

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23406027

研究課題名(和文)慢性腎不全の生命予後を規定する遺伝子情報の国際比較調査研究

研究課題名(英文)International comparison of genomic variations for prognostic factors in chronic kidney disease

研究代表者

松尾 清一(Matsuo, Seiichi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70190410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症は慢性腎臓病(CKD)患者において重要な危険因子である。我々の共同研究機関であるカロリンスカ研究所腎臓病学教室の研究で、慢性炎症を合併したスウェーデン人CKD患者においてDNAの発現を制御するメチル化が亢進していた。我々は、この国際共同研究を通じて、日本人CKD患者においても炎症とDNAメチル化の亢進を確認し、細菌感染症のマーカーであるプロカルシトニンの上昇を確認した。また、DNAメチル化の亢進は一年後の高炎症状態も予測した。これらの結果は隠れた炎症の原因として感染症が考えられ、感染症の管理や、感染症を引き起こす尿毒症による免疫力の低下の抑制の重要性が示唆されるものであった。

研究成果の概要(英文)：Inflammation is an established mortality risk factor in chronic kidney disease (CKD) patients and infection may contribute to induce inflammation. Our collaborating Nephrology group in Sweden showed that inflamed uremic Caucasian patients had signs of global DNA hyper-methylation. We have investigated that DNA hyper-methylation is linked to inflammatory markers including a marker of bacterial infections in Japanese CKD patients. Global DNA hyper-methylation was associated with ferritin and procalcitonin as a marker of bacterial infection, suggesting that inflammation induced by subclinical bacterial infection promoted DNA methylation. Moreover, Global DNA hyper-methylation was associated with near future inflammatory status, suggesting a possible axis between hyper-methylation status and present as well as future inflammatory status. These results strongly suggest that to control infection and immune dysfunction due to uremia may be important to induce inflammation in CKD patients.

研究分野：医歯薬学B

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：ゲノムDNAメチル化 末期腎不全 コホート研究 LUMA法 炎症 感染症

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease: CKD)は透析療法が必要となる末期腎不全の予備軍であり心血管系合併症の重大な危険因子でもある。また、透析患者の生命予後は著しく改善されたが、正常人に比較すると心血管系合併症および感染症死亡率はいまだ高く、注目すべきは若年でさえそれら死亡率の上昇は著しい。

CKD 患者においては、免疫機能低下と活性化が同時に存在し、動脈硬化、栄養障害、慢性炎症が悪循環を形成し (MIA syndrome ; Malnutrition, Inflammation, Atherosclerosis) 高い死亡率に寄与していることが報告されている。我々は、1990 年頃より、腎疾患における Toll like receptor など自然免疫系の役割について解析してきた。また Dr. Lindholm, Dr. Stenvinkel (Karolinska Institutet)らの教室と国際共同研究を展開している。この腎臓病学教室ではスウェーデン人CKD患者の長期コホート研究からなるMIA研究が1995年から始められ、動脈硬化症の発症・増悪に炎症と栄養障害が深く関わっていることを証明し、CKDの予後改善に大きな貢献をもたらしている。

これらの知見から、我々は、CKD患者の炎症の惹起に腎不全特有の免疫不全と感染症が関与しているといった仮説を立てた。(図1)

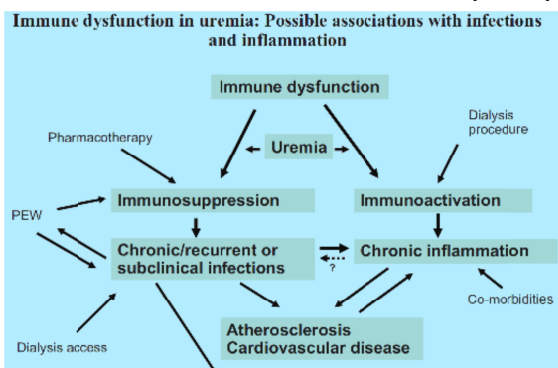


図1. 腎不全患者における免疫能低下と、感染症と炎症の関与 (Kato S. et al. Clin J Am Soc Nephrol 2008;3:1526-1533.)

2. 研究の目的

腎不全特有の免疫不全状態は自然免疫と獲得免疫の両側面で認められる。慢性炎症が存在する患者は予後不良であることは周知の事実となりつつあるが、どこから炎症が惹起されるかはすべて解明されていない。そこで、尿毒症に起因する免疫能低下が易感染性を惹起し高サイトカイン血症などから、動脈硬化・心血管イベントが進行する経路がCKD患者の心臓合併率を上昇させ高い若年死亡率に寄与している可能性が考えられた。さらに、我々の共同研究機関であるカロリンスカ研究所腎臓病学教室の研究で、慢性炎症を合併したスウェーデン人CKD患者においてDNAの

発現を制御するメチル化が亢進していた。我々は、この国際共同研究を通じて、日本人CKD患者においてもDNAメチル化の亢進が慢性炎症の惹起と関与があるか、不顕性感染症細菌がそれらの原因となりうるか検討した。

3. 研究の方法

我々は、すでに、日本人の末期腎不全患者を対象としたコホート研究 NISE study (Nagoya Immunity System in the End-stage renal disease study) を開始していた。この研究期間中に約 150 例の登録が得られてた。それらの患者において、DNAメチル化の亢進が慢性炎症の惹起と関与があるか、不顕性感染症細菌がそれらの原因となりうるか検討した。

さらに、スウェーデン人CKD患者における慢性炎症とゲノムDNAのメチル化の関係を比較した。

4. 研究成果

慢性炎症は慢性腎臓病 (CKD) 患者において重要な危険因子である。我々の共同研究機関であるカロリンスカ研究所腎臓病学教室では炎症を惹起された患者においてはDNAの発現を制御するメチル化が亢進していた。

共同研究者の Dr. Stenvinkel らは、MIA研究のCKDstage5の患者において、ゲノムDNA全体の高メチル化は、慢性炎症、酸化ストレスと正相関を示し、ゲノムDNA全体の高メチル化は全死亡の独立した危険因子であることを報告した (Stenvinkel P. J Intern Med 2007)。このように、DNAメチル化の変調が炎症を介して疾患の進展に寄与していることが推察された。

NISE研究に登録された明確な感染症の合併のない44名の腎不全患者を同様の方法でゲノムDNA全体のメチル化の解析を行った。高メチル化は慢性炎症を示唆する高フェリチン値と細菌感染症に特異的なマーカーであるプロカルシトニンの上昇と関与していた。これは細菌感染によって惹起された炎症がDNAの高メチル化に関与している可能性を示唆するものであった。(Kato S. Nephron Extra 2012)

Table 3. Correlations between HpaII/MspI ratio, inflammatory markers and nutritional parameters

		WBC	Albumin	SGA	CRP	Ferritin	PCT
HpaII/MspI ratio	ρ	-0.1826	0.1684	-0.1103	-0.1273	-0.3343	-0.3226
	p	NS	NS	NS	NS	0.0266*	0.0348*
WBC	ρ		-0.2937	-0.087	0.1128	0.2495	0.0194
	p		NS	NS	NS	NS	NS
Albumin	ρ			0.1237	-0.1147	-0.1527	-0.0854
	p			NS	NS	NS	NS
SGA	ρ				-0.0821	-0.1394	-0.0606
	p				NS	NS	NS
CRP	ρ					0.3739	0.3059
	p					0.0135*	0.0488*
Ferritin	ρ						0.1299
	p						NS

NS = Not significant; WBC = white blood cells. * p < 0.05.

Table 4. Multivariate regression model predicting *HpaII/MspI* ratio in CKD stage 5 patients

Parameter	Parameter estimate	Standard error	p value
Intercept	0.450	0.079	<0.0001
Age >61 years	-0.025	0.023	0.3
Female gender	0.010	0.012	0.4
CRP	0.007	0.008	0.4
PCT	-0.025	0.011	0.034*

DNA メチル化はプロカルシトニンとフェリチン値と相関をしめした。(Kato S. Nephron Extra 2012)

また、DNA メチル化の亢進は一年後の高炎症状態も予測した (Kato S. Abstract Society of Blood Purification)

Multivariate regression model predicting for CRP after 1 year in dialysis patients

1
1

Parameter	Parameter Estimate	Standard Error	P value
Intercept	-2.468	0.807	*0.0042
age, >51 years	-0.064	0.263	0.81
Medication of ACEi/ARB	0.447	0.274	0.11
<i>HpaII/MspI</i>	-4.191	1.684	*0.018
White blood cell count	0.222	0.076	*0.006

The adjusted R² of the model was 0.36

図 2 . 腎不全患者における、一年後の CRP の予測因子 (Kato S. Abstract. Society of Blood Purification)

これらの結果は、CKD 患者の隠れた炎症の原因として感染症とくに不顕性感染症の存在が考えられ、これらの感染症を管理すること、感染症を引き起こす尿毒症による免疫力の低下を防ぐことが、CKD 患者の合併症を減らし、ひいては若年死亡率を改善させる可能性が示唆されるものであった。

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 41 件)

1. Tsuboi N, Maruyama S, Matsuo S, Imai E. A ray of light in the dark: alternative approaches to the assessment and treatment of ischemic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 29(2):228-31. 2014
2. Takahashi H, Ito Y, Ishii H, Aoyama T, Kamoi D, Kasuga H, Yasuda K, Maruyama S, Matsuo S, Murohara T, Yuzawa Y. Geriatric nutritional risk index accurately predicts cardiovascular mortality in incident hemodialysis patients. *JCardiol.* S0914-5087(13)00352-3. 2013
3. Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Tamai H, Hiramatsu T, Ohashi H, Ito I, Kasuga H, Horie M, Maruyama S, Yuzawa Y,

Matsubara T, Matsuo S. Long-Term Effects of Spironolactone in Peritoneal Dialysis Patients. *J Am Soc Nephrol.* Epub. 2013

4. Shinjo H, Sato W, Imai E, Kosugi T, Hayashi H, Nishimura K, Nishiwaki K, Yuzawa Y, Matsuo S, Maruyama S. Comparison of Kidney Disease: Improving Global Outcomes and Acute Kidney Injury Network criteria for assessing patients in intensive care units. *Clin Exp Nephrol.* Epub. 2013
5. Kinashi H, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Terabayashi T, Nagura F, Hattori R, Matsukawa Y, Mizuno T, Noda Y, Nishimura H, Nishio R, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Takei Y. TGF- β 1 promotes lymphangiogenesis during peritoneal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 24(10):1627-42. Epub. 2013
6. Horio M, Imai E, Yasuda Y, Watanabe T, Matsuo S. Lower serum albumin level is associated with higher fractional excretion of creatinine. *ClinExpNephrol.* Epub. 2013.
7. Furuhashi K, Tsuboi N, Shimizu A, Katsuno T, Kim H, Saka Y, Ozaki T, Sado Y, Imai E, Matsuo S, Maruyama S. Serum-starved adipose-derived stromal cells ameliorate crescentic GN by promoting immunoregulatory macrophages. *J Am Soc Nephrol.* 24(4):587-603. 2013
8. Iimuro S, Imai E, Watanabe T, Nitta K, Akizawa T, Matsuo S, Makino H, Ohashi Y, Hishida A. Clinical correlates of ambulatory BP monitoring among patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 8(5):721-30. 2013
9. Nitta K, Iimuro S, Imai E, Matsuo S, Makino H, Akizawa T, Watanabe T, Ohashi Y, Hishida A. Risk factors for increased left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 17(5):730-42. 2013
10. Yamagata K, Usui J, Sugiyama H, Nitta K, Wada T, Muso E, Arimura Y, Koyama A, Makino H, Matsuo S. Clinical findings on ANCA-associated renal vasculitis from the Japan RPGN registry obtained via a questionnaire survey. *ClinExpNephrol.* 17(5):646-9. 2013
11. Takahashi H, Ishii H, Aoyama T, Kamoi D, Kasuga H, Ito Y, Yasuda K, Tanaka M, Yoshikawa D, Maruyama S, Matsuo S, Murohara T, Yuzawa Y. Association of cardiac valvular calcifications and C-reactive protein with cardiovascu

- lar mortality in incident hemodialysis patients: a Japanese cohort study. *Am J Kidney Dis.* 61(2):254-61.2013
12. Horio M, Imai E, Yasuda Y, Watanabe T, Matsuo S. GFR estimation using standardized serum cystatin C in Japan. *Am J Kidney Dis.* 61(2):197-203.2013
 13. Horio M, Imai E, Yasuda Y, Watanabe T, Matsuo S. Performance of GFR equations in Japanese subjects. *Clin Exp Nephrol.* 17(3):352-8.2013
 14. Imai E, Yasuda Y, Matsuo S. A decade after the KDOQI CKD guidelines: a perspective from Japan. *Am J Kidney Dis.* 60(5):729-30.2012
 15. Okumura N, Hayashi M, Imai E, Ishii H, Yoshikawa D, Yasuda Y, Goto M, Matsuo S, Oiso Y, Murohara T. Effects of carperitide on contrast-induced acute kidney injury with a minimum volume of contrast in chronic kidney disease patients. *Nephron Extra.* 2(1):303-10.2012
 16. Lindholm B, Stenvinkel P, Ekström TJ, Luttrupp K, Yuzawa Y, Yasuda Y, Tsuruta Y, Maruyama S. DNA hypermethylation and inflammatory markers in incident Japanese dialysis patients. *Nephron Extra* 2(1):159-168, 2012
 17. Takahashi R, Ito Y, Takahashi H, Ishii H, Kasuga H, Mizuno M, Suzuki Y, Yuzawa Y, Maruyama S, Murohara T, Imai E, Matsuo S. Combined values of serum albumin, C-reactive protein and body mass index at dialysis initiation accurately predicts long-term mortality. *Am J Nephrol.* 36(2):136-43.2012
 18. Tatematsu M, Yasuda Y, Morita Y, Sakamoto I, Kurata K, Naruse T, Yamamoto R, Tsuboi N, Sato W, Imai E, Matsuo S, Maruyama S. Complete remission within 2 years predicts a good prognosis after methylprednisolone pulse therapy in patients with IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol.* 16(6):883-91.2012
 19. Ishii H, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Tanaka M, Yoshikawa D, Hayashi M, Yasuda Y, Maruyama S, Matsuo S, Matsubara T, Murohara T. Percutaneous coronary intervention with bare metal stent vs. drug-eluting stent in hemodialysis patients. *Circ J.* 76(7):1609-15. 2012
 20. Okada R, Yasuda Y, Tsushita K, Wakai K, Hamajima N, Matsuo S. Glomerular hyperfiltration in prediabetes and prehypertension. *Nephrol Dial Transpl.* 27(5):1821-5.2012
 21. Imai E, Yasuda Y, Horio M, Shibata K, Kato S, Mizutani Y, Imai J, Hayashi M, Kamiya H, Oiso Y, Murohara T, Maruyama S, Matsuo S. Validation of the equations for estimating daily sodium excretion from spot urine in patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 15(6):861-7.2011
 22. Hayashi M, Shibata R, Takahashi H, Ishii H, Aoyama T, Kasuga H, Yamada S, Ohashi K, Maruyama S, Matsuo S, Ouchi N, Murohara T, Toriyama T. Association of adiponectin with carotid arteriosclerosis in predialysis chronic kidney disease. *Am J Nephrol.* 34(3):249-55. 2011
- 〔学会発表〕(計 10 件)
1. Sawako Kato, Neutrophil/Lymphocyte Ratio as a Predictor of Cardiovascular Events in Japanese Patients Starting Renal Replacement Therapy. *Kidney Week 2013*, 2013/11/9, Atlanta (U.S.A.)
 2. 加藤 佐和子, 新規透析導入患者における脈圧と平均血圧の検討, 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 2013/05/11, 東京都千代田区, 東京国際フォーラム
 3. Sawako Kato, Characteristics of Japanese dialysis patients evaluated by estimated dietary protein intake and serum phosphorus. The 30th annual meeting of the International Society of Blood Purification, 2012/9/7, Yokohama, Japan
 4. Sawako Kato, GNRI in Japanese incident dialysis patients. The 16th International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease, 2012/6/30, Hawaii, USA.
 5. 加藤 佐和子, 新規透析導入患者における抗炎症分子としての HDL コレステロールの役割, 第 55 回日本腎臓学会学術総会, 2012/05/11, 東京都千代田区, 東京国際フォーラム
 6. Sawako Kato, Impact of Subclinical Bacterial Infection on Epigenetic DNA Methylation in Japanese CKD Stage 5 Patients, 44rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, 2011/11/12, Philadelphia, PA
 7. Shoichi Maruyama, Association of Adipokines with Cardiovascular Mortality in Patients on Hemodialysis, 44rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, 2011/11/10, Philadelphia, PA
 8. Sawako Kato, Is epigenetic DNA hypermethylation linked to chronic inflammation in Japanese dialysis patients? The 29th annual meeting of the

International Society of Blood Purification, 2011/9/10, Beijing, China.

9. Sawako Kato, Association between changes in vascular stiffness after initiation of maintenance dialysis therapy and low level of intact PTH level. The 47th annual meeting of the European Renal Association-European Dialysis Transplant Association, 2011/6/25, Prague, Czech.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 清一 (MATSUO SEIICHI)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号： 70190410

(2) 研究分担者

丸山 彰一 (MARUYAMA SHOICHI)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号： 10362253

湯澤 由紀夫 (YUZAWA YUKIO)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号： 00191479

佐藤 和一 (SATO WAICHI)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号： 90508920

坪井 直毅 (TSUBOI NAOTAKE)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号： 50566958

安田 宜成 (YASUDA YOSHINARI)
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座准教授
研究者番号： 60432259

加藤 佐和子 (KATO SAWAKO)
名古屋大学・医学系研究科・助教
研究者番号： 80625757