様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ６ 月　 ８ 日現在

機関番号：２４３０３
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ１６０１４

研究課題名（和文）慢性腎臓病の尿細管間質病変形成における接着分子CADM1の役割

研究課題名（英文）Role of cell adhesion molecule 1 (CADM1) in chronic kidney disease

研究代表者
高島　康利（Takashima, Yasutoshi）

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：１０７９７０７０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：慢性腎臓病患者の尿中CADM1 shedding産物濃度測定結果と腎臓組織障害との関連性を127例の患者検体を用いて解析した。44例において健常者群と比較して尿中CADM1濃度の有意な上昇を確認した。病理組織学的な尿細管間質性病変(上皮変性、間質性炎症、および間質線維化)のスコアリング結果と尿中CADM1濃度との間に相関関係は示されなかった。しかし、病理組織学的スコアと腎機能(推定GFR値)の間には弱い逆相関(R2 = 0.292)が認められ、この傾向は尿中CADM1濃度が高い患者で顕著であったことから、尿中CADM1は慢性腎臓病の病勢を反映するバイオマーカーの一候補になりえると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義
尿中CADM1 shedding産物は尿細管でのCADM1 shedding状態を反映すると推定され、尿細管変性を直接的に推測しうる新マーカーとして意義深いと考える。今後、CADM1と相互作用を示すと推定されるCRTAM陽性細胞障害性Tリンパ球やCRTAM陽性NK (Natural killer) 細胞の尿細管間質病変形成への関与を証明できれば、CADM1が慢性腎臓病の病態理解に新機軸をもたらすと期待される。

研究成果の概要（英文）：Elevation of urinary CADM1 concentration was seen in the patient (n=44) based on various glomerulonephritis and nephropathy, but not in the rest of patients (n=83). Although urinary CADM1 concentration didn`t have no correlations with pathological tubulointerstitial injuries (epithelial degeneration, interstitial inflammation, and fibrosis), there was a weak inverse correlation between pathological injury scores and estimated glomerular filtration ratio. Notably, this correlation gradually increased in patients with high level CADM1 concentrations, and reached a maximum at a cutoff of 1,569 pg/ml. These results suggest that urinary CADM1 may be a useful marker indicating tubulointerstitial damage.

研究分野：腎臓病理学

キーワード：慢性腎臓病　CADM1　尿細管間質炎　NK細胞　T細胞　バイオマーカー

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

IgCAM 型接着分子 CADM1(Cell adhesion molecule 1)は肺胞上皮・尿細管上皮などの細胞膜上に発現しており、細胞外領域が酵素的に切り離される shedding を受ける。肺気腫や間質性肺炎ではこの shedding が亢進しており、全長型 CADM1 の減少及び細胞内断片(αCTF)の蓄積が肺胞上皮のアポトーシスを誘導する。慢性腎臓病では尿細管上皮の変性・アポトーシスが尿細管間質病変を惹起し、病態重篤度や予後の決定因子となる。慢性腎臓病の残腎機能は糸球体障害よりも尿細管間質障害の程度とより強く相関することから、尿細管間質の慢性炎症と間質線維化が不可逆的な腎機能障害の主病態と認識されているが、本病態の機序に関する研究は少ない。

２．研究の目的

本研究課題では、慢性腎臓病の尿細管上皮における CADM1 発現をウエスタン法・免疫染色にて解析し、 CADM1 shedding と尿細管間質病変形成との相関性を調べる。また、shedding によって尿細管上皮から尿中に放出される CADM1 細胞外領域断片(NTF)を検出する ELISA を樹立し、CADM1 細胞外領域断片(NTF)の尿中濃度が慢性腎臓病の尿細管障害マーカーとして有用かを検討する。

３．研究の方法

Ａ．慢性腎臓病における CADM1 発現と CADM1 shedding の尿細管上皮変性への関与

１．慢性腎臓病における CADM1 発現の実態解明

慢性腎臓病に罹患した患者の手術や腎生検時に採取した腎病理標本パラフィン切片を用いて CADM1 のウエスタンブロット法を行い、CADM1 shedding 率を算出した。サイトケラチン 7 などの上皮マーカーで上皮組織量を標準化し、上皮細胞当たりの CADM1 全長型及び Shedding 後に細胞内に残る CADM1 断片(αCTF)の発現量を算出した。αCTF はミトコンドリアに蓄積してアポトーシスを引き起こすことから、αCTF 特異抗体を用いて免疫染色を行い、尿細管上皮細胞におけるαCTF の局在を調べた。

２．尿細管上皮細胞の変性・アポトーシスと CADM1 shedding との相関性を検討

尿細管上皮細胞の変性・アポトーシス(尿細管上皮細胞の空胞変性や上皮細胞の管腔内への脱落、核濃染・ピクノーシス等)や間質の炎症・線維化を病理学的にスコア化するとともに、TUNEL アッセイ等による免疫染色にて尿細管上皮のアポトーシスを定量化して、CADM1 発現量や shedding 率との相関性を解析した。

Ｂ．CADM1 細胞外断片（NTF）尿中濃度測定：バイオマーカーとしての意義

１．サンドイッチ ELISA 法の樹立

CADM1 細胞外領域認識単クローン抗体(3E1 と 9D2)の一方を固相化し他方をビオチン化することで CADM1 細胞外断片（NTF）を高感度に検出するサンドイッチ ELISA 法を樹立した。

２．尿中 NTF 濃度の基準値を決定し、慢性腎臓病患者での尿中 NTF 濃度分布を解析

CDDM1 Shedding 後に生じる尿中 CADM1 細胞外断片(NTF)濃度の基準値を確定するとともに、腎生検の病理学的スコア(上皮変性や間質炎症)や腎機能検査(血清クレアチニン濃度、血清尿素窒素濃度、尿中タンパク排泄量、血尿の程度）との相関性を調べた。加えて原疾患の鑑別診断に有効かを検討した。

Ｃ．尿細管間質病変での CADM1－CRTAM 結合の可能性

１．細胞傷害性 T リンパ球/NK 細胞における CRTAM 発現

病理標本の多重免疫蛍光法により CD8 陽性 T リンパ球や NK(Natural killer)細胞における CRTAM 発現の確認を試みている。CD8 陽性/CRTAM 陽性 T リンパ球や CRTAM 陽性 NK 細胞が変性尿細管上皮近傍の間質に好んで浸潤し、尿細管上皮傷害性を示していないか病理形態学的に調査している。

２．尿細管間質病変形成における CRTAM 陽性 T リンパ球/CRTAM 陽性 NK 細胞の意義

CD8 陽性/CRTAM 陽性 T リンパ球や CRTAM 陽性 NK 細胞の間質浸潤の程度と、次の測定値との相関性を調べている。①ELISA での尿中 CADM1 shedding 産物(NTF)濃度、②ウエスタンブロット法での CADM1 shedding 率、③尿細管上皮細胞傷害の重篤度(上皮変性、間質性炎症、および間質線維化の障害スコア)。

４．研究成果

慢性腎臓病の原疾患と知られる糸球体腎炎および代謝性腎症患者の尿中 CADM1 shedding 産物である CADM1 細胞外断片(NTF)濃度測定結果と腎臓組織障害との関連性を検討した。127 例の患者検体を解析して、44 例において健常者群と比較して尿中 CADM1 細胞外断片(NTF)濃

度の有意な上昇を確認した。病理組織学的な尿細管間質性病変(上皮変性、間質性炎症、および間質線維化)のスコアリング結果と尿中 CADM1 濃度との間に強い相関関係は示されなかった。 しかし、病理組織学的スコアと腎機能(estimated glomerular filtration ratio)の間には弱い逆相関($R^2 = 0.292$)が認められ,この傾向が尿中 CADM1 濃度高値の患者群で顕著であったことから、尿中 CADM1 は慢性腎臓病の病勢を反映するバイオマーカー分子の一候補になりえると考える。

本研究は所属研究室の研究成果に申請者独自の視点を加味して着想したものであり、独創性・実現性はともに高く、引き続き細胞障害性 T リンパ球や NK 細胞の活性化への CADM1 と CRTAM の相互作用の関与を検証中であり、将来的に CADM1 が慢性腎臓病の病態理解に新機軸をもたらすと期待している。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Hagiyama Man、Nakatani Yoshihisa、Takashima Yasutoshi、Kato Takashi、Inoue Takao、Kimura Ryuichiro、Otani Tomoyuki、Sato Yasufumi、Mori Hideo、Arima Shuji、Ito Akihiko	４．巻 7
２．論文標題 Urinary Cell Adhesion Molecule 1 Is a Novel Biomarker That Links Tubulointerstitial Damage to Glomerular Filtration Rates in Chronic Kidney Disease	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	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） 10.3389/fcell.2019.00111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 ―

１．著者名 Nakatani Y, Kawakami H, Ichikawa M, Yamamoto S, Otsuka Y, Mashiko A, Takashima Y, Ito A, Nakagawa K, Arima S	４．巻 36
２．論文標題 Nivolumab-induced acute granulomatous tubulointerstitial nephritis in a patient with gastric cancer.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Investigational new drugs	６．最初と最後の頁 726-731
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10637-018-0596-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 高島 康利、塩津 弥生、草場 哲郎、玉垣 圭一、西村 綾子、森永 友紀子、宮川 文、伊藤 彰彦、小西 英一
２．発表標題 血管内皮細胞障害を反映する遠位尿細管由来バイオマーカーの検討
３．学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
４．発表年 2020年

１．発表者名 高島 康利、原田 俊平、礒島 喜孝、西村 綾子、森永 友紀子、宮川 文、牛込 秀隆、伊藤 彰彦、小西 英一
２．発表標題 移植腎における遠位尿細管変性の病理学的検出とその意義
３．学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
４．発表年 2020年

１．発表者名 高島 康利、桝 和子、原田 俊平、礒島 喜孝、西村 綾子、森永 友紀子、宮川 文、牛込 秀隆、小西 英一
２．発表標題 糖尿病性腎症におけるendo-sulfatase1(Sulf1)の腎保護作用の検討
３．学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
４．発表年 2020年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

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