

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15987

研究課題名(和文)腎ネフロン数減少による慢性腎臓病の発症・進展機序

研究課題名(英文) Mechanisms of development and progression of chronic kidney disease due to reduced renal nephron numbers

研究代表者

神崎 剛 (Kanzaki, Go)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00816473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は日本人のネフロン(糸球体)数が他人種と比較が少ないこと、高血圧や慢性腎臓病の病態下ではさらにネフロン数の減少を示すことを報告してきた。しかしながら、低ネフロン数が糸球体過剰濾過や糸球体肥大を来し、高血圧やCKDの発症や増悪に関わる詳細な機序については未だ十分に解明されていない。本研究は、低ネフロン数を示すラット(HGNラット)モデルやアボリジニーの尿検体を用いて、ネフロン数減少による糸球体代償性変化を分子生物学的に解析することによって、糸球体過剰濾過説のメカニズムを明らかにする。そのことによって、糸球体肥大の概念を再考するとともに、実際の腎臓病診療へ応用することを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネフロン数の減少は、残存糸球体に代償性の糸球体過剰濾過および肥大を生じ、その後、糸球体硬化に至らせ、更なるネフロン減少を引き起こすことが唱えられている。しかしながら、低ネフロン数のみでは腎疾患の感受性に差がないとの報告もある。また低ネフロン数は高血圧およびCKDの病態と関わるとされているが、その因果関係、詳細な機序については未だ十分に解明されていない。日本では8人に1人がCKDに罹患しているとされ、世界的にもその罹患率は高い。申請者は日本人のネフロン数は他人種と比較が少ないことを報告してきたが、日本人の低ネフロン数と高血圧およびCKD発症の機序を解明し日本人CKD診療の貢献を目指す。

研究成果の概要(英文)：We have reported that the number of nephrons (glomeruli) in the Japanese population is low compared to other ethnic groups, and that the number of nephrons is further reduced in hypertension and chronic kidney disease (CKD). However, the detailed mechanisms by which low nephron numbers contribute to glomerular hyperfiltration and glomerular hypertrophy, and to the development and progression of hypertension and CKD, remain to be fully elucidated. In this study, we will elucidate the mechanism of glomerular hyperfiltration by analyzing the molecular biology of glomerular compensatory changes induced by nephron depletion using urine samples from a low nephron count rat model (HGN rat) and Aborigines. The aim of this study was to reconsider the concept of glomerular hypertrophy and to apply it to the actual treatment of kidney disease.

研究分野：腎臓学

キーワード：ネフロン数 慢性腎臓病 高血圧 糸球体過剰濾過

1. 研究開始当初の背景

ネフロン数の減少は、残存糸球体に代償性の糸球体過剰濾過および肥大を生じ、その後、糸球体硬化に至らせ、更なるネフロン減少を引き起こすことが唱えられている(糸球体過剰濾過説)。しかしながら、低ネフロン数のみでは腎疾患の感受性に差がないとの報告もある(Zheng F, et al. Diabetes. 2004)。また低ネフロン数は高血圧およびCKDの病態と関わるとされているが、その因果関係、詳細な機序については未だ十分に解明されていない。

日本では8人に1人がCKDに罹患しているとされ、世界的にもその罹患率は高い。申請者は日本人のネフロン数は他人種と比較し少ないことを報告してきたが、日本人の低ネフロン数と高血圧およびCKD発症の機序を示すまでには至っていない。このことは、剖検腎を用いたネフロン数を測定する従来の方法論の限界を示している。

また総ネフロン数は、人種や出生時体重(母胎の栄養状態や衛生状況など)により決定され、低ネフロン数により引き起こされる代償性の糸球体過剰濾過および糸球体上皮細胞ポドサイトの障害が高血圧やCKD病態形成の中心であることが分かっている。我々はオーストラリア Monash 大学 John Bertram 教授の共同研究により、Physical dissector/fractionator combination 法と呼ばれる現時点において最も正確な方法により日本人のネフロン数を測定した。さらに同方法により測定した他人種における結果と比較し、日本人ネフロン数は、白人ネフロン数より約30%少なく、アボリジニのネフロン数と同程度であることが明らかになった3,4。この結果は、CKDの発症率が高いとされるアボリジニや日本人において共通する潜在的なリスク因子として低ネフロン数が存在することを示しており、CKDの発症機序を考える上で重要と考えられる。しかしながら、正確なネフロン数測定には病理解剖により得た剖検腎献体と多大な労力・時間・費用を必要とするため、新たな計測方法やバイオマーカーの開発が望まれている。ポドサイトは腎糸球体血管系蹄壁を覆う上皮細胞で、糸球体の正常な構造および濾過機能の維持に重要である。また、糸球体障害の過程において、ポドサイトやポドサイト構成成分が尿中に排泄されることが知られている。ポドカリキシンはポドサイトに発現する糖タンパクである。これまでの研究により、尿中ポドカリキシン濃度は各種糸球体性腎疾患で上昇し、組織学的な重症度などと関連するといったことが明らかになっている。そこで申請者は、尿中ポドサイト障害マーカーポドカリキシンの測定により、低ネフロン数患者を同定することを発案した。

2. 研究の目的

本研究は、低ネフロン数モデルであるHGNラットを使用し、低ネフロン下における高血圧およびCKD発症の機序を分子生物学的・病理形態学的に解析を行なうことを目的としており、以下、具体的な研究実施状況を提示する。HGNラットは、日本獣医生命科学大学により樹立した低ネフロン数を呈しているラットモデルであり、腎臓の発生過程でネフロンが減形成されるために腎線維化を自然発症し、最終的に腎不全へと進行するとされている。CKD進行には中長期的期間(6~9ヶ月)が必要となる。現在、腎組織所見からはHGNラットの糸球体密度(ネフロン数)は明らかに少なく、代償的に糸球体肥大を呈していることが分かった。また蛋白尿や腎障害を早期に呈しており、各種介入群では腎障害の増悪傾向が示唆されている。ただし、今後の実験計画としては、下記の通り、モデルをMunich Wistar Fromter (MWF) rat strain、または母胎低栄養ラットモデルに変更し、総ネフロン数、single nephron GFR、糸球体内の遺伝子・蛋白・細胞発現の解析を施行する予定である。

一方、Menzies School of Health Research Dr. Gurmeet Singhらは、An Australian Aboriginal birth cohort (ABC study)として、1987年1月から1990年3月にRoyal Darwin Hospitalにおいて出産したオーストラリア先住民アボリジニの母親に対してコホート研究参加のリクルートを行った7。686名の母親が研究参加に同意し、児の出生時体重、体格、母親の社会経済的状態や喫煙、飲酒などの生活習慣などが記録された。このコホートでは、CKDのリスク因子である低出生体重が122例(17.8%)、胎児発育不全167例(24%)、早産63例(10%)と高率であったことが報告されている。さらに、1998-2001年(wave2)、2006-2008年(wave3)、2013-2015年(wave4)に同意した参加者を対象として追跡調査を行った。Wave4では、459例が調査に参加し、学歴や就業などの社会経済的状態、喫煙、飲酒、運動などの生活習慣、体格、血圧、糖脂質代謝パラメータなどに加え、腎機能指標として尿中アルブミン、推定糸球体濾過量(eGFR)、超音波による腎形態評価が実施された。

また、同グループは、ABC study と同時期に誕生した非アボリジニ 196 例を Top End Cohort(TEC) study としてリクルートした。さらに、ABC study wave4 と同時期の 2013 年から 2015 年に TEC study wave2 として追跡調査を行なった 8。

そこで、低出生体重や早産の頻度が高く、ネフロン数の低値や高いCKD有病率が報告されるオーストラリア先住民アボリジニを対象としたコホート研究に着目した。本研究では、アボリジニおよび非アボリジニを対象としたコホート研究で採取された尿検体を用い、ポドサイト障害マーカーと考えられる尿中ポドカリキシンと出生時および追跡調査時の臨床情報との関連について解析し、尿中ポドカリキシンの臨床的意義、特に低ネフロン数と強く関連することが知られる低出生体重および腎障害との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

モデル動物研究

HGN ラットは、日本獣医生命科学大学鈴木浩悦教授らが樹立した低ネフロン数を呈しているラットモデルであり、腎臓の発生過程でネフロンが減形成されるために腎線維化を自然発症し、最終的に腎不全へと進行する (Suzuki H, et al. Nephrol Dial Transplant. 2005)。CKD 進行には中長期的期間 (6~9 ヶ月) が必要なため、3 ヶ月毎の経時的な腎組織・血液・尿のサンプリングを施行する。そこで、疾患モデル成立までの期間が短い【目的 2】の介入実験をまず行なう。【目的 1】の実験を行っている間に、あらかじめ【目的 2】の糸球体過剰濾過因子の介入実験を施行し、CKD モデルが成立した後、その病態生理・病理学的解析を行なう。

ヒト研究対象

本研究では、2013 年から 2015 年に実施された ABC study wave4 および TEC study wave2 において採取された尿検体を解析した。

尿中ポドカリキシン

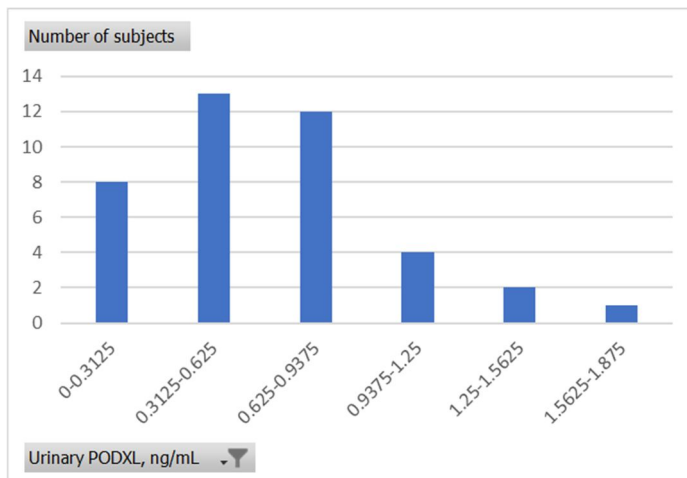
尿検体は随時スポット尿を採取し、-80 で保存された。尿中ポドカリキシン濃度をサンドイッチ ELISA 法 (PODXL ELISA Kit (Human) : 96 Wells (OKEH02869), Aviva Systems Biology) により測定した。尿希釈の影響を最小限にするため、得られた尿中ポドカリキシン濃度を尿中クレアチニン濃度で除して標準化した。

統計解析

得られた尿中ポドカリキシンの測定結果は、Menzies School of Health Research に送られ、臨床情報との関連を解析する。具体的には、1) 出生時情報である出生時体重、在胎週数、母親の生活習慣因子との関連、2) 尿採取時の腎臓関連指標である腎機能、尿中アルブミン排泄量、超音波により測定した腎形態、血圧との関連を調べる。また、人種、性別、体格、糖脂質パラメータ、生活習慣、社会経済的状態を補正した上で、尿中ポドカリキシンを規定する因子に関して重回帰分析を行う。

4. 研究成果

Menzies School of Health Research Dr. Gurmeet Singh の協力により、ABC study Wave4 で採取された尿サンプル 380 サンプル、TEC study Wave2 で採取された 102 サンプル、合計 482 サンプルが Monash 大学に輸送された。これらのうち、一部の尿検体を使用し、ELISA による測定条件の検討を行い、至適条件を得た。ABC study のうち 40 検体において尿中ポドカリキシン濃度を測定した結果を図 1 に示す。現在、残りのサンプルに関して尿中ポドカリキシン濃度の測定を行っている。研究の客観性を保つため、各サンプルの臨床情報は伏せられており、全サンプルの尿中ポドカリキシン濃度測定終了後、Menzies School of Health Research において臨床情報との関連についての解析が予定されている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Go Kanzaki, Nobuo Tsuboi, Akira Shimizu, Takashi Yokoo	4. 巻 15
2. 論文標題 Human Nephron Number, Hypertension, and Renal Pathology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anat Rec (Hoboken)	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） 10.1002/ar.24302	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10件（うち招待講演 2件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Go Kanzaki, Victor G. Puellles, Luise A. Cullen-McEwen, Wendy E. Hoy, Yusuke Okabayashi, Nobuo Tsuboi, Akira Shimizu, Michael D. Hughson, Takashi Yokoo, and John F. Bertram
2. 発表標題 Racial differences in nephron number: role of body size, kidney weight and cortical volume in adult subjects among five populations.
3. 学会等名 国際DOaD学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Go Kanzaki, Victor G. Puellles, Luise A. Cullen-McEwen, Wendy E. Hoy, Yusuke Okabayashi, Nobuo Tsuboi, Akira Shimizu, Michael D. Hughson, Takashi Yokoo, and John F. Bertram
2. 発表標題 Total nephron number and single nephron glomerular filtration rate in Japanese subjects
3. 学会等名 国際DOaD学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神崎 剛、坪井 伸夫、岡林 佑典、清水 章、 John Bertram、横尾 隆
2. 発表標題 日本人ネフロン数の特徴と人種間比較
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神崎 剛、坪井 伸夫、岡林 佑典、清水 章、 John Bertram、横尾 隆
2. 発表標題 人種間比較からみた日本人ネフロン数の特徴
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Go Kanzaki, Victor Puellès, Luise Cullen-McEwen, Yusuke Okabayashi, Nobuo Tsuboi, Akira Shimizu, Takashi Yokoo, John Bertram
2. 発表標題 TOTAL NEPHRON NUMBER AND SINGLE NEPHRON GFR IN CKD SUBJECTS
3. 学会等名 55th ERA-EDTA Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神崎 剛、坪井 伸夫、岡林 佑典、小倉 誠、清水 章、 John Bertram、横尾 隆
2. 発表標題 慢性腎臓病患者におけるネフロン数と単一糸球体過濾過量(SNeGFR)
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神崎 剛
2. 発表標題 日本人のネフロン数と欧米人のネフロン数の差異をどう考えるか？
3. 学会等名 第7回日本DOHaD学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神崎 剛、大庭梨菜、佐々木峻也、岡林佑輔、春原浩太郎、小池健太郎、小林賛光、山本 泉、坪井伸夫、横尾 隆
2. 発表標題 Single Nephron GFR から見たタンパク質摂取量と糸球体過剰濾過の関連性
3. 学会等名 第22回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神崎 剛、坪井 伸夫、岡林 佑典、小倉 誠、清水 章、横尾 隆
2. 発表標題 日本人のネフロン数からみた慢性腎臓病の病態解析
3. 学会等名 第115回日本内科学会講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神崎 剛、坪井 伸夫、岡林 佑典、小倉 誠、清水 章、横尾 隆
2. 発表標題 日本人ネフロン数の特徴
3. 学会等名 第115回日本内科学会講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Anatomy and Developmental Biology http://www.med.monash.edu.au/anatomy/research/kidney-development-disease-regeneration-group.html 東京慈恵会医科大学腎臓・高血圧内科 http://www.jikei-kidneyht.jp/
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストラリア	Monash University			