

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08681

研究課題名(和文)新規尿中バイオマーカートロンビンの腎疾患診断・治療における有用性の検討

研究課題名(英文)Verification of the utility of urinary thrombin levels as a novel urinary biomarker for differential diagnosis of renal diseases

研究代表者

安達 政隆 (Adachi, Masataka)

熊本大学・病院・准教授

研究者番号：90398206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症の際に産生されるセリンプロテアーゼであるトロンビン(TB)に着目し、尿中TB濃度を定量的に測定可能なELISAの系を用いて各種腎疾患で大規模に尿中TB濃度を測定し、尿中TB排泄量を算出した。TB尿の出現頻度は膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN)、巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)、悪性腎硬化症で高いことが明らかとなった。また、顕微鏡的多発血管炎、糖尿病性腎症、IgA腎症、MPGN、悪性腎硬化症で尿中TB排泄量が多いことが確認され、尿中TB排泄量の測定が、腎疾患診断の補助となりうる可能性が示唆されたが、活動性半月体の出現率と関連しなかった。現在、尿中TB排泄量を規定する因子について検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに腎疾患患者でELISA測定系を用いて大規模に尿中TB排泄量を検討した研究はない。尿中TB排泄量を測定することにより、腎疾患の早期診断、疾患活動性の評価や疾患再発の早期発見、腎疾患の予後の推測、治療効果の判定が可能となれば、迅速な診断かつ最適な治療介入により疾患の増悪による末期腎不全への進行を抑制することに繋がり、臨床医学的見地からも多大な恩恵をもたらすことが期待され、先進的な研究になると考える。最終的には年々増加し続けている透析導入患者数を減少させることが可能となれば、CKD領域における医療費の抑制に繋がり、医療経済的にも極めて意義深いものになると考える。

研究成果の概要(英文)：Thrombin (TB) is produced during glomerular inflammation and secreted in urine, however the TB levels in several kidney diseases are unknown. We focused on urinary TB and quantitatively measured urinary TB levels in 170 patients with biopsy-proven renal diseases using the original ELISA system. We further examined if urinary TB secretion can be a novel urinary biomarker for diagnosing renal disease using the urinary TB-creatinine ratio (TB/Cr). Thrombinuria was seen in membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN, 50%), focal segmental glomerulosclerosis (FSGS, 50%), malignant nephrosclerosis (50%), diabetic nephropathy (38.5%), minimal change nephrotic syndrome (MCNS, 36.4%), membranous nephropathy (MN, 31.6%), microscopic polyangiitis (MPA, 30.4%), IgA nephropathy (25.0%), Amyloid light chain amyloidosis (10%), and lupus nephritis (9.1%). Thus, these results show that urinary TB measurement could be useful as an adjunct to diagnose MPGN, FSGS, and malignant nephrosclerosis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：セリンプロテアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

我々はラット腎臓より GPI アンカー型/分泌型セリンプロテアーゼ(SP)であるプロスタシンを単離し、プロスタシンによる上皮型 Na チャネル(ENaC)の活性化、アルドステロン(Aldo)によるプロスタシンの発現亢進、Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける食塩負荷時の尿中プロスタシン排泄の増加とそれに伴う ENaC の活性化、Dahl ラットでのプロスタシン活性を抑制する合成セリンプロテアーゼ阻害薬(SPI)の降圧効果と腎障害抑制効果、SPI によるプロスタシンを介した ENaC の切断・活性化の抑制、5/6 腎摘出 CKD モデルラット、アデニン負荷 CKD ラット、一側尿管結紮腎線維化モデルラットやアルドステロン・食塩投与ラットにおける抗炎症・線維化・酸化ストレス作用を介した SPI の糸球体硬化および間質線維化抑制効果などを証明し、これまで一貫して SP と高血圧、腎障害発症メカニズムを解明してきた。

近年、我々はメタボリック症候群モデルラットにおいて、糸球体上皮細胞障害とともに尿中に複数の SP の活性亢進を認めることを報告し、これまでの研究で検討した腎疾患モデル動物においても尿中 SP 活性の亢進を確認している。以上のことから、CKD の原因となる腎疾患では糸球体内で何らかの SP が活性化され、活性化された SP は尿中に排泄されていると考えられる。

血液凝固に関与するトロンピン(TB)は SP 活性を有し、炎症や細胞修復に関与することが多くの論文で報告されており、半月体形成性糸球体腎炎などは糸球体内でフィブリンが形成されることから、糸球体の炎症により糸球体内で TB が産生され、フィブリンを形成している可能性が示唆されてきた。これまで、急速進行性糸球体腎炎(RPGN)において糸球体の管外増殖性病変(変月体)に浸潤してきた macrophage が組織因子(TF)を発現し、その TF によって血液中から尿中に濾過された外因系凝固因子群が活性化される結果、最終的にプロトロンピンが TB となり、尿中 TB 活性が上昇することが報告されている。このことから TB が腎疾患の診断ならびに治療効果の判定に有用な新規尿中バイオマーカーとなりうる可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、SP である TB に着目し、既報の尿中 TB 活性の測定ではなく、TB 活性測定より約 10 倍感度の高い尿中 TB 濃度を定量的に測定可能な ELISA プレートを用いた新たな測定系を使用して RPGN だけでなく、糖尿病性腎症をはじめとする各種腎疾患で大規模に尿中 TB 濃度を定量的に測定し、尿中 TB 排泄量を評価することによって、腎疾患の診断ならびに治療効果の判定に新規尿中バイオマーカーとして TB が有用であるか否かを検討することである。

## 3. 研究の方法

腎疾患の診断ならびに治療効果の判定に新規尿中バイオマーカーとして TB が有用であるか否かを検討するために以下の方法で研究を行った。

(1) 本学倫理委員会へ「尿中 TB 定量および TB 活性測定による新規腎疾患診断法の確立に関する研究」を申請し、承認後に腎生検を施行する種々の腎疾患の同意を得て尿検体を収集する。

(2) 2 種類の TB 抗体含有腹水約 700  $\mu$ L から TB 抗体をスピンカラムで精製し、精製後に TB 抗体量を測定、さらにウエスタンブロットや銀染色を行い、TB 抗体の精製度についても確認した後、精製した TB 抗体をプレートに固相化し、現在、新たに TB 測定用の ELISA プレートを作製する。

(3) 作製した ELISA プレートを用いて尿中 TB の a) 保存温度および b) 凍結融解における安定性について検討する。TB 陰性の検体尿に トロンピンを添加し、4、10 または 37 に 1、2、3、5 時間保温した後、トロンピン濃度を測定する。さらに 1、2、3 回まで凍結融解したサンプルを同様に測定する。

(4) 作製した ELISA プレートをを用いて腎生検を施行した種々の腎疾患患者から回収した約 200 例分の尿中 TB 濃度を測定し、尿中 TB 濃度/尿中 Cr から尿中 TB 排泄量( $\text{ng/gCr}$ )を算出する。さらに、尿中 TB 排泄量が多い MPA 患者において、測定した尿中 TB 排泄量と腎生検組織標本からカウントした活動性半月体形成性糸球体の出現頻度((細胞性半月体形成性糸球体数 + 線維細胞性半月体形成性糸球体数) / 全半月体形成性糸球体数)との相関を統計学的に評価する。

(5) (4)で測定した中で尿中 TB 濃度が高値であった半月体形成性糸球体腎炎および糖尿病性腎症患者の腎生検組織標本を脱パラフィン後、マウス抗ヒト TF 抗体 (CL3807、Novus Biologicals、Mouse anti human TF monoclonal antibody) 2~4 $\mu\text{g/mL}$  を 37 で 1 時間 (抗体希釈液は Antibody Diluent (S0809, Dako) を使用) 添加、TBS で 5 分 2 回洗浄後、発色ファーストレッド 基質キットを用い 4~6 分間処理し、核染色 (マイヤー・ヘマトキシリン) を 10~30 秒間を行い、糸球体における TF の免疫染色を施行する。TF 免疫染色後に腎生検組織標本内の TF 陽性細胞数と全糸球体数をカウントし、尿中 TB 排泄量と TF 陽性細胞数/全糸球体数との相関を統計学的に評価する。

## 4. 研究成果

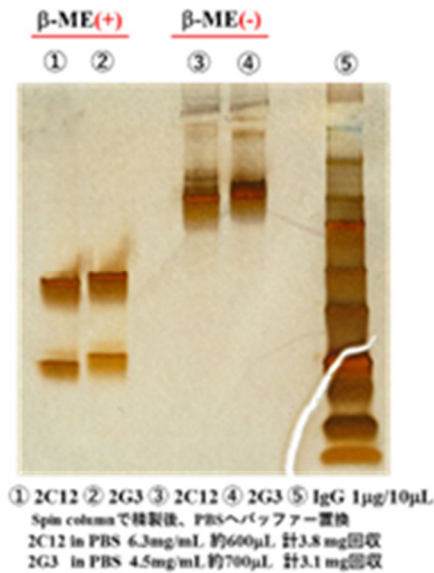
(1) 本学倫理委員会へ「尿中 TB 定量および TB 活性測定による新規腎疾患診断法の確立に関する

る研究」を申請し、承認後に腎生検を施行する種々の腎疾患の同意を得て尿検体の収集を開始し、現在まで約 400 例分の尿を回収し、保存した。これらの尿の一般尿生化学検査を提出し、基本となる生化学データを収集した。

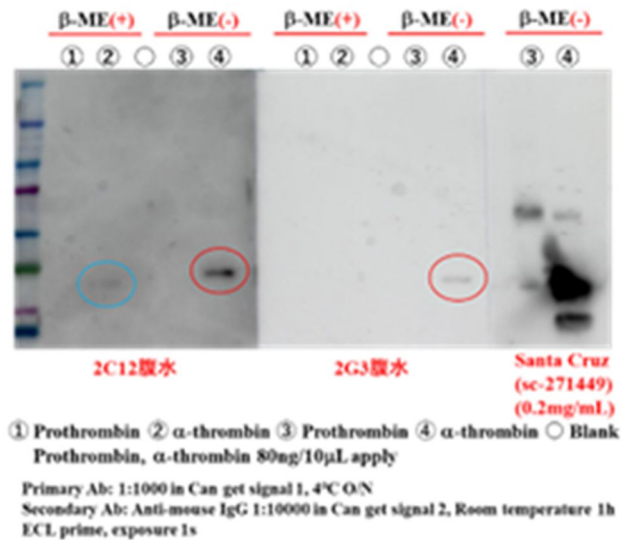
(2) 2C12 抗体をプレートに固相し、2G3 抗体を標識抗体としたサンドイッチ ELISA プレートの作製

2 種類の TB 抗体(2C12 抗体および 2G3 抗体)含有腹水約 700  $\mu$ L から TB 抗体をスピニングで精製後に TB 抗体量を測定した結果、それぞれ約 3mg の抗体量の回収を確認した。さらに

トロンビン抗体 2C12, 2G3 含有腹水の銀染色

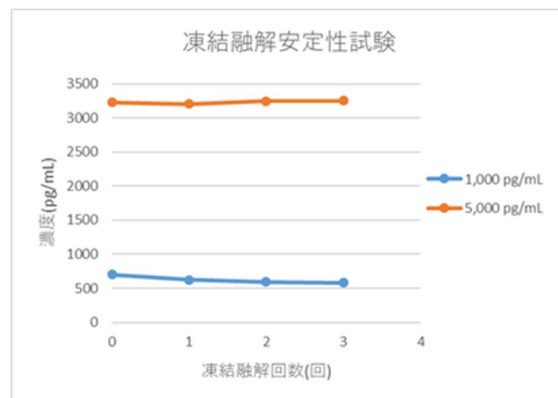
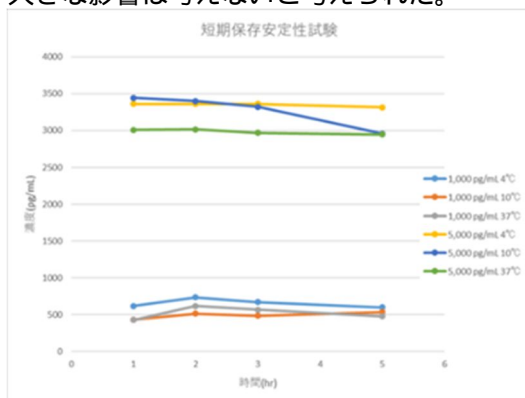


トロンビン抗体 2C12, 2G3 含有腹水のWB



ウエスタンブロットや銀染色を行い、TB 抗体の精製度についても確認した後、精製した TB 抗体をプレートに固相化し、新たに TB 測定用の ELISA プレートを作製した。

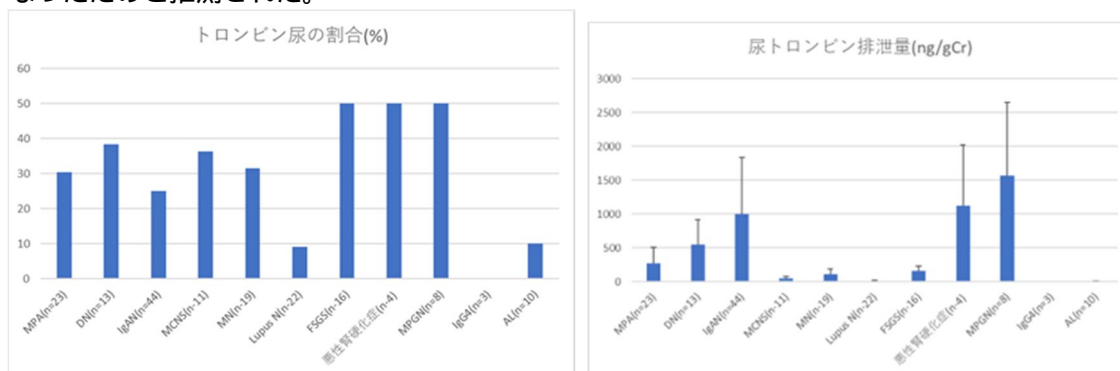
(3) 作製した ELISA プレート用いて尿中 TB の①保存温度および凍結融解における安定性について検討した。TB 陰性の検体尿に TB を添加し、4、10 または 37 に 1、2、3、5 時間保温した後、TB 濃度を測定した。さらに 1、2、3 回まで凍結融解したサンプルを同様に測定した。①保存温度による尿中 TB 濃度の時系列変化の検討において、尿中 TB は 4、10、37 の保存状態で 5 時間経過後も安定していると考えられ、ELISA 法による測定結果に大きな影響は与えないと考えられた。凍結融解回数による尿中 TB 濃度の変化の検討において、尿中 TB は 3 回までの凍結融解に対して安定していると考えられ、ELISA 法による測定結果に大きな影響は与えないと考えられた。



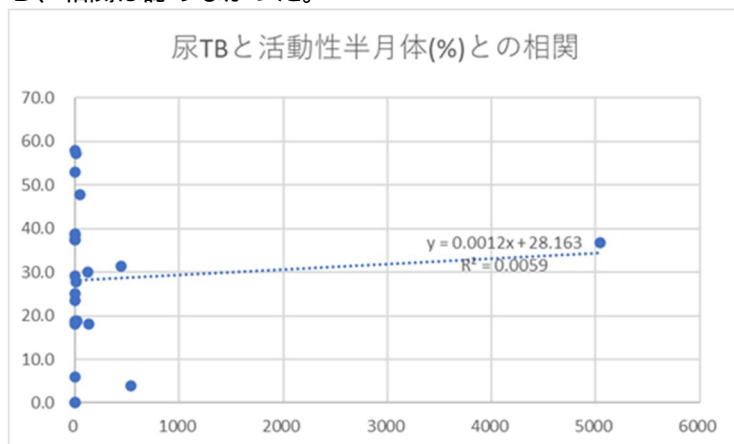
保存温度による尿中 $\alpha$ -TB 濃度の時系列変化 凍結融解回数による尿中 $\alpha$ -TB 濃度の変化

(4) 作製した ELISA プレートを用いて腎生検を施行した種々の腎疾患患者から回収した約 200 例分の尿中 TB 濃度を測定した。尿中 TB 濃度の測定感度を 20 pg/mL とした場合、膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN)で 50%、巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)で 50%、悪性腎硬化症で 50%と TB 尿の出現頻度が高いことが確認された。また、顕微鏡的多発血管炎(MPA)で  $276.6 \pm 1148.7$  ng/gCr、糖尿病性腎症(DN)で  $552.6 \pm 1313.5$  ng/gCr、IgA 腎症(IgAN)で  $1001.5 \pm 5531.5$  ng/gCr、MPGN で  $1567.1 \pm 3062.8$  ng/gCr、悪性腎硬化症で  $1126.1 \pm 1787.2$  ng/gCr と尿中 TB 排泄量が多いことが確認された。既報の尿中 TB 活性が上昇する腎疾患と今回の尿中 TB 濃度が検出さ

れる腎疾患の結果が異なった原因として、尿中 TB 濃度の測定は尿中 TB 活性の測定より約 10 倍測定感度が高いことが考えられた。尿中 TB 活性の測定では MPA や DN で TB 活性が高値であったが、尿中 TB 濃度の測定では、MPA や DN だけでなく、MPGN や IgAN など種々の腎疾患で尿中 TB 活性として測定されていなかったものが、尿中 TB 濃度としては検出されるようになったためと推測された。

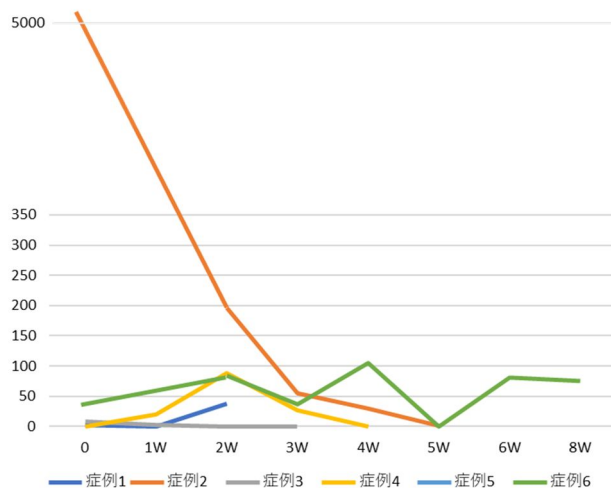


さらに、尿中 TB 排泄量が多い MPA 患者において尿中 TB 排泄量と腎生検標本における活動性半月体の割合 ((細胞性半月体数 + 線維細胞性半月体数) / 全半月体数) との相関を検討したところ、相関は認めなかった。



ステロイド治療開始後の尿サンプルを回収できた MPA 患者 7 例において尿中 TB 排泄量を測定した。

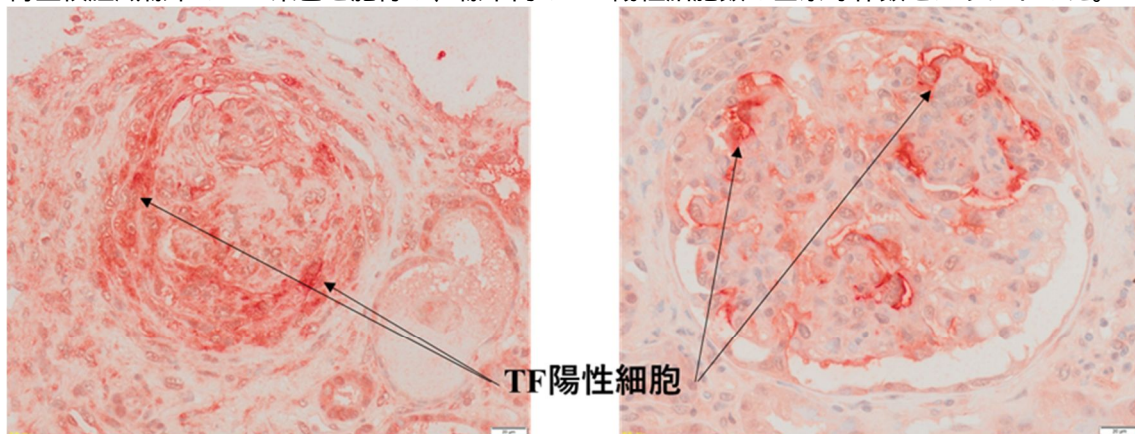
治療後の尿中TB排泄量(ng/gCr)



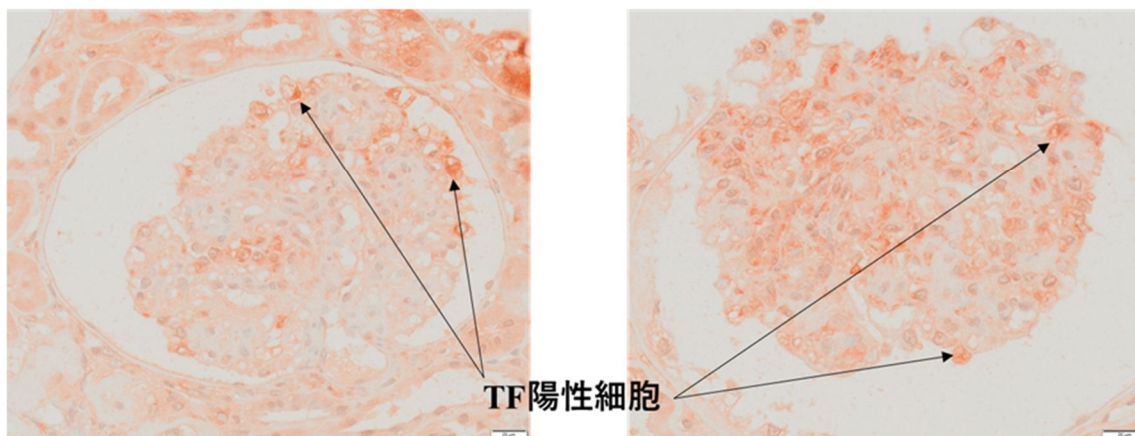
治療開始後に尿中 TB 排泄量が速やかに低下し、治療効果が認められる症例がある一方、尿中 TB 排泄量に変化を認めない症例も認められた。詳細は現在解析中であるが、尿中 TB 排泄量が疾患活動性のマーカーとなり、尿中 TB 排泄量の減少が治療反応性と相関し、尿中 TB 排泄量の測定が治療効果の判定に利用できる可能性、および尿中 TB 排泄量の減少を認めない場合には治療強化の必要性を判断するマーカーとなる可能性が示唆された。



(5) (4)で測定した中で尿中 TB 排泄量が高値であった MPA 患者 13 例および DN 患者 16 例の腎生検組織標本の TF 染色を施行し、標本内の TF 陽性細胞数と全系球体数をカウントした。

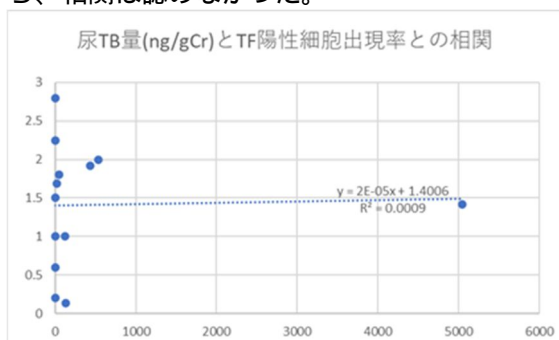


MPA患者のTF染色

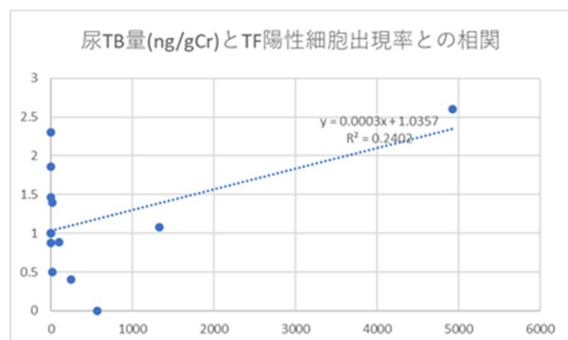


DN患者のTF染色

腎生検標本中の TF 陽性細胞数/標本内の全系球体数と尿中 TB 排泄量との相関を検討したところ、相関は認めなかった。



MPA 患者



DN 患者

現在、尿中 TB 排泄量を規定する因子について腎生検患者データから解析中である。また、尿 TB 排泄量の増加が糸球体での炎症を反映したものかを検討するため、TB を測定した尿検体での IL-6 濃度を測定し、尿中排泄量の増加している症例を認めている。現在、尿中 TB 排泄量と尿中 IL-6 排泄量の相関についても検討中である。

<引用文献>

Kitamoto Y, Arizono K, Fukui H, Tomita K, Kitamura H, Taguma Y, Imamura T. Urinary thrombin: a novel marker of glomerular inflammation for the diagnosis of crescentic glomerulonephritis (prospective observational study). PLoS One.10, 2015, e0118704.  
Kitamoto Y, Tomita K, Imamura T. Assessment of thrombin in the urine of glomerulonephritic patients by enzyme-linked immunosorbent assay. Ann Clin Biochem. 41, 2004, 133-7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 とう欽元, 柿添豊, 岩田康伸, 中川輝政, 泉裕一郎, 桑原孝成, 安達政隆他
2. 発表標題 食塩感受性高血圧におけるセリンプロテアーゼ・プラスミンを標的とした降圧療法の検討
3. 学会等名 第43回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩田康伸, 柿添豊, とう欽元, 中川輝政, 泉裕一郎, 桑原孝成, 安達政隆他
2. 発表標題 食塩感受性高血圧における尿中プラスミンによる高血圧発症機序
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019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
研究分担者	向山 政志  (Mukoyama Masashi)  (40270558)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授    (17401)	

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