

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：83104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09723

研究課題名(和文) 早期CKDを見逃さない尿検査の確立

研究課題名(英文) Search for new urinary biomarkers to detect early stage of CKD

研究代表者

藤中 秀彦 (Fujinaka, Hidehiko)

独立行政法人国立病院機構新潟病院(臨床研究部)・臨床研究部・臨床研究部長

研究者番号：20447642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎障害の新規尿バイオマーカー候補として98個の蛋白質を選定・検討し、4個(以下A-D)が確定した。A,Cは腎臓系球体に特異的に発現する蛋白質で、糸球体障害で尿中に排泄されと考えられた。Bは間質、Dは近位尿細管に特異的に発現した。健常者と比較しIgA腎症患者で、A-Dの尿中排泄が有意に増加した。Aは蛋白尿陰性の多くのIgA腎症患者においても尿中排泄が高値であった。検討した既知の尿バイオマーカーの多くは尿中排泄が尿蛋白量と正に相関していたが、KIM-1はIgA腎症の中でも蛋白尿の少ない患者で高値をとる傾向があった。蛋白尿の少ないCKDの診断に、尿中KIM-1と新規Aの測定が有効と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎障害(CKD)は通常の尿検査だけでは見逃される例がある。本研究の目的は、蛋白尿陰性でもCKDと診断しうる新規尿検査の開発である。尿蛋白質のうち血漿由来のアルブミン以外の成分は微量であり、多くが検討されていない。我々は尿蛋白質のうちアルブミン以外、特に腎臓由来の成分が新規尿バイオマーカーになる可能性を検討した。また既報の複数の尿バイオマーカーの比較検討も併せて行なった。結果、新規尿バイオマーカー候補蛋白質A、および既報の尿バイオマーカーKIM-1の尿中排泄が、蛋白尿の少ないIgA腎症患者の多くで増加することが確認できた。今後その測定がCKDの早期診断目的に組み込まれることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To discover new urinary biomarkers for early detection of CKD, 98 proteins were selected from our original kidney proteome database, and studied about their urinary expression in normal controls and IgA nephropathy patients. Four proteins (A-D) were confirmed significantly increased urinary expression in IgA nephropathy patients. Urinary proteins of A and C were originated from injured kidney glomerular podocytes, B was from interstitium, and D was from proximal tubule cells. Among these 4 proteins, urinary excretion of A was shown increased in many of IgA nephropathy patients of proteinuria negative (up/uCre<0.15). And urinary expression of most of the previously reported urinary biomarkers were positively correlated with the amount of proteinuria, although urinary KIM-1 tended to be higher in lower proteinuria patients in IgA nephropathy. In conclusion, urinary proteins of A and KIM-1 were considered to be effective for detection of IgA nephropathy of early (lower proteinuric) stage.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：尿バイオマーカー 慢性腎障害 IgA腎症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

CKD 患者尿中に増加している蛋白質の多くは大量のアルブミンやその他の血漿由来蛋白質である。顕性蛋白尿発現前の、ごく早期の CKD 診断を目的に、血漿に由来しない、傷害された腎臓内部位に由来する蛋白質の尿中排泄を検討したいと考えた。現実的にはこの時期の患者尿を多数収集することができないので、まずは有意な蛋白尿のある CKD 患者の尿を健常者と比較し、候補蛋白質を同定していくことになる。傷害された腎臓内部位に由来する蛋白質は通常比較的微量であり、蛋白尿発症後にはアルブミンなどに隠れて検出が困難である。

そこで我々は下記のストラテジーで研究を開始した：

- 1) 「腎臓内ネフロン部位特異的に発現する蛋白質」のデータベースを作成し、候補蛋白質をあらかじめ選定しておく。
- 2) それらの尿中排泄を順次、健常人群と CKD 患者群で比較検討し、CKD 患者群で明らかに尿中に増加する蛋白質を「新規尿バイオマーカー候補」として同定する。
- 3) 得られた「新規尿バイオマーカー候補」蛋白質のそれぞれについて、蛋白尿陰性の初期の CKD 患者に限って検討し、健常者より尿中排泄が増加しているか検討する。蛋白尿陰性患者とは、IgA 腎症など慢性腎疾患のうち、CKD の重症度分類(日本腎臓学会編「CKD 診療ガイド 2012」)で緑色部分 (G1A1, G2A1) に該当する患者とする。厳密には緑色部分は CKD に含まれない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、蛋白尿陰性でも CKD と診断しうる新規尿検査の開発である。IgA 腎症をはじめとする CKD を早期から見逃さない尿バイオマーカーを同定する。新規尿バイオマーカーの同定と併行し既報の複数の尿バイオマーカーの検討も行う。

### 3. 研究の方法

尿蛋白質の定量と解析は、表面プラズモン共鳴(SPR)技術を使用した ProteON XPR36 システム (Bio-Rad) の導入により、従来のゲルを用いたウエスタンブロットより短時間で多くの検体の正確な定量が可能である。1つのセンサーチップに5つの抗体を固定することで、5つの目的蛋白質の解析が一度に行なえる。1mL 程度の尿で1回の測定が可能である。また1回の RUN で5つの尿検体を同時に解析できるので、10回の RUN (所要4~5時間)で50検体の解析が可能となる。新規尿バイオマーカー候補の腎臓由来蛋白質として糸球体由来尿蛋白質、近位尿細管由来尿蛋白質、遠位尿細管・集合管由来尿蛋白質、腎臓間質由来尿蛋白質をリストアップしているので、抗体を作成または購入し順次解析する。

既報の複数の尿バイオマーカーについても同様に ProteON XPR36 システムを用いた解析を行う。また市販の ELISA キットを用いた測定も併せて行い、結果を比較する。

### 4. 研究成果

(1) 検討した 98 個の腎臓由来尿蛋白質のうち、4 個(A, B, C, D)が IgA 腎症患者尿で増加していることが確認され、尿バイオマーカーとして確定した。我々のデータベースから、A, C は腎臓の中でも糸球体上皮細胞に由来する尿蛋白質としてリストされていた。また B は腎臓間質に、D は腎臓近位尿細管細胞に、それぞれ由来する尿蛋白質であった。IgA 腎症患者での尿中排泄増加は、それぞれの産生部位の細胞の障害に由来するものと考えられた。

(2) 尿バイオマーカー A の糸球体上皮細胞における発現は、免疫染色強度で見ると IgA 腎症患者で非患者よりも低下していた。A の尿中排泄は蛋白尿の程度、および細胞性半月体形成系

球体の割合(%)と弱く正に相関していたが、腎機能(eGFR)とは有意な相関がなかった。IgA腎症のうち蛋白尿陰性(up/uCre<0.15)者に限っても、健常者との比較で尿中Aは有意に増加していた。感度(IgA腎症患者のうち尿中A高値)は67%で、蛋白尿陰性(up/uCre<0.15)者に限っても58%と比較的高値であった。

(3) 尿バイオマーカーBの間質における発現は、免疫染色強度で見るとIgA腎症患者の繊維化部位で非患者よりも増加していた。IgA腎症のうち蛋白尿陰性(up/uCre<0.15)者に限ると、健常者との比較で尿中Bは有意に増加していなかった。Bの尿中排泄は蛋白尿の程度とも腎機能(eGFR)とも、有意な相関がなかった。特異度(非患者のうち尿中B低値)は99%で、また陽性的中率も93%と極めて高いが、感度は16%程度であり、スクリーニングには向かないと考えられた。

(4) 尿バイオマーカーC、Dの感度はいずれもAより低く、またIgA腎症のうち蛋白尿陰性(up/uCre<0.15)者に限ると、健常者との比較で尿中排泄は有意に増加していなかった。また尿中A陰性IgA腎症でCまたはDの尿中増加が確認された症例はなかった。以上より、スクリーニングや早期発見の目的では、尿中Aが最も有用と考えられた。

(5) 既報の尿バイオマーカーとして、B2M、L-FABP、KIM-1、CALB1、TF、clusterinの検討を併せて行った。これらすべての尿中排泄が、健常者に比較しIgA腎症患者で高値であった。なかでもKIM-1は感度、特異度、陽性的中率のいずれも最も高く、また蛋白尿陰性のIgA腎症患者尿の多くで増加していた。

(6) 既報の尿バイオマーカーにつき、IgA腎症患者尿と菲薄基底膜病(TBMD)患者尿で比較した。L-FABPとKIM-1はIgA腎症患者尿で高値であった。L-FABPは蛋白尿量と有意に相関しており、対象としたIgA腎症患者群とTBMD患者群では前者が有意に蛋白尿量が多かったため、IgA腎症患者のうち蛋白尿量が比較的少ない患者(up/uCre<1.0)のみを対象とした群をTBMD患者群と比較した。両群の蛋白尿量に有意な差をなくしたこの検討でも、尿中KIM-1はIgA腎症患者群で高値であったが、尿中L-FABPには差がなかった。

(7) SPR法による尿蛋白質定量測定に用いる抗体にはそれに適した条件があり、BSAが添加されていない、affinity purify済みのELISA用モノクローナル抗体を使用した。市販のELISAキットを使用できた蛋白質についてはSPR法による測定結果と比較したが、おおむねよく相関した結果が得られた。

以上よりまとめると、CKD患者を蛋白尿のごく少ない時期に同定する尿バイオマーカーとして、既報のKIM-1および新規Aが最も有用と考えられた。測定方法として多数の検体の同時測定の目的にはSPR法が有用だが、よい抗体が得られない場合にはELISA法も可能と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirao Yoshitoshi, Saito Suguru, Fujinaka Hidehiko, Miyazaki Shigeru, Xu Bo, Quadery Ali, Elguoshy Amr, Yamamoto Keiko, Yamamoto Tadashi	4. 巻 6
2. 論文標題 Proteome Profiling of Diabetic Mellitus Patient Urine for Discovery of Biomarkers by Comprehensive MS-Based Proteomics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proteomes	6. 最初と最後の頁 9~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/proteomes6010009	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 Yaoita Eishin, Yoshida Yutaka, Nameta Masaaki, Takimoto Hiroki, Fujinaka Hidehiko	4. 巻 93
2. 論文標題 Induction of interdigitating cell processes in podocyte culture	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 519~524
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.kint.2017.06.031	査読の有無 有
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 Saito Suguru, Hirao Yoshitohi, Quadery Ali, Xu Bo, Elguoshy Amr, Fujinaka Hidehiko, Koma Shohei, Yamamoto Keiko, Yamamoto Tadashi	4. 巻 2
2. 論文標題 The Optimized Workflow for Sample Preparation in LC-MS/MS-Based Urine Proteomics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods and Protocols	6. 最初と最後の頁 46~46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mps2020046	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 Oyama Tomizo, Yaoita Eishin, Yoshida Yutaka, Ikarashi Ayako, Fujinaka Hidehiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Distinct differences between cultured podocytes and parietal epithelial cells of the Bowman's capsule.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-020-03170-4.	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤中秀彦
2. 発表標題 SPR法によるIgA腎症患者の各種尿バイオマーカーの測定
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤中秀彦
2. 発表標題 SPR法による慢性糸球体腎炎の複数の尿バイオマーカーの同時測定
3. 学会等名 第53回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤中秀彦
2. 発表標題 CKD早期診断に有用な新規尿バイオマーカー同定の試み
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤中秀彦
2. 発表標題 早期IgA腎症を健常者から選別しうる新規尿バイオマーカーの検討
3. 学会等名 第52回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担者	矢尾板 永信  (Yaoita Eishin)  (00157950)	新潟大学・医歯学系・准教授   (13101)	
研究 分担者	山本 格  (Yamamoto Tadashi)  (30092737)	新潟大学・医歯学総合研究科・特任教授   (13101)	