

令和元年6月15日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09916

研究課題名(和文) 新たな急性期蛋白LRGのループス腎炎における臨床的意義の解明

研究課題名(英文) Investigation of the clinical significance of a new inflammatory molecule LRG in lupus nephritis

研究代表者

藤本 穰 (FUJIMOTO, MINORU)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授

研究者番号：00379190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではループス腎炎の患者尿中にLRGが分泌されることを示し、ループス腎炎マウスモデルでの評価から尿中のLRGが腎尿細管上皮に由来することを示した。アルブミン負荷尿細管障害モデルマウスでの検討により、尿細管におけるLRGの産生は、過剰な尿蛋白再吸収によって傷害された尿細管上皮細胞において、自らが産生するIL-1 β によって誘導されることが明らかになった。また造影剤後の急性腎障害に際しても尿中にLRGが排泄されていた。すなわち、尿中LRGの増加は尿細管障害の進行を反映することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒト腎疾患で尿中にLRGが分泌されること、尿中のLRGは傷害された腎尿細管上皮に由来し、尿細管障害の進行を反映することを示した。尿細管障害は、急性腎障害もしくは慢性腎臓病から腎不全に至る過程において、ほぼすべての腎疾患で共通にみられる病態である。しかし、糸球体障害を反映するマーカーに比して尿細管障害を検出するマーカーは少ない。尿LRGは、ループス腎炎の評価のみならず、より多くの腎疾患において、尿細管障害マーカーとして臨床的に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that LRG is secreted in urine of patients with lupus nephritis. By analyzing lupus model mice, we revealed that LRG in urine is derived from renal tubular epithelial cells. Further analysis on a mouse model of albumin-overloaded renal tubular injury revealed that renal tubular epithelial cells injured due to excessive albumin absorption secrete IL-1 β , which stimulates tubular epithelial cells themselves to produce LRG. LRG secretion in urine was also observed in patients with contrast-induced acute kidney injury. Our findings collectively indicate that LRG secretion in urine is associated with the progression of renal tubular injury. Given that renal tubular injury is the common pathway to end-stage renal failure, urine LRG can be a biomarker of various kidney diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：膠原病学 バイオマーカー 尿検査 尿蛋白 ループス腎炎 尿細管障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) LRG (Leucine rich 2 glycoprotein) は、疾患活動期にある関節リウマチ (RA) 患者血清で上昇する蛋白として、以前われわれのグループが同定した炎症マーカーの候補分子である。LRG は一種の急性期蛋白と考えられるが、LRG は肝臓のみならず病変部位でも発現が上昇するため、病変部位の炎症の程度をよく反映する可能性が示唆される。また、LRG の発現誘導には IL-6 のみならず、さまざまな炎症性サイトカインが関与するため、LRG は CRP 以上に多くの免疫関連疾患のマーカーとなる可能性がある。例えば RA 以外にも、炎症性腸疾患 (IBD) やベーチェット病などの疾患の活動性に依りて LRG が血清中で増加するため、新たな疾患活動性マーカーとして診断薬の開発が進行中である。

(2) われわれのグループでは、LRG が気道炎症の際に上皮細胞から分泌され喀痰中に検出されること、さらに気道炎症のマーカーとして可能性があることを以前報告した。われわれはさらに、LRG が尿中に分泌されうること、ならびに、ループス腎炎患者の尿中で増加していることを見出した。LRG は尿バイオマーカーとして腎病変の評価に有用である可能性がある。

(3) 最近、LRG は炎症病態に直接関与する機能的蛋白であることが明らかになってきた。われわれのグループでも LRG 欠損マウスを独自に作製し、LRG の病態生理学的意義の検討を進めている。LRG がループス腎炎等の腎疾患において病態形成に関わる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、ループス腎炎患者において尿中 LRG がどのような機序で産生されるのかを解明するとともに、LRG が病態形成に直接的に関与する可能性について解明していく。得られた結果から、尿中 LRG をループス腎炎の非侵襲的なバイオマーカーとして応用すること、さらには創薬標的としての LRG の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) マウスモデルによる解析

ヒトでは困難な検体のサンプリングと詳細な解析を行うため、ループス腎炎モデルとして代表的な NZBWF1 マウスを使用して解析を行った。マウスの腎組織、尿、血清を経時的にサンプリングして、腎臓でのサイトカイン発現プロファイルの変化や LRG の発現様式について、Real-time PCR 法、Western Blot 法、免疫組織化学等を用いて検討した。また、尿細管障害のモデルマウスであるアルブミン負荷モデルを利用し、LRG と尿細管障害との関係について追加検討を行った。なお、本モデルは、マウス腹腔内にアルブミンを過剰投与し、尿へのアルブミン排泄を増加させて、腎障害を誘発するものである。

(2) 臨床検体を使用した解析

ループス腎炎と診断され通院中の患者から尿検体の提供を受け、尿中 LRG を ELISA 法にて測定した。また、造影剤使用後に腎障害 (クレアチニン上昇) を来した患者から尿検体の提供を受け、同様に尿中 LRG を ELISA 法にて測定した。

(3) LRG の腎病変における役割に関する解析

LRG 欠損マウスを利用してアルブミン負荷モデルを作製し、尿蛋白の程度や腎臓におけるサイトカイン発現プロファイルについて、野生型マウスとの違いがみられるかどうか検討した。

4. 研究成果

(1) マウスモデルによる解析

尿 LRG 上昇の機序について検討すべく、ループス腎炎モデルマウス (NZBWF1) の解析を行った。同マウスのメスは加齢とともに抗 dsDNA 抗体産生等の免疫異常を呈し、生後約半年で尿蛋白等の腎炎症状をきたす。このモデルの尿、血清、腎臓を経時的に採取したところ、尿蛋白が増加するタイミングで、腎での IL-1 mRNA の上昇、LRG mRNA の上昇と尿中 LRG の増加がみられることが明確になった。また腎の免疫組織化学的検討を行うと、損傷された腎尿細管上皮に LRG の高発現が認められ (図 1)、アルブミンが同じ尿細管上皮に高度に蓄積していることも明らかになった。同マウスより腎尿細管上皮細胞を採取し、炎症性サイトカインにて刺激したところ、IL-1 刺激に特に反応して強い LRG 産生誘導が認められた。以上から尿中 LRG は、腎における炎症の出現、特に IL-1 産生を反映し、ループス腎炎の進展のマーカーになる可能性が示唆された。また、腎における LRG の発現は、尿中のアルブミンが尿細管に再吸収されることと、アルブミンが引き起こす尿細管自体の障害および炎症性変化に関連することが示唆された。

IHC: LRG

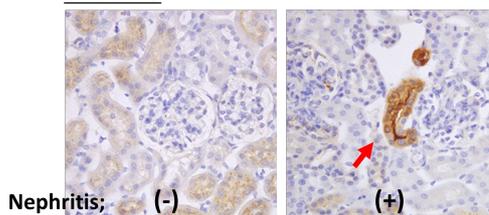


図 1: 腎炎を発病した NZBWF1 マウスの尿細管上皮における LRG の発現 (免疫組織化学染色)
NZBWF1 マウスの腎組織切片において、腎炎発症マウスの尿細管上皮に LRG の局在を認めた。

引き続き、アルブミン負荷尿細管障害モデルを使用して追加検討した結果、ループ腎炎モデルマウスと同様に、過剰なアルブミン再吸収により尿細管上皮が傷害されると、同部の上皮細胞において LRG が高発現していた（図 2）。マウス腎臓から尿細管上皮細胞を採取し、in vitro でアルブミン負荷を行ったところ、上皮細胞における IL-1 発現増加と LRG 発現誘導が認められた。この実験において、IL-1RA(anakinra)を用いて IL-1 シグナルを阻害したところ、LRG の発現が抑制された。この IL-1 産生の機序については、尿細管上皮細胞における自然免疫系シグナル（インフラマソーム）が関与することが示唆されている。以上より、アルブミンで傷害された尿細管上皮からの IL-1 産生に引き続き、LRG の発現が誘導されるということが明らかになり、LRG は尿細管障害とそれに引き続いて起こる炎症性の病態（IL-1 産生）を反映するマーカーであることが示唆された。

一連のマウスモデルの検討によって、尿アルブミンの負荷が腎尿細管での LRG 発現と尿中 LRG の増加に繋がることが明らかになり、その詳細を論文にて公表した(Lee et al, Biochem Biophys Res Commun.2018)。

IHC: LRG

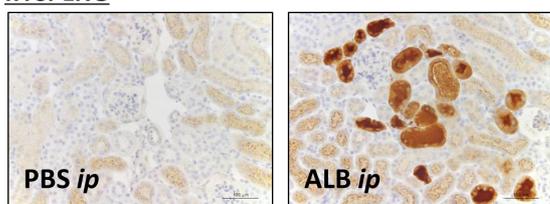


図 2：アルブミン負荷尿細管障害モデルの腎尿細管上皮における LRG の発現（免疫組織化学染色）

アルブミン負荷後の腎組織切片において、尿細管上皮に LRG の局在を認めた。

(2) 臨床検体を使用した解析

本研究において、これまでに集積した SLE 患者について尿中 LRG の測定データをまとめた。SLE 患者を ループ腎炎なし、ループ腎炎の既往があるが現在腎症状なし、ループ腎炎で現在腎症状ありの 3 群に分けて、尿 LRG 濃度を検討したところ、のグループで有意に尿中 LRG が高値であることが明らかになり、尿マーカーとしての可能性が支持された。

一方、マウスモデルの解析結果から、尿中 LRG の上昇に尿細管障害が深く関与することが示唆されていた。そこで、造影剤投与後の急性腎障害患者について検討を行ったところ、同患者の尿でも LRG が上昇していたことから、尿 LRG は尿細管の障害を直接反映して増加しているものと考えられた。

今回の検討から、LRG はループ腎炎の代表的病変部位である糸球体ではなく、尿細管において発現している、という予想外の結果が得られた。尿細管上皮における LRG の発現上昇はアルブミン負荷モデルマウスでも確認することができた。尿細管障害はさまざまな原因からなる急性および慢性腎臓病が腎不全へと進行する中で共通に認められる病態である。尿 LRG の上昇は、種々の腎臓病の進行（尿細管障害への進展）をモニターするマーカーとなることが期待できる。LRG は検査マーカーの候補として国内外から注目されているが、われわれの研究室では、他グループに先行して検査部の自動分析装置に対応した血清 LRG 測定キットを企業とともに開発し、2018年に製造販売承認を取得した。血中 LRG と比較すると、尿中 LRG が何らかの機序によって分解されやすい状態であることがわれわれの検討で示唆されている。これまでのノウハウを活かし、尿に最適化した LRG 測定系についても開発していく。

(3) LRG の腎病変における役割に関する解析

最近の研究から、LRG の病態生理学的機能にも注目が集まっている。これまでに LRG は、TGF β 1 もしくはその受容体と相互作用し、TGF β 1 シグナルを増強することが報告されている。われわれのグループでは、LRG 欠損マウスを使って、LRG が血管新生、炎症、線維化などに重要な役割を果たすことを見出してきた。今回、腎障害における LRG の役割を検討するため、LRG 欠損マウスと野生型マウスに対し、アルブミン負荷により尿細管障害を誘発した。その結果、腎臓での IL-1 の発現量や蛋白尿の程度が LRG 欠損マウスでやや軽減していた。しかしながら、今回は少数例での検討であったため、野生型マウスとの差は統計学的に有意とはいえず、結論を出すに至らなかった。尿細管障害における LRG の重要性については、さらに詳細に検討を行う必要がある。

炎症部位における上皮細胞からの LRG 放出は、呼吸器系、泌尿器系の病態で共通に認められる現象である。上皮が傷害される種々の病態において、LRG が何らかの病態生理学的意味を持つ可能性が高いが、現在、この点に着目した研究は国内外ともに皆無の状況である。病態解明や治療標的探索の意味で興味深いと考えられ、今後も研究を進めていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Lee H, Fujimoto M, Ohkawara T, Honda H, Serada S, Terada Y, Naka T. Leucine rich

-2 glycoprotein is a potential urinary biomarker for renal tubular injury. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2018 Apr 15;498(4):1045-1051.

doi:10.1016/j.bbrc.2018.03.111.

藤本穰、世良田聡、仲哲治 新規急性期蛋白 LRG (leucine-rich alpha-2 glycoprotein) の炎症マーカーとしての評価. リウマチ科、査読無、56(1):111-116, 2016 DOI:無

〔学会発表〕(計4件)

藤本穰 疾患活動性評価の正確化(新しいバイオマーカーの可能性) 第33回日本臨床リウマチ学会(招待講演)2018年11月24日(金)

藤本穰、大河原知治、李賢、世良田聡、三森経世、寺田典生、仲哲治 新規炎症マーカー分子LRG(Leucine rich 2 glycoprotein)の腎疾患における尿検査マーカーとしての可能性 第46回日本臨床免疫学会総会(ポスター発表)2018年11月9日(金)

李賢、藤本穰、本田宏美、大河原智治、世良田聡、谷口義典、堀野太郎、寺田典生、仲哲治 新規急性期蛋白LRG(Leucine-rich -2 glycoprotein)のループス腎炎のマーカーとしての検討 第45回日本臨床免疫学会総会(ポスター発表)2017年9月29日

李賢、藤本穰、本田宏美、宇留島隼人、仲哲治 新たな急性期蛋白LRG(Leucine-rich -2 glycoprotein)のループス腎炎マーカーとしての検討 第60回日本リウマチ学会総会2016年4月21日(ポスター発表)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

高知大学医学部附属病院免疫難病センターホームページ

<http://www.kochi-ms.ac.jp/~nanby>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 李 賢

ローマ字氏名: Hyun, Lee

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。