

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08739

研究課題名（和文）白血球・血管内皮細胞発現タンパクに着目した腎系球体血管内皮障害特異的診断法開発

研究課題名（英文）Development of leukocytes and endothelial cell-derived biomarkers for glomerular endothelial injuries

研究代表者

坪井 直毅（Tsuboi, Naotake）

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：50566958

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）：本研究では国内施設で組織診断時に収集されたANCA関連腎炎患者尿中のCD11b、CD163値と、腎組織所見、尿蛋白、腎機能、腎予後との関連を検討した。尿中CD11b、CD163はともに、半月体型カテゴリーに分類される患者群で有意に上昇し、半月体形成率や半月体内のCD11b陽性、CD163陽性白血球集積数ともそれぞれ有意に相関していた。治療後の腎予後に関しては、尿中CD163値は未寛解あるいは腎機能障害が重度となった患者群で診断時にすでに上昇していた。しかしながら診断時の両分子の尿中計測値と腎機能低下率には、多変量解析において有意な関連は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、尿中CD11b、CD163両者は、ANCA関連腎炎の糸球体炎症、特に白血球の集積を反映する有用なバイオマーカーであることが示唆された。ANCA関連腎炎は短期間に重篤な経過を示すことの多い疾患であるため、測定時間が短く、非侵襲的に腎組織所見を推測できる本検査法は、組織診断が躊躇される高齢者や状態の悪化した患者、出血のリスクが高い患者、あるいは組織診断体制が整っていない発展途上国においても臨床的価値が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In the current study, we investigated the associations of urinary CD11b (U-CD11b) and CD163 (U-CD163) from ANCA-vasculitis patients with histological findings, proteinuria, kidney function, and kidney prognosis. Both of U-CD11b and U-CD163 were significantly elevated in patients with crescentic category, and were significantly correlated with crescentic formation rate and with intraglomerular accumulations of leukocytes presenting CD11b and CD163. U-CD163 level at diagnosis was increased in patient groups with low response to the immunosuppressive therapy or with renal functional impairments after the 6 months. However, multivariate analysis demonstrated that neither U-CD11b nor U-CD163 at diagnosis associated with eGFR slope.

研究分野：腎臓内科学

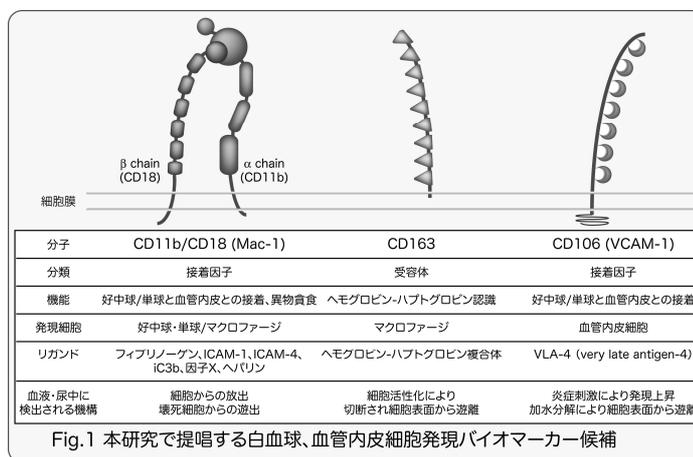
キーワード：抗好中球細胞質抗体 血管炎 血栓性微小血管障害症 白血球 血管内皮細胞 バイオマーカー 接着因子

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

『学術的背景 1:本研究で提案した糸球体毛細血管炎症・障害特異的バイオマーカー候補 (Fig.1)』

糸球体毛細血管炎症・障害の発症・進行過程では免疫学的機序が不可欠である。特に好中球・マクロファージ(M)は疾患急性期に腎糸球体へ流入し、炎症過程で中心的な役割を果たす。インテグリン Mac-1はCD11b(鎖)とCD18(鎖)からなるヘテロ二量体で、腎糸球体への好中球接着や炎症組織への遊走に参与すると共に、活性化した好中球、Mから放出される。Mに発現するCD163は、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体に対するスカベンジャー受容体であるが、細胞活性化により分解を受け、その細胞外ドメインが細胞外に遊離される。一方で糸球体毛細血管内皮細胞側では、CD54 (intercellular adhesion molecule-1; ICAM-1)、CD106 (vascular cell adhesion molecule-1; VCAM-1)が白血球との相互作用により、炎症性白血球の糸球体内皮への接着に参与している。恒常的に発現するCD54と異なり、CD106は未刺激の血管内皮細胞上に殆ど存在せず、IL-1やTNFのような炎症性サイトカイン刺激により誘導されるため、糸球体毛細血管炎症・障害過程に密接に参与する。



『学術的背景 2:腎糸球体血管炎症・障害特異的バイオマーカー開発の意義』

好中球細胞質抗体(ANCA)関連腎炎は临床上急速進行性糸球体腎炎を呈し、多くが数週から数ヶ月で高率に腎機能廃絶をきたす予後不良の難知性腎疾患群である。腎組織観察では、糸球体への活性化白血球集積による炎症反応の結果、毛細血管壁が破綻し、半月体と呼ばれる血管外炎症細胞集積像を呈する(半月体形成性糸球体腎炎、CGN)。一方、血栓性微小血管症(Thrombotic microangiopathy: TMA)は、細血管内血小板血栓、破壊性血小板減少症、細血管障害性溶血性貧血を3徴とし、腎、心血管、神経障害を介して腎機能廃絶や致命的転機をとることも多い劇症型内皮細胞障害の代表的疾患である。ADMTS13 活性低下による血栓性血小板減少性紫斑病、腸管出血性大腸菌感染による溶血性尿毒症症候群、補体制御異常が関連する非典型的 HUS が一次性 TMA の代表例であるが、他にも二次性 TMA として膠原病、骨髄/末梢血幹細胞移植、感染症、薬剤など病因は多彩である。また、内皮細胞障害は TMA のみならず糖尿病性腎症においても代表的な組織病像であり、不可逆性腎機能低下の一因と考えられている。

両疾患の確定診断に腎生検は必須の検査手法であるが、観血的検査のため病勢・治療効果判定を目的に繰り返し行うことができず、特に血小板減少をきたす TMA では病理診断なく治療開始となる場合が多い。また分子標的薬など新規治療開発の面から血清クレアチニン値や尿タンパクに代表される非特異的指標の他に、疾患、病態特異的活動性評価として観血的診断法を用いるのは倫理的側面から現実的ではない。従って、診断のみならず糸球体毛細血管炎症特異的かつ病勢を反映した臨床的指標(バイオマーカー)開発は、実臨床と新規治療法開発両面で非常に有意義である。

2. 研究の目的

研究代表者は、腎炎活動期には、腎系球体への白血球流入による毛細血管炎症、あるいは系球体毛細血管内皮活性化により、白血球あるいは血管内皮細胞の表面発現タンパクが、障害腎系球体内から尿管に流入し、尿中に排泄されるという仮説を立てた。各分子の発現細胞特異性から尿中の CD11b(Mac-1 鎖)は炎症腎系球体への好中球・M 浸潤を、CD163 は M 浸潤を、CD106 は系球体毛細血管内皮活性化を反映する可能性がある。本研究では、腎系球体毛細血管障害を対象に腎生検の代替となる新規非観血的診断法開発を目的とし、国内複数の腎疾患患者コホート患者試料を用いた候補分子 CD11b、CD163、CD106 のバリデーション、特に尿中への各分子漏出量と臨床的疾患活動性指標・腎組織所見との関連分析（臨床観察研究）と、疾患モデル動物を用いた基礎医学研究両面から、尿中で測定される炎症白血球・血管内皮細胞発現タンパクの ANCA 関連腎炎・TMA 診断・病勢判定指標としての有用性を検討した。

### 3．研究の方法

#### 『ANCA 関連腎炎患者尿中 CD11b、CD163、CD106 の臨床的意義検討と国内コホート比較によるバリデーション』

##### ANCA 関連腎炎患者尿中の CD11b、CD163、CD106 測定

名古屋大学医学部附属病院とその関連病院(88 例)、および厚生労働省難治性疾患克服研究事業(ReMIT-JAV-RPGN,138 例)で組織診断時に収集された合計 226 例の ANCA 関連腎炎患者尿検体で、CD11b(U-CD11b)、CD163(U-CD163)、CD106(U-CD106)値を ELISA 法で測定した。また得られた ReMIT-JAV-RPGN コホートにおける診断時および治療 6 ヶ月後の U-CD11b、U-CD163 値の推移および CKD ステージの関連を検討した。また、上記 2 種の尿中バイオマーカーと性別、診断時 eGFR、蛋白尿を寄与因子、2 年と 4 年後までの eGFR slope をアウトカムに設定し、単変量、多変量解析を実施した。

##### 尿中 CD11b、CD163、CD106 と腎疾患病理組織学的活動性との相関評価

名古屋大学およびその関連施設で実施された腎生検標本を用い、U-CD11b、U-CD163、U-CD106 と ANCA 関連腎炎における腎系球体組織学的分類、系球体および間質尿管領域への白血球集積(CD11b 陽性細胞、CD163 陽性細胞、好中球)との関連性を検討した。

#### 『系球体腎炎・腎微小血管障害動物モデルを用いた CD11b、CD106 動体解析による基礎医学的検証』

ヒト ANCA 関連腎炎が呈する半月体形成性腎炎に対応する抗系球体基底膜(GBM)抗体型腎炎(NTS-GN)、腎系球体毛細血管内皮障害に対応する腸管出血性大腸菌由来 Verotoxin(Stx2)による溶血性尿毒症症候群(HUS)モデルをそれぞれマウスで作成し、経時的 U-CD11b、U-CD106 動態と腎機能、組織障害との関連を検討した。また CD11b の好中球細胞膜上の発現を Fc 受容体クロスリンク処理前後で比較した。また、Boyden chamber 上層に PMA、TNF、MIP-2 で刺激したマウス好中球細胞株(MPRO 細胞)、半透膜上にマウス血管内皮細胞株(RCB1994 細胞)を培養し、chamber 上層、下層(浸潤後)の MPRO 細胞上の CD11b 発現量を解析した。

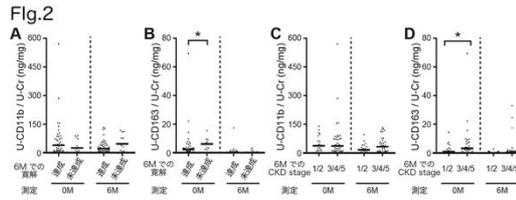
### 4．研究成果

#### 『ANCA 関連腎炎患者尿中 CD11b、CD163、CD106 の臨床的意義検討と国内コホート比較によるバリデーション』

## 腎炎患者尿中の CD11b、CD163、CD106 測定

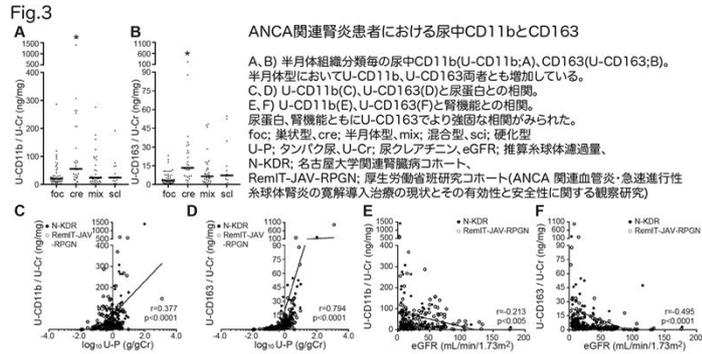
名古屋大学医学部附属病院とその関連病院(88 例)、および厚生労働省難治性疾患克服研究事業 (Remit-JAV-RPGN,138 例)で組織診断時に収集された合計 226 例の ANCA 関連腎炎患者検体で、U-CD11b、U-CD163、U-CD106 値を ELISA 法で測定したところ、いずれも ANCA 関連血管炎患者で有意な上昇を認めた。治療後の腎予後に関する検討では、U-CD163 値は、治療 6 ヶ月後に有意に減少していたが、未寛解あるいは腎機能障害が重度となった患者群では診断時にすでに上昇していることが明らかとなった(Fig.2)。Remit-JAV-RPGN で収集された 138 例の ANCA 関連腎炎患者検体で測定された U-CD11b、U-CD163 値について、2 年後および 4 年後の腎予後を予測因子としての有用性を検討したが、両バイオマーカーとも単変量解析では有意差を認めなかったものの、多変量解析においては eGFR 改善あるいは悪化の独立した寄与因子とは示されなかった。

ANCA関連腎炎患者におけるU-CD11b、U-CD163値と患者予後  
A、B) 診断時(OM)、6ヶ月(6M)でのU-CD11b(A)、U-CD163(B)と、治療6ヶ月後の腎疾患寛解との関連。  
診断時のU-CD163は、治療6ヶ月後に寛解に至らなかった患者群で上昇している。  
C、D) 診断時(OM)、6ヶ月(6M)でのU-CD11b(C)、U-CD163(D)と、治療6ヶ月後の慢性腎臓病重症度(CKD stage)との関連。  
診断時のU-CD163は、治療6ヶ月後に腎機能が低下した患者群で上昇している。



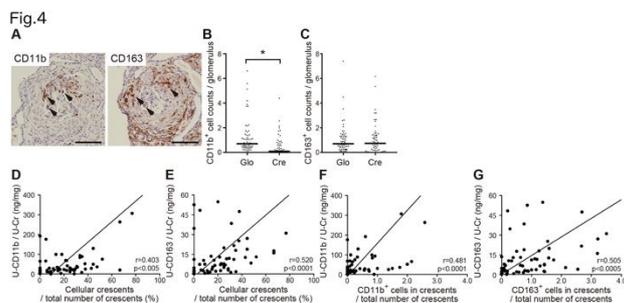
## 尿中 CD11b、CD163、CD106 と腎疾患病理組織学的活動性との相関評価

ANCA 関連腎炎患者の U-CD11b、U-CD163 値は、Berden らが提唱した組織学的評価で半月体型に分類される患者群で有意に増加していた (Fig.3A, B)。また両分子はともに、尿蛋白とは正の、腎機能とは負の相関を示したが、それらは U-CD163 でより強固であった (Fig.3C-F)。次に、CD11b 陽性、CD163 陽性の各白血球分画の糸球体での分布に注目したところ、CD163 陽性白血球数は糸球体全領域に均等に観察されたのに対し、CD11b 陽性白血球数は半月体内よりも糸球体の未破壊領域に多く分布していた (Fig.4)。また尿中の両分子の値は、半月体形成率や、半月体内の CD11b 陽性、CD163 陽性白血球分画集積数とも、それぞれ有意に相関していた (Fig.3)。また、尿細管間質における CD11b、CD163 陽性細胞集積を、非糸球体性腎疾患群 (腎硬化症、急性尿細管間質腎炎、IgG4 関連腎炎) と比較検討した結果、U-CD11b、U-



CD163 はともに非糸球体性腎疾患と比べ ANCA 関連腎炎患者で有意に上昇していた。さらに尿中 CD11b と尿細管間質領域の CD11b 陽性細胞数に有意な相関がみられたのに対し、CD163 では関連はみられなかった。

ANCA 関連腎炎患者における尿中 CD11b と CD163  
A、B) 半月体組織分類毎の尿中 CD11b (U-CD11b; A)、CD163 (U-CD163; B)、半月体型において U-CD11b、U-CD163 両者とも増加している。  
C、D) U-CD11b (C)、U-CD163 (D) と尿蛋白との相関。  
E、F) U-CD11b (E)、U-CD163 (F) と腎機能との相関。  
尿蛋白、腎機能ともに U-CD163 でより強固な相関がみられた。  
foc: 巣状型、cre: 半月体型、mix: 混合型、sci: 硬化型  
U-P: タンパク尿、U-Cr: 尿クレアチニン、eGFR: 推算糸球体濾過量、  
N-KDR: 名古屋大学関連腎臓病コホート、  
Remit-JAV-RPGN: 厚生労働省難治性疾患克服研究 (ANCA 関連血管炎・急速進行性糸球体腎炎の寛解導入治療の現状とその有効性と安全性に関する観察研究)



ANCA 関連腎炎患者における CD11b、CD163 各陽性細胞の糸球体内分布  
A) ANCA 関連腎炎糸球体内の CD11b 陽性 (左)、CD163 陽性 (右) 細胞。陽性細胞は茶色に染色されている (矢印)。  
B) 糸球体内 (Glo)、半月体内 (Cre) 毎の CD11b 陽性 (左)、CD163 陽性 (右) 細胞数。  
CD11b 陽性細胞は糸球体内により多く集積するのに対し、CD163 陽性細胞は糸球体内、半月体内均等に分布する。  
D、E) U-CD11b (D)、U-CD163 (E) と細胞性半月体形成率との相関。  
F、G) U-CD11b (F)、U-CD163 (G) と半月体内 CD11b 陽性細胞との相関。

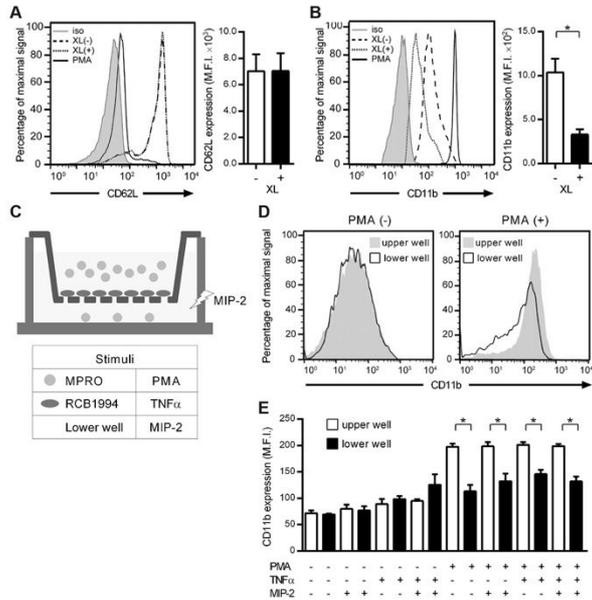
CD163 はともに非糸球体性腎疾患と比べ ANCA 関連腎炎患者で有意に上昇していた。さらに尿中 CD11b と尿細管間質領域の CD11b 陽性細胞数に有意な相関がみられたのに対し、CD163 では関連はみられなかった。

## 『糸球体腎炎・腎微小血管障害動物モデル』を用いた CD11b、CD106 動態解析による基礎医学的検証

ウサギ IgG で前免疫を施した C57BL/6 系マウスに、ウサギ抗マウス腎系球体基底膜血清を投与することにより、抗系球体基底膜抗体型腎炎(NTS-GN)の動物実験モデルを樹立した。U-CD11bの上昇はNTS-GN マウスを用いた実験でもヒト ANCA 関連腎炎同様に証明され、かつ細胞実験では、白血球が系球体に沈着した免疫複合体と呼ばれる腎炎の原因物質を認識した際、あるいは炎症下で血管内から外へ浸潤した際に、活性化した好中球細胞表面から CD11b が離断する可能性が示された。

また、志賀毒素のうち STX2 および大腸菌の菌体成分リポリサッカライド(LPS)を C57BL/6 系マウスに腹腔内投与することで、TMA を惹起した。マウス志賀毒素(STX2)誘導性 HUS モデルにおいて、U-CD106、U-CD54 の測定を行ったところ、疾患惹起後に U-CD106 は有意な上昇を示した。

Fig.5



マウス好中球におけるCD11bの発現動態解析

A, B) マウス骨髄由来好中球のFc $\gamma$ 受容体クロスリンク(XL)前後のCD62L(A)とCD11b(B)発現。  
 C) Boyden chamberを用いたTransmigrationアッセイ。マウス好中球細胞株MPRO細胞をPMAで、マウス血管内皮細胞株RCB1994細胞細胞をTNF $\alpha$ で刺激。下層にMIP-2を添加し、上層に散布したMPRO細胞のRCB1994細胞を介したTransmigrationを誘導。  
 D) Chamber上下層のMPRO細胞上のCD11b発現をFACSで評価。PMA刺激により活性化したTransmigration後のMPRO細胞では細胞表面のCD11b発現が減少している。  
 F) PMA, TNF $\alpha$ , MIP-2の有無によるchamber上下層のMPRO細胞上CD11b発現評価結果。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件(うち査読付論文 5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 Kikuchi R, Tsuboi N, Sada K, Nakatochi M, Yokoe Y, Suzuki A, Maruyama S, Murohara T, Matsushita T, Amano K, Atsumi T, Takasaki Y, Ito S, Hasegawa H, Dobashi H, Ito T, Makino H, Matsuo S, Research Committee of Intractable Vasculitis Syndrome and Research Committee of Intractable	4. 巻 58
2. 論文標題 Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and VEGF-A165b are associated with time to remission of granulomatosis with polyangiitis in a nationwide Japanese prospective cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine	6. 最初と最後の頁 86~94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0004563220968371	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 -

1. 著者名 Yokoe Y, Tsuboi N, Imaizumi T, Kitagawa A, Karasawa M, Ozeki T, Endo N, Sawa Y, Kato S, Katsuno T, Maruyama S, Yamagata K, Usui J, Nagata M, Sada K, Sugiyama H, Amano K, Arimura Y, Atsumi T, Yuzawa Y, Dobashi H, Takasaki Y, Harigai M, Hasegawa H, Makino H, Matsuo S	4. 巻 in press
2. 論文標題 Clinical impact of urinary CD11b and CD163 on the renal outcomes of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ndt/gfaa097	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 -

1. 著者名 Yamagata K, Usui J, Nagata M, Sugiyama H, Tsuboi N, et.al.	4. 巻 23(3)
2. 論文標題 Histopathological classification of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis in a nationwide Japanese prospective 2-year follow-up cohort study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol.	6. 最初と最後の頁 387-394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-018-1656-1.	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 -

1. 著者名 Suzuki A, Sakamoto S, Kurosaki A, Kurihara Y, Tsuboi N, et.al.	4. 巻 Apr
2. 論文標題 Chest High-Resolution CT Findings of Microscopic Polyangiitis: A Japanese First Nationwide Prospective Cohort Study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 AJR Am J Roentgenol.	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2214/AJR.18.20967.	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 -

1. 著者名 Kitagawa Akimitsu, Tsuboi Naotake, Yokoe Yuki, Katsuno Takayuki, Ikeuchi Hidekazu, Kajiyama Hiroshi, Endo Nobuhide, Sawa Yuriko, Suwa Junya, Sugiyama Yutaka, Hachiya Asaka, Mimura Toshihide, Hiromura Keiju, Maruyama Shoichi	4. 巻 95
2. 論文標題 Urinary levels of the leukocyte surface molecule CD11b associate with glomerular inflammation in lupus nephritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 680 ~ 692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2018.10.025	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6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 坪井直毅, 林 宏樹
2. 発表標題 二次性糸球体疾患の基礎と臨床：ループス腎炎の改訂組織分類と新規バイオマーカー
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naotake Tsuboi, Yuki Yokoe, Takahiro Imaizumi, Akimitsu Kitagawa, Shoichi Maruyama
2. 発表標題 Predictive Significance of Urinary CD11b and CD163 for the Renal Outcomes in ANCA-Associated Glomerulonephritis.
3. 学会等名 Kidney Week 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川章充、横江優貴、坪井直毅、丸山彰一
2. 発表標題 尿中CD11bはループス腎炎の組織学的疾患活動性と相関する
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Munetoshi Karasawa, Asuka Hachiya, Naotake Tsuboi, Shoichi Maruyama, Kazuhiro Furuhashi
2. 発表標題 Urinary Levels of CD11b and CD163 Determine Rapid Responders to Remission Induction Therapy in Proliferative Lupus Nephritis
3. 学会等名 52th Annual Meeting of the American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naotake Tsuboi, Yuki Yokoe, Munetoshi Karasawa, Yukio Yuzawa, Shoichi Maruyama
2. 発表標題 Clinical Impacts of Urinary CD11b and CD163 on Patient Outcomes in ANCA-associated Glomerulonephritis
3. 学会等名 ISN World Congress of Nephrology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坪井直毅
2. 発表標題 教育講演4 腎臓免疫学入門：糸球体への白血球導入と炎症
3. 学会等名 第51回 日本腎臓学会西部学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

急速進行性糸球体腎炎の診断と腎予後予測を可能とする尿検査法の開発  
<https://www.fujita-hu.ac.jp/news/j93sdv000006dft.html>

## 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	湯澤 由紀夫  (Yuzawa Yukio)  (00191479)	藤田医科大学・医学部・教授    (33916)	
研究分担者	丸山 彰一  (Maruyama Shoichi)  (10362253)	名古屋大学・医学系研究科・教授    (13901)	
研究分担者	林 宏樹  (Hayashi Hiroki)  (10378086)	藤田医科大学・医学部・准教授    (33916)	
研究分担者	勝野 敬之  (Katsuno Takayuki)  (60642337)	愛知医科大学・医学部・准教授    (33920)	

## 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