害指標(E/E')を抽出し、それらの相関を確認した。血中 Y318 濃度は心エコー所見の心拡張障害所見と有意に相関することを確認できた(図4)。



**図4 ヒト血清中 Y318 濃度は拡張障害(E/E')と相関する**

以上の研究を通して、心線維化を早期からモニターできる新たなバイオマーカーの候補物質を同定、臨床的有用性の評価をおこない、その有用性と意義を同定できた。

今後さらに大規模なCKDコホートで候補物質と心血管系合併症、生命予後との相関を確認し、最終的に心腎連関の新たなバイオマーカーとして確立することを目標としている。

〔引用文献〕

Takahashi R, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, et al.

Combined values of serum albumin, C-reactive protein and body mass index at dialysis initiation accurately predicts long-term mortality.

Am J Nephrol. 2012;36(2):136-43.

Sawai A, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, et al. Peritoneal macrophage infiltration is correlated with baseline peritoneal solute transport rate in peritoneal dialysis patients.

Nephrol Dial Transplant. 2011;26(7):2322-32.

#### 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15件)(すべて査読あり)

Sakata F, Ito Y, Mizuno M, Sawai A, Suzuki Y(16名中5番目)et al.

Sodium chloride promotes tissue inflammation via osmotic stimuli in subtotal-nephrectomized mice.

Lab Invest. 2017; 97:432-446

DOI: 10.1038/labinvest.2017.4.

Mizuno M, Suzuki Y, (11名中2番目)

Higashide K, Sei Y, Iguchi D, Sakata F, Ito Y. et al.

High Levels of Soluble C5b-9 Complex in Dialysis Fluid May Predict Poor Prognosis in Peritonitis in Peritoneal Dialysis Patients.

PLoS One. 2017; 3;12(1):e0169111

DOI: 10.1371/journal.pone.0169111.

Tawada M, Ito Y, Hamada C, Honda K, Mizuno M, Suzuki Y, (13名中6番目) Sakata F. et al.

Vascular Endothelial Cell Injury Is an Important Factor in the Development of Encapsulating Peritoneal Sclerosis in Long-Term Peritoneal Dialysis Patients.

PLoS One. 2016; 27;11(4):e0154644

DOI: 10.1371/journal.pone.0154644.

Mizuno M, Ito Y, Suzuki Y, (21名中3番目) Sakata F, Saka Y, Hiramatsu T, Tamai H, Mizutani M. et al.

Recent analysis of status and outcomes of peritoneal dialysis in the Tokai area of Japan: the second report of the Tokai peritoneal dialysis registry.

Clin Exp Nephrol. 2016;20(6):960-971

DOI: 10.1007/s10157-016-1249-9

伊藤恭彦, 水野正司, 鈴木康弘, 清祐実, 坂田史子, 丸山彰一

高齢者の腹膜透析-assisted PDの現実と可能性

臨床透析 2016;32(10): 1230-1236

<http://www.nmckk.jp//thesisDetail.php?category=JJCD&vol=32&no=10&d1=1&d2=0&d3=0&lang=ja>

Tanaka A, Katsuno T, Ozaki T, Sakata F, Kato N, Suzuki Y, (15名中6番目)Kosugi T, Kato S, Tsuboi N, Yasuda Y, Mizuno M, Ito Y. et al.

The efficacy of tolvaptan as a diuretic for chronic kidney disease patients.

Acta Cardiol. 2015;70(2):217-23.

DOI: 10.2143/AC.70.2.3073514

Terabayashi T, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, (14名中4番目) Kinashi H, Sakata F. et al.

Vascular endothelial growth factor receptor-3 is a novel target to improve net ultrafiltration in methylglyoxal-induced peritoneal injury.

Lab Invest. 2015 Sep;95(9):1029-43.

DOI: 10.1038/labinvest.2015.87.

Tanaka A, Mizuno M, Suzuki Y, Oshima H, Sakata F, Ishikawa H, Tsukushi S, Ito Y. et al.

Calcified amorphous tumor in the left atrium in a patient on long-term peritoneal dialysis.

Intern Med. 2015;54(5):481-5.

DOI:10.2169/internalmedicine.54.2967.

Sei Y, Mizuno M, Suzuki Y, Imai M, Higashide K, Harris CL, Sakata F, Iguchi D, Fujiwara M, Kodera Y, Maruyama S, Matsuo S, Ito Y.

Expression of membrane complement regulators, CD46, CD55 and CD59, in mesothelial cells of patients on peritoneal dialysis therapy.

Mol Immunol. 2015;65(2):302-9.

DOI: 10.1016/j.molimm.2015.02.005.

Mizuno M, Suzuki Y, Ito Y.

Future expectations of diagnostic approaches for treating endogenous peritonitis in patients on peritoneal dialysis.

Intern Med. 2014;53(6):647.

DOI: 10.2169/internalmedicine.53.1827

Kim H, Mizuno M, Furuhashi K, Katsuno T,

Ozaki T, Yasuda K, Tsuboi N, Sato W, Suzuki Y, Matsuo S, Ito Y, Maruyama S.  
Rat adipose tissue-derived stem cells attenuate peritoneal injuries in rat zymosan-induced peritonitis accompanied by complement activation. Cytotherapy. 2014;16(3):357-68.  
DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.10.011.

Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, (14名中3番目) Tamai H, Hiramatsu T, Ohashi H, Ito I et al; Nagoya Spiro Study Group. et al. Long-term effects of spironolactone in peritoneal dialysis patients. J Am Soc Nephrol. 2014;25(5):1094-102.  
DOI: 10.1681/ASN.2013030273.

伊藤恭彦、鬼無 洋、水野正司、鈴木康弘、坂田史子、寺林 武、松尾清一  
リンパ管新生の腹膜透析除水不全における役割について  
日本透析医会雑誌 2014 29(1) 138-143  
<http://www.touseki-ikai.or.jp/>

〔学会発表〕(計 49 件)

Ito Y, Tawada M, Hamada C, Mizuno M, Suzuki Y, Sakata F, Maruyama S  
Neutral peritoneal dialysis solutions reduce morphological damages in the patients with long-term peritoneal membrane treatment  
the 8th Asia Pacific Chapter Meeting of International Society for Peritoneal Dialysis 2017.3.22-25 Guangzhou, China

狩谷哲芳、伊藤恭彦、水野正司、鈴木康弘、坂田史子、丸山彰一、松尾清一  
腹膜透析の腹膜線維症における血管新生と TGF- $\beta$ 1-VEGF-A pathway の検討  
第 22 回日本腹膜透析医学会学術集会・総会 2016.9.24 札幌プリンスホテル(北海道札幌市)

T Tomita, Y Ito, K Kitada, M Mizuno, Y Suzuki, F Sakata, et al.  
Apoptosis inhibitor of macrophage protein ameliorates fungus-induced peritoneal injury in mice by upregulation of clearance of necrotic debris.  
53RD ERA-EDTA CONGRESS  
2016.5.21-24 Vienna, Austria

Suzuki Y, Mizuno M, Sakata H, Katsuno T, Tsuboi N, Maruyama S, Matsuo S, Ito Y

Combined bacterial culture methods improved culture-negative findings of CAPD-related peritonitis  
The 16th Congress of the International Society for Peritoneal Dialysis  
2016.2.27-3.1 Melbourne, Australia

鈴木康弘、坂田史子、小杉智規、坪井直毅、水野正司、丸山彰一、伊藤恭彦  
CAPD 関連腹膜炎における培養法と起因菌検出率の検討  
第 21 回 日本腹膜透析医学会 学術集会・総会 2015.11.28 仙台国際センター(宮城県仙台市)

鈴木康弘、水野正司、坂田史子、小杉智規、坪井直毅、丸山彰一、伊藤恭彦  
高齢患者用指導ツールを作成し、訪問看護も利用しながら PD を導入しえた独居高齢患者の一例  
第 21 回 日本腹膜透析医学会 学術集会・総会 2015.11.28 仙台国際センター(宮城県仙台市)

F Sakata, Y Ito, M Mizuno, Y Suzuki, T Terabayashi, T Tomita, et al.  
Sodium Chloride Promotes Tissue Inflammation via Osmotic Stimuli in Subtotal Nephrectomized Mice.  
48th Annual Meeting of the American Society of Nephrology  
2015.11.3-8 San Diego, USA.

鈴木康弘、坂田史子、坪井直毅、水野正司、丸山彰一、伊藤恭彦、松尾清一  
頻回な血小板輸血を要する重症再生不良性貧血患者に腹膜透析を導入した一例  
第 51 回日本透析医学会学術集会・総会 2015.6.26 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

鈴木康弘、寺林 武、坂田史子、坪井直毅、水野正司、丸山彰一、伊藤恭彦  
排液中 TGF- $\beta$ 1 蛋白濃度は腹膜組織線維化、腹膜機能低下を反映する  
第 58 回 日本腎臓学会学術総会 2015.6.5 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

鈴木康弘、坂田史子、坪井直毅、水野正司、丸山彰一、伊藤恭彦、松尾清一  
在宅医療・介護と連携して PD 管理が可能になった高齢患者の一例  
第 20 回 日本腹膜透析医学会 学術集会・総会 2014.9.6 山形国際ホテル(山形県山形市)

鈴木康弘、水野正司、坂田史子、坪井直毅、丸山彰一、松尾清一、伊藤恭彦  
腹膜透析患者における C.E.R.A. 投与量に関連する因子の検討  
第 50 回日本透析医学会学術集会  
2014.6.13-15 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Suzuki Y, Mizuno M, Sakata H, Kinashi H, Maruyama S, Matsuo S, Ito Y  
Analysis of factors associated with the dose of continuous erythropoietin receptor activator (C.E.R.A.) in PD patients.  
The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology 2014.5.16 品川プリンスホテル(東京都港区)

〔図書〕(計1件)

鈴木康弘、伊藤恭彦  
限外濾過不全の病態生理 (aquaporin, fibrosis, EMT など)  
腎と透析 2017 年 1 月号, 172 ページ  
(P135-139)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 康弘 (Suzuki, Yasuhiro)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教  
研究者番号：20584676

### (2) 研究分担者

水野 正司 (Mizuno, Masashi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授  
研究者番号：20303638

### (3) 研究研究者

坂田 史子 (Sakata, Fumiko)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号：20726484

### (4) 研究分担者

伊藤 恭彦 (Ito, Yasuhiko)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授  
研究者番号：60402632

### (5) 研究分担者

松尾 清一 (Matsuo, Seiichi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：70190410  
(平成 26 年度)