

平成 21 年 4 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590935

研究課題名 (和文) 腎疾患バイオマーカーとしての尿中 L - F A B P の基礎的検討

研究課題名 (英文) Urinary L-FABP; A Biomarker for Kidney Diseases

研究代表者

野入 英世 (NOIRI EISEI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00301820

研究成果の概要：

今回、新規マウス慢性腎不全 (CKD) モデルを確立するとともに、2つの急性腎不全 (AKI) モデルについて検討し、いずれにおいても尿中 L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) は腎疾患を早期から既存のマーカーよりも高精度で診断できる有用な新規バイオマーカーであること、AKI、CKD いずれにおいても尿中 L-FABP は腎疾患の治療効果もモニタリングできるバイオマーカーであること、尿中 L-FABP は血中レベルとは異なり、腎障害時に近位尿細管から管腔中へ放出される尿細管ストレス感知分子であること、腎尿細管での L-FABP 発現は尿細管自体の Viability を示すこと、さらに L-FABP は腎での酸化ストレス・脂質毒性 (lipotoxicity) を尿中へ排出することで腎障害を減弱させる腎保護蛋白であることを確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,999,807	600,000	2,599,807
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,099,807	930,000	4,029,807

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学・疾患管理

1. 研究開始当初の背景

米国人人口統計調査において、腎機能低下の度合いに応じて心血管イベントが有意に上昇し、総死亡率が有意に上昇することが示された (NEJM 351:1296, 2004)。同様の検討は Nippon データとして報告されており (Circ J 70:954, 2006)、やはり腎機能低下に応じて心

血管イベント及び総死亡率上昇が確認されている。進行性腎障害から腎機能廃絶に至る最大の要因は、現在2型糖尿病であるが、糖尿病性腎症は remission・regression を生じるため、one point の検尿中の微量アルブミン測定では、なかなか正しい判断が行いに

くい状況である。近年糖尿病性腎症に対してはアンジオテンシン受容体阻害剤の効果が報告されているが、糖尿病性腎症の remission・regression の病勢を的確に示すことができる指標があれば、紋切り型のARB処方に意志決定材料を賦与可能となり、政府の医療費負担を軽減できることは必至である。一方、急性腎不全領域においてしばしば問題となる造影剤腎症では、発症から48時間をピークに腎機能低下が生じるため、もう少し早期よりの発見。可能であれば検査前からのスクリーニングが望まれている。また、ICUでは種々の要因による急性腎不全患者は約25%を占めており、従来の急性腎不全診断の指標に加えて新たな予後との相関を見通せるような指標の出現が望まれている。以上はほんの一例であるが、現時点で用いられている従来型の保健診断薬では全くカバーできない領域であることは明白である。近年、尿中L-FABPがELISAによるアッセイで診断可能となり、その有用性を指摘する報告も散見されはじめた。本研究では、動物実験により尿中L-FABPがバイオマーカーとしてどのような病態を切り分けることが可能かを検討する。

2. 研究の目的

尿細管障害でのL-FABPの役割を検討するにあたり、げっ歯類では一般に、L-FABP遺伝子のプロモーター領域に腎臓での発現に対する silencing sequence が存在するため、腎臓においてはノックアウト動物であることが知られており、ヒトでの腎障害をターゲットとしたL-FABPの解析を腎臓で実施するにはhuman L-FABP (hL-FABP)遺伝子を導入した“humanized mice”を用いる必要がある。本研究ではhL-FABP遺伝子改変マウスを増産し腎障害における病態生理の解析を試みた。

尿細管障害でのバイオマーカーとしての有用性を評価するため、腎虚血再灌流障害とCisplatin腎症という異なる急性腎不全モデルについて通常のプロトコルによる障害とさらに軽度の障害モデルを作製し、既存の腎機能マーカーと尿中L-FABPとの感度の違いを検討した。第二に、尿細管においてもPPARアゴニストによってhL-FABPが誘導されることをin vitro studyで検討した。また、PPARアゴニストによるCisplatin腎症の介入効果をhumanized miceを使用して、尿中L-FABPをモニタリングすることで検討した。

次に、2,8-ジヒドロキシアデニン(DHA, dihydroxyadenine)の結晶形成により尿細管を閉塞させ、その結果尿細管の変性、腎間質の線維化、最後には慢性腎不全にいたるアデニン投与CKDモデルをマウスにおいて作製し、貧血や心肥大の程度についても検証した。また、キサンチン脱水素酵素(XDH, xanthine dehydroxygenase)阻害剤投与による腎機能の悪化の抑制が貧血や心肥大に及ぼす影響についても検証した。新規XDH阻害薬であるY-700(1-[3-Cyano-4-(2,2-dimethylpropoxy)phenyl]-1H-pyrazole-4-carboxylic acid)とアロプリノールのXDH阻害効果の比較や、野生型および変異型マウスを用いて尿中L-FABPのバイオマーカーとしての有効性と腎保護効果について検討した。

3. 研究の方法

動物

ヒトL-FABP遺伝子改変マウス(以下、変異型)の樹立についてはすでにその詳細が報告されているが、human L-FABPとそのプロモーター領域にあたる上流13kbを含むゲノムDNAを、C57/BL6とCBAマウスとから得られた受精卵に導入し、ICRマウスを母体として使用した。得られた変異型マウスは

C57/BL6 系統において 9 回以上バッククロスさせ樹立した。動物は野生型、変異型ともに CMIC Co. Ltd (東京) より分与を受けた。

動物実験は、全て東京大学医学部・大学院医学系研究科の動物実験に関する倫理規定 (倫理委員会承認番号 460) に準拠した。

マウス腎虚血再灌流障害モデル

野生型、及び変異型マウスを麻酔下に両腎を露出し、腎基部に血管鉗子をかけ、37 に保ったインキュベーター (SAMOL LS 5, NIPPON BLOWER Co., Ltd. 東京) に入れた。5 分、15 分、または 30 分後に血管鉗子はずし、虚血腎の再灌流を肉眼的に確認し閉腹した。Sham 群には麻酔後に同様の操作を行った。代謝ケージ (Metabolica; Sugiyamagen, 東京) を用いて虚血前、再灌流 1、3、12、24 時間後に採尿を行い、再灌流前、3 時間後に尾静脈より採血し、24 時間後屠殺して採材した。

マウス Cisplatin 腎症モデル

25 ~ 30g の C57BL/6J 雄、変異型に Cisplatin 5、10 または 20 mg/kg を腹腔内投与し、対照群には生食を腹腔内投与した。代謝ケージを用いてシスプラチン投与前、24、48、72 時間後に採尿した。また、Cisplatin 投与前、24、48 時間後に尾静脈より採血し 72 時間後に屠殺して腎機能、尿中 hL-FABP、組織学的所見を評価した。

マウス Cisplatin 腎症モデルでの Bezafibrate の介入効果

L-FABP の尿細管での発現増強によるマウス Cisplatin 腎症への効果を検討するため、Cisplatin 投与 7 日前より通常飼料もしくは 0.5%Bezafibrate 混合飼料を投与し、変異型、野生型マウスにそれぞれ Cisplatin または生食を投与した。各群の投与方法は、通常飼料

+ 生食投与群 (Control)、0.5% Bezafibrate 混餌飼料 + 生食投与群 (Bz)、通常飼料 + Cisplatin 投与群 (CP)、0.5% Bezafibrate 混餌飼料 + Cisplatin 投与群 (Bz+CP) とした。尾静脈より Cisplatin 投与前より投与後 24 時間ごとに採血を行うとともに、代謝ケージを用いて 24 時間ごとに採尿し、投与 24、72 時間後に屠殺して腎機能、尿中及び血清中 hL-FABP、組織所見について検討した。

マウス慢性腎不全モデル

野生型および変異型マウスをそれぞれ adenine 群、allopurinol 群、Y-700 群、control 群の 4 群に分けた。adenine 群には 0.2% アデニン (Sigma, St Louis, MO) w/w 混合飼料と通常の水を 6 週間投与した。allopurinol 群は 0.2% アデニン混合飼料と通常の水の投与で開始し、2 週間後よりアロプリノール (25mg/kg/day) (Sigma) を水に混ぜて投与した。その後 6 週目までアロプリノール混合水をアデニン混合飼料とともに投与した。Y-700 群も同様に 0.2% アデニン混合飼料開始 2 週間後より水に Y-700 (5mg/kg/day) (田辺三菱製薬より供与) を混ぜて投与した。control 群には通常飼料と通常の水を投与した。4 群とも開始前、2、4、6 週間後に採血を行うとともに、代謝ケージを用いて採尿し、6 週間後にマウスを屠殺し、4 群間の違いを評価した。

腎は PAS 染色、MT 染色で評価した。さらに腎組織、心重量、尿中パラメーターについて検討した。

4. 研究成果

マウス急性腎不全モデル

hL-FABP 遺伝子改変マウスによる腎虚血再灌流障害において、野生型に比べて変異型で腎機能、組織学的変化とともに障害が有意に軽減されており、腎臓において RNA、蛋白レベ

ルともに hL-FABP が増加しており、尿中レベルでも著増していた。また、腎移植症例での検討においても、腎阻血開始から初尿までの時間と、尿管から直接採取した初尿中 L-FABP との間に高い相関が認められ (n=10, $R^2=0.915$) さらに CCD カメラで赤血球流速を測定することで算出した腎皮質表面血流速度の逆数と、初尿中 L-FABP との間にも高い相関が見られた (n=12, $R^2=0.744$)。これはヒト腎組織においても L-FABP が虚血刺激に応じて尿中へ誘導されることを裏付ける結果である。L-FABP の虚血応答性の機序としては、L-FABP の転写調節領域に Hypoxia Inducible Factor (HIF) や Hepatic Nuclear Factor 4 (HNF4) といった低酸素刺激で誘導される分子と結合する領域が含まれていることが報告されており、そのために尿細管での L-FABP が誘導されることで細胞内に蓄積した脂肪酸や脂質過酸化物を L-FABP が結合して尿中へ排出し、細胞障害を緩和すると考えられる。

変異型マウスでの虚血時間の違いによる比較では、BUN、尿中 NAG では検出できない程度のごく軽度の組織学的変化を伴う尿細管障害でも再灌流 1 時間後の早期より検出可能であった。血清クレアチニンも BUN と同様、5 分間の虚血では明らかな増加は見られなかった。尿中 hL-FABP は虚血時間の違いによる障害の程度を鋭敏に反映させることも示された。次に、低用量と高用量の Cisplatin 投与での比較においても、BUN、血清 Cr、NAG では検出できない程度のごく軽度の組織学的変化を示す尿細管障害でも投与 24 時間後の早期より検出可能であった。尿中 hL-FABP が Cisplatin の投与量の違いによる尿細管障害の程度を反映させることも確認された。尿中 hL-FABP は CP-AKI、IR-AKI とともに、ROC 解析により早期から優れた AKI 診断予測精度を有することが確認された。

マウス慢性腎不全モデル

今回樹立したマウスモデルの adenine 群と control 群を比較すると adenine 群では BUN の著明な上昇、HCT の低下、および心重量の増加を認め、本研究において腎機能悪化に伴って貧血及び心肥大をきたす。このモデルでは、DHA による尿細管の閉塞だけで腎不全に陥り、心腎連関により心肥大に影響を及ぼす。

adenine 群では腎の間質の線維化、尿細管の不均一な拡大、間質への著明なマクロファージの浸潤を示し、マクロファージ走化性因子 MCP-1 や線維芽細胞増殖を刺激する TGF- β 1 の mRNA の増加も認めた。

変異型マウスの adenine 群と control 群を比較すると、BUN 上昇が軽度で、L-FABP が AKI だけでなく CKD においても尿細管保護的に機能していることが確認された。

XDH 阻害剤投与による腎治療の効果についても検討するため、野生型マウスの adenine 群と allopurinol 群、Y-700 群を比較した。アデニン投与による腎機能障害は、アデニンが XDH の作用で難溶性の DHA に変換され、尿細管に沈着することで生じる。そこでアデニンと同時に XDH 阻害剤を投与しアデニンから DHA への変換を阻害したところ、adenine 群と比較して allopurinol 群、Y-700 群の両群とも BUN の低下、および HCT 値の増加、心重量の低下を認めた。組織像においても腎の間質の線維化や尿細管の拡大、マクロファージの浸潤の抑制を認め、MCP-1 や TGF- β 1 の mRNA の発現量も減少した。つまりアデニン投与により生じる慢性腎不全モデルでは XDH 阻害剤の投与で、腎機能悪化の抑制とともに貧血及び心肥大の進行を抑制し、組織所見の悪化も抑制していた。

変異マウスを用いたアデニン投与実験では、尿中 hL-FABP レベルは adenine 群で著明

に上昇し、XDH 阻害剤投与群において XDH 阻害剤投与開始とともに低下していった。尿蛋白やアルブミン、NAG は腎障害マーカーとして臨床でも用いられており、特に NAG は近位尿細管障害マーカーであるにもかかわらず、本モデルにおいて上昇せず、尿中 L-FABP のみが病態を正確に反映していた。尿中 L-FABP が腎障害時に上昇するだけでなく、腎治療とともに低下し、治療効果を反映したバイオマーカーであるという結果は、本研究が初めての報告である。

5 . 研究総括 (詳細は雑誌論文 1 を参照)

AKI 及び CKD いずれにおいても尿中 L-FABP は腎疾患を早期から既存のマーカーよりも高精度で診断できる有用な新規バイオマーカーである

AKI 及び CKD いずれにおいても尿中 L-FABP は腎疾患の治療効果もモニタリングできるバイオマーカーである

尿中 L-FABP は血中レベルとは異なり、腎障害時に近位尿細管から管腔中へ放出される尿細管ストレス感知分子である

シスプラチン腎症では、予め近位尿細管での L-FABP 発現を上昇しておくことで腎症発症を予防しうる可能性がある。

腎尿細管での L-FABP 発現は尿細管自体の Viability を示す

L-FABP は腎での酸化ストレス・脂質毒性 (lipotoxicity) を尿中排出することで腎障害を減弱させる腎保護蛋白である

マウスのアデニン腎症モデルは、間質性腎障害の進行性モデルで、種々の遺伝子操作マウスにおける進行性腎症検討に敷衍できる

この変異型マウスを創薬分野で展開することにより、腎毒性モニタリングにも活用できるだけでなく、腎疾患治療薬の有効性検討に

も有用であると考えられ、腎疾患にとどまらない医学・医療の発展に大きく貢献するものと考えている。

5 . 主な発表論文等 (すべて査読有)

[雑誌論文](計 12 件) 主要英語論文のみ

Noiri E, Doi K, Negishi K, Tanaka T, Hamasaki Y, Fujita T, Portilla D, Sugaya T: Urinary fatty acid-binding protein 1: an early predictive biomarker of kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F 669-79, 2009, Review

Tanaka T, Doi K, Maeda Mamiya R, Negishi K, Portilla D, Sugaya T, Fujita T, Noiri E: Urinary L-type fatty acid-binding protein can reflect renal tubulointerstitial injury. *Am J Pathol* 174: 1203-11, 2009

Negishi K, Noiri E, Doi K, Maeda Mamiya R, Sugaya T, Portilla D, Fujita T: Monitoring of urinary L-type fatty acid-binding protein predicts histological severity of acute kidney injury. *Am J Pathol* 174: 1154-9, 2009

Noiri E, Doi K, Inagi R, Nangaku M, Fujita T: Contribution of T lymphocytes to rat renal ischemia/reperfusion injury. *Clin Exp Nephrol* 13: 25-32, 2009

Negishi K, Noiri E, Maeda R, Portilla D, Sugaya T, Fujita T: Renal L-type fatty acid-binding protein mediates the bezafibrate reduction of cisplatin-induced acute kidney injury. *Kidney Int* 73: 1374-84, 2008

Doi K, Okamoto K, Tokunaga K, Fujita T, Noiri E: Genome study of kidney disease in the age of post genome-sequencing. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8: 173-83, 2008

Doi K, Noiri E, Maeda R, Nakao A, Kobayashi S, Tokunaga K, Fujita T: Functional polymorphism of the myeloperoxidase gene in hypertensive nephrosclerosis dialysis patients. *Hypertens Res* 30: 1193-8, 2008

Tanaka T, Noiri E, Yamamoto T, Sugaya T, Negishi K, Maeda R, Nakamura K, Portilla D, Goto M, Fujita T: Urinary human L-FABP is a potential biomarker to predict COX-inhibitor-induced renal injury. *Nephron Exp Nephrol* 108: e19-e26, 2008

野入英世 : AKI - 新時代の幕開け

[Editorial] 内科:2-4,2008

野入英世、伊西洋二、塚原宏一、菅谷

健 : AKI の早期診断・早期治療にむけて

内科:115-124,2008

Portilla D, Dent C, Sugaya T, Nagothu KK, Kundi I, Moore P, Noiri E, Devarajan P: Liver fatty acid binding protein as a biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int* 73: 465-72, 2007

Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamijo A, Kimura K, Fujita T, Kinukawa T, Taniguchi H, Nakamura K, Goto M, Shinozaki N, Ohshima S, Sugaya T: Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury. *JASN* 18:2894-902, 2007

[学会発表](計9件)

根岸康介, 野入英世, 浜崎敬文, 土井研人, 本田謙次郎, 小林修三, 藤田敏郎 尿中脂肪酸結合蛋白1(FABP1)での急性腎不全後の腎機能回復予測. **第106回日本内科学会講演会2009** (東京)

Yoshifumi Hamasaki, Kousuke Negishi, Eisei Noiri, Kent Doi, Kenjiro Honda, Takayasu Ohtake, Shuzo Kobayashi, Takeshi Sugaya, Toshiro Fujita: Urinary L-FABP Can Predict the Recovery of Renal Function after AKI. *American Society of Nephrology Renal Week 2008* (フィラデルフィア)

Kent Doi, Eisei Noiri, Kousuke Negishi, Yoshifumi Hamasaki, Toshiro Fujita, Hikaru Koide, Tsukasa Nakamura, Takeshi Sugaya : Role of L-Type Fatty Acid Binding Protein in Sepsis and Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. *American Society of Nephrology Renal Week 2008* (フィラデルフィア)

Kousuke Negishi, Eisei Noiri, Kent Doi, Koji Okamoto, Takeshi Sugaya, Toshiro Fujita: Monitoring of Urinary L-Type Fatty Acid Binding Protein Predicts Histological Severity of Acute Kidney Injury. *American Society of Nephrology Renal Week 2008* (フィラデルフィア)

根岸康介, 野入英世, 菅谷健, 田中珠美, 岡本好司, 藤田敏郎 Acute Kidney Injuryにおける尿中Biomarkerとしての肝臓型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)の有用性. **第51回日本腎臓学会学術総会2008** (福岡)

菅谷健, Didier Portilla, 野入英世: 小児

心臓手術後急性腎不全発見に対する尿中L-FABPの有用性について. **第51回日本腎臓学会学術総会2008** (福岡)

浜崎敬文, 根岸康介, 野入英世, 土井研人, 本田謙次郎, 大竹剛靖, 小林修三, 藤田敏郎, 尿中L-FABPの経時的変化はAKI後の腎機能改善の予測の指標となりうる. **第38回日本腎臓学会東部学術大会2008** (福岡)

Kousuke Negishi, Eisei Noiri, Rui Maeda, Tamami Tanaka, Koji Okamoto, Takeshi Sugaya, Toshiro Fujita: A Sensitive Biomarker of AKI: Monitoring of Urinary L-Type Fatty Acid Binding Protein (L-FABP). *American Society of Nephrology Renal Week 2007* (サンフランシスコ)

Tamami Tanaka, Eisei Noiri, Kousuke Negishi, Rui Maeda, Takeshi Sugaya, Toshiro Fujita: Urinary L-Type Fatty Acid Binding Protein (L-FABP) is a Sensitive Biomarker in Adenine induced Mice Cardiorenal Anemia Syndrome (CRAS) Model. *American Society of Nephrology Renal Week 2007* (サンフランシスコ)

[図書](計1件)

野入英世監修: AKI シラバス 内科 2-124 頁 (南江堂・東京) 2008

[産業財産権]

出願状況(計0件)

本研究補助金との関連では、特になし。

取得状況(計0件)

特になし。

[その他]

無断複製等禁止

本報告書の著作権は、文部科学省及び独立大学法人東京大学に帰属しており、本報告書の全部又は一部の無断複製等の行為は、法律で認められた場合を除き、著作権の侵害にあたるため、これらの利用行為を行うときは承認手続きを要する。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野入 英世 (NOIRI EISEI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 00301820

(2) 研究分担者

菅谷 健 (SUGAYA TAKESHI)

東京歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号: 40381561

(3) 連携研究者

特になし。