

令和元年6月12日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01404

研究課題名(和文)慢性腎臓病発症予測バイオマーカーとしての尿中L-FABPの前臨床研究

研究課題名(英文) Study of urinary L-FABP as a biomarker for prediction of chronic kidney disease.

研究代表者

片山 泰章 (Katayama, Masaaki)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：70436054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)は、腎臓病の原因となる近位尿細管の酸化ストレスにより尿中に排泄される腎保護蛋白である。本研究では、尿中L-FABP indexは腎機能とは明らかな関連性は認められなかった。また、ネコCKDモデルにおいて、尿中L-FABP indexは既存の腎機能評価マーカーが異常値を示す前に上昇し始めたため、ヒト同様、ネコにおいても慢性腎臓病(CKD)の病態進行予測マーカーとなりうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における独創的な点は、遺伝子操作で作成した腎臓病モデル小動物でなく、伴侶動物であるネコのCKDモデルを当該分野の研究に応用することである。L-FABPは尿細管における酸化ストレスの増加に伴い尿細管が障害される前に速やかに尿中へ排泄される腎保護性蛋白であり、CKD進行予測マーカーになりうる。本研究から得られるデータは、ヒトの臨床研究では入手困難なL-FABPの必要不可欠な基礎データとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The liver type fatty acid-binding protein (L-FABP) is known as a renal protective protein excreted in urine by oxidative stress of the proximal tubule. In this study, no significant correlation between urinary L-FABP index and renal function was identified. In addition, urinary L-FABP index was found to increase before the elevations of serum creatinine and SDMA levels in our feline chronic kidney disease (CKD) model. Therefore, urinary L-FABP index was indicated to be a useful biomarker for prediction of CKD in cats as well as humans.

研究分野：獣医外科学

キーワード：慢性腎臓病 L-FABP ネコ

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性腎臓病（CKD）患者の数は1300万人を上回ると考えられている。CKDは透析治療や腎移植が必要な末期腎不全の予備軍であり、その患者数は高齢化や糖尿病などにより年々増加している。透析患者の数は毎年約1万人規模で増加し平成24年末には30万人を超えており、CKDは新たな国民病の1つとして注目されている。CKD初期では患者は自覚症状を感じることがないため、現実的には病期が進行してからCKDと診断されることがほとんどである。これまでの「CKDをいかに進行させないか」に主眼がおかれていた腎臓病研究から、「いかにCKDを発症させないように予防するか」の研究へ転換する必要がある。そのためには腎臓が障害される（CKD）前段階で、腎臓が上げている“悲鳴”を検出することによりCKD発症の一手前で引き止めることが最善と考える。即ち、NAGや2ミクログロブリンのような従来の腎障害度評価バイオマーカーではなく、腎障害発症の引き金となる腎臓へのストレス負荷度を評価可能な腎障害発症予測バイオマーカーが必要となってくる。

L-FABPはヒトにおいて腎臓の近位尿細管上皮細胞の細胞質に局在する分子量14～15kDaの脂肪酸結合蛋白である。細胞質中のL-FABPは遊離脂肪酸と結合し、脂質をミトコンドリアやリソソームへ輸送する機能を担っており、エネルギー産生・恒常性の維持に重要な役割を果たしている。尿細管周囲に虚血・再灌流傷害が生じた場合、産生された活性酸素が遊離脂肪酸を細胞毒性の強い過酸化脂質へと変化させる。L-FABPはこの過酸化脂質と結合し細胞外（尿細管腔）へ排出することで腎保護作用を示す。

申請者らは先行研究において、ネコの近位尿細管でL-FABPが発現していることを確認した後、ネコの腎虚血再灌流障害モデルを作製し、急性腎不全発症時における尿中L-FABPの推移を生化学的かつ病理組織学的に検討した。近位尿細管細胞質内に認められたL-FABPは従来の腎機能評価マーカーが異常値を示す前、即ち再灌流直後1時間に速やかに尿細管腔への移行が認められた。これらの知見を踏まえ、CKD発症予測バイオマーカーとしてL-FABPが利用できると考えた。

2. 研究の目的

CKDに関する研究は治療に主眼が置かれており、予後予測に関する研究は少ない。中でもL-FABPのCKD発症予測マーカーとしての可能性に着目して行われた研究は皆無である。L-FABPは尿細管における酸化ストレスの増加に伴い尿細管が傷害される前に速やかに尿中へ排泄される腎保護性蛋白であり、腎障害予測マーカーになりうる。本研究の目的は、薬剤処理や遺伝子操作で作成した腎臓病モデル小動物でなく、伴侶動物であるネコを用いて、未だ解明されていないL-FABPのCKD発症予測マーカーとしての有効性を生化学的かつ病理組織学的に明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) サンプル採材

68頭のネコ(5ヶ月齢~21歳齢、未去勢雄:1頭、去勢雄:27頭、未避妊雌:9頭、避妊雌25頭、不明:3頭)から血液及び尿サンプルを採材した。血液(0.5ml)を24ゲージ針を用いて頸静脈より採取した。血液サンプルは遠心分離後、検査までの間血清を-80で保存した。尿サンプルは23ゲージ針を用いて膀胱穿刺により採取し、検査まで-20で保存した。

(2) ELISA

尿中L-FABP濃度は、2段階サンドイッチELISA(Feline L-FABP ELISA kit; CIMIC Holdings)により測定された。尿中L-FABP値は、尿量による測定誤差を避けるために尿中クレアチニン濃度により標準化され、尿中L-FABP indexとして表した。尿中クレアチニン濃度はFolin法により測定された。

(3) ネコCKDモデルの作製

ネコCKDモデル作製にあたっては、健常ネコ2頭(避妊雌、体重:3.2、4.4kg)を用いた。一般身体検査、完全血球計算(CBC)、血清生化学検査、尿検査において異常は認められなかった。

供試動物は手術12時間より絶飲絶食とした。本研究では左尿管結紮により左腎に閉塞性腎症を惹起し、その後左閉塞尿管再開通及び同時に健常右腎摘出することにより腎の線維化誘導(CKD所見)を試みた。尿管閉塞期間は4週間とした。即ち以下の通りである。

・ 左尿管結紮術(day 0)

仰臥位にて無菌的に腹部正中切開により腹腔内へアプローチし、まず尿管結紮術に先立って卵巣子宮摘出術を実施した。その後膀胱よりやや近位の尿管を吸収系を用いて尿管を二重結紮した。生検針を用いて左右腎皮質の生検を行なった後、定法に従い閉腹した。

・ 新尿管膀胱吻合術により左尿管再開通(day 28)

左側尿管結紮4週間後に非吸収系を用いて新尿管膀胱吻合術を行い閉塞尿管の再開通を行なった。また、生検針を用いて左右腎皮質の生検を行なった後、定法に従い閉腹した。

・ 右腎(健常腎)摘出術(day 42)

左腎の機能回復を目的として、左尿管再開通後2週間の待機期間の後、右腎を摘出した。

術後は定期的に血液、尿検査及び腎生検を実施し、腎組織の線維化の程度や腎機能の推移をモニターした。

(4) 免疫組織染色

ネコ腎臓試料は、4%パラホルムアルデヒド0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で一晩4°Cで固定した。

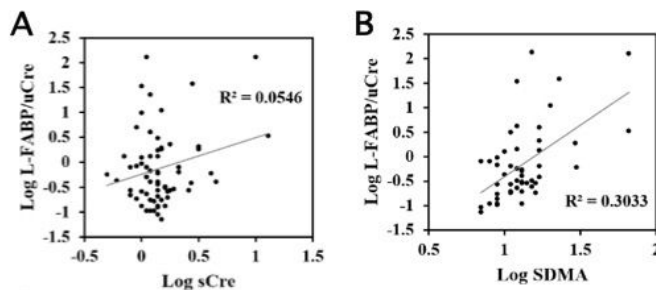
パラフィン切片作成のために、試料は、50%から無水エタノール溶液の段階的な脱水後、キシレンで透徹しパラフィン中に包埋した。腎臓切片は、マイクロトームで4µmに薄切MASコートスライドガラス[スーパーフロストホワイト MAS;松浪硝子工業株式会社]にのせ乾燥させ作成した。脱パラフィン後の切片は内在性ペルオキシダーゼを失活させるために3%過酸化水素水/メタノールで処理後、更に10%ヤギ血清で1時間ブロッキング処理された。L-FABPの免疫染色の為、切片は抗体希釈液[Antibody Diluent, Dako REALTM;Dako]で200倍に希釈した抗L-FABP抗体を室温で1時間インキュベート後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体[EnVision+-Peroxidase-mouse,Dako]を室温で30分間反応させ、抗体反応を視覚化するために、ジアミノベンジン[Liquid DAB+Substrate Chromogen Sysrem;Dako]を使った。最後に切片はヘマトキシリンで対比染色し、光学顕微鏡下で観察した。また、腎臓組織試料はHematoxylin Eosin 染色 Masson Trichrome 染色 -smooth muscle actin(-SMA)免疫染色を実施し評価した。

4. 研究成果

(1) 尿中L-FABPと血清クレアチニンあるいはSDMAとの関連性

本研究では尿中L-FABPと腎機能評価マーカーであるsCreあるいはSDMAとの関連性について68頭のネコで検討した。68頭中11頭は、若齢(<6歳齢)・健康かつsCre及びSDMAが低値(それぞれ<1.2mg/dl、<14µg/ml)であったため、本研究では健常とした。健常群では尿中L-FABP indexは0.1~1.2µg/g uCre(中央値:0.4µg/g uCre)であった。sCreが>1.5mg/dlのネコ24頭中3頭のみでL-FABP indexが明らかな高値(11.1, 38.5, 132µg/g uCre)を示したが、他の21頭は低値(0.1~3.4µg/g uCre、中央値:0.4µg/g uCre)であった。一方で、sCreが<1.5mg/dlのネコ44頭中7頭でL-FABP indexが高値(4.1、4.2、5.2、10.2、28.3、34.7、133.7µg/g uCre)を示した。スピアマンの順位相関係数分析では、68頭ではlog L-FABP/uCre

図 1



とLog sCreの間には有意な相関は認められなかった($\rho:0.0555$; $p=0.653$)。Log L-FABP/uCreはLog sCreとは関連性が認められなかった($R^2=0.0546$)(図1A)。

SDMAは49頭のネコで測定された。Log sCreとLog SDMAの間には明らかな正の相関が認められた($\rho:0.5513$; $p<0.0001$)。Log sCreはLog SDMAとは関連性が認められた($R^2=0.6536$)。また、Log L-FABP/uCreとLog SDMAには相関性が認められた($\rho:0.4777$; $p=0.0005$)。Log L-FABP/uCreはLog SDMAと弱い関連性が認められた($R^2=0.3033$)(図1B)。SDMA

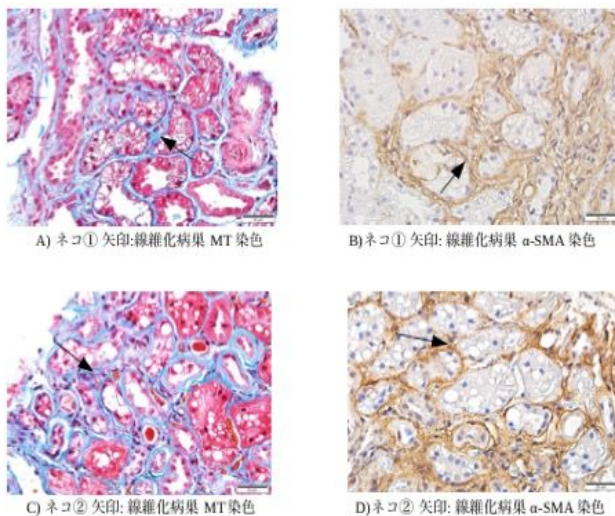
が<14mg/dl のネコ 32 頭中 2 頭で L-FABP index が高値 (4.2、 34.6 $\mu\text{g/g uCre}$) を示したが、他の 30 頭は低値 (0.1~3.2 $\mu\text{g/g uCre}$ 、中央値 : 0.4 $\mu\text{g/g uCre}$) であった。一方で、SDMA が > 14mg/dl のネコ 17 頭中 5 頭で L-FABP index が高値 (4.1, 11.1、 38.5, 132.0、 133.7 $\mu\text{g/g uCre}$) を示した。

以上より、尿中 L-FABP index は、既存の腎機能評価マーカーとは異なり、腎臓への酸化ストレスの程度をリアルタイムに示す可能性が示唆された。

(2) ネコ CKD モデルの作製

ネコ では、sCre は尿管結紮後 2 日目で 4.86mg/dl と最高値を示し、その後徐々に低下し、

図 2



尿管結紮後第 196 日に 1.58mg/dl と参照値範囲内 (0.2-1.6mg/dl) に復した。SDMA は尿管結紮後 5 日目に 90 $\mu\text{g/dl}$ と最高値を示し、尿管結紮後第 196 日目で 14 $\mu\text{g/dl}$ と参照値範囲内 (0-14 $\mu\text{g/dl}$) に復した。UPC は尿管結紮後第 3 週目に一時的に 0.44 とタンパク尿を呈したものの、それ以外では非タンパク尿であった。

ネコ では、sCre は尿管結紮後 3 日目で 2.76mg/dl と最高値を示し、その後徐々に低下し、尿管結紮後第 112 日に 1.59mg/dl と参照値範囲内 (0.2-1.6mg/dl) に復した。SDMA は尿管結紮後 2 日目に 28 $\mu\text{g/dl}$ と最高値を示し、尿管結紮後第 84 日目で 10 $\mu\text{g/dl}$ と参照値範囲内 (0-14 $\mu\text{g/dl}$) に復した。UPC は常時参照値内で非タンパク尿であった。

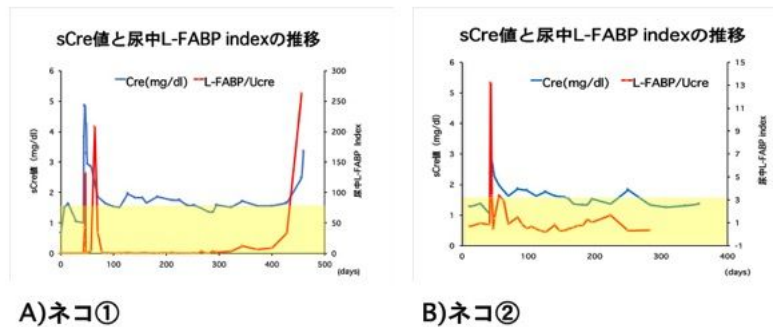
ネコ では day 70 日以降 (健常右腎摘出後 28 日以降)、ネコ では day 161 以降 (健常右腎摘出後 119 日以降) の残存左腎からの生検サンプルでは、腎臓間質にリンパ球や好中球などの炎症細胞の浸潤が認められた。尿細管上皮細胞の脱落はあるものの尿細管としての構造は維持されていた。尿細管間質には線維化が確認された (図 2)。

以上より、猫において尿管閉塞・再開通モデルにより線維化 (CKD IRIS stage 1) を誘発できる可能性が示唆された。

(3) ネコ CKD モデルにおける sCre と尿中 L-FABP index の関連性

4週間の尿管閉塞では、ネコ①で尿中L-FABP indexは右腎摘出後比較的低値を示していたが、sCre値が上昇し始めるおよそ100日前に上昇した(図3A)。一方、尿中L-FABPが継続的に低値

図3



を示したネコ②では右腎摘出後300日を経過してもsCre値の上昇は認められなかった(図3B)。

以上より、ネコにおいて尿中L-FABP indexはCKD進行予測バイオマーカーとなりうることを示唆された。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1件)

- 猫の腎障害における尿中L型脂肪酸結合タンパク(L-FABP)の変動
片山泰章、大高理子、位田貴紀、及川剛、菅谷健、山下哲郎、宮崎雅雄、P473、第160回日本獣医学会学術集会講演要旨集、2017

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮崎 雅雄

ローマ字氏名：MIYAZAKI, Masao

所属研究機関名：岩手大学

部局名：農学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：20392144

研究分担者氏名：佐藤 洋

ローマ字氏名：SATOU, Hiroshi

所属研究機関名：岩手大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：00726606