

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16983

研究課題名(和文)肥満関連腎症における尿沈渣中ポドサイトmRNA排泄量の有用性の検討と進展機序解明

研究課題名(英文)Progression mechanism and usefulness of urinary podocyte mRNA excretions in obesity related nephropathy

研究代表者

福田 顕弘(Fukuda, Akihiro)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30628889

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):肥満関連腎症における尿沈渣中ポドサイトmRNA排泄量の有用性について検討した。肥満ラット群では、コントロール群と比較して経時的に有意な糸球体容積増大、ポドサイトdensityの低下を認め、肥満関連腎症の進展にポドサイト障害が関連している可能性が示唆された。さらに臨床症例の検討では、高度肥満群とControl群で尿沈渣中ポドサイトmRNA排泄量に有意な上昇は認めなかったが、eGFR 100の群において、60 eGFR<100群と比較して尿沈渣中ポドサイトmRNA排泄量の上昇傾向を認め、同マーカーが肥満症における糸球体過剰濾過をアルブミン尿より早期に検出できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満症や糖尿病などの生活習慣病患者は増え続けており、患者の生活の質(QOL)維持や医療経済上も深刻な問題となっている。肥満症は糖尿病発症の危険因子となるだけでなく、蛋白尿や慢性腎臓病発症に対する有意な危険因子であることが報告されている。

本研究により尿沈渣中ポドサイトマーカーが微量アルブミン尿より精度が高く早期及び疾患活動性を反映する肥満関連腎症のバイオマーカーであることが確立できれば、糖尿病性腎症や肥満関連腎症の早期発見のみならず病勢の評価にも有用であり、QOL維持や透析導入患者の減少という観点から医療経済上も非常に重要な研究と考える。

研究成果の概要(英文):We investigated the usefulness of urinary sediment podocyte mRNA excretion in obesity-related nephropathy. The obese rats showed significantly increased glomerular volume and decreased podocyte density over time compared to controls, suggesting that podocyte damage could be associated with the development of obesity-related nephropathy. Furthermore, in clinical cases, the urinary sediment podocyte mRNA excretion was no significant increase in severe obese group compared with the control group, but there was a trend toward an increase in the eGFR > 100 group compared to the 60 < eGFR < 100 group, suggesting that this marker is associated with glomerular hyperfiltration in obesity-related nephropathy. These results suggest that the marker could be detect glomerular hyperfiltration in obesity-related nephropathy earlier than albuminuria.

研究分野：腎臓内科

キーワード：ポドサイト 肥満関連腎症 バイオマーカー 糖尿病性腎症

1. 研究開始当初の背景

肥満症や糖尿病などの生活習慣病患者は増え続けており、患者の生活の質(QOL)維持や医療経済上も深刻な問題となっている。肥満症は糖尿病発症の危険因子となるだけでなく、糖尿病を除外しても蛋白尿や慢性腎臓病発症に対する有意な危険因子であることが報告されている。このことから肥満に対する早期治療介入は糖尿病性腎症発症のみならず肥満関連腎症を予防する上で非常に重要である。現在、糖尿病性腎症の早期診断法として日常診療で用いられている微量アルブミン尿は陰性であっても、糸球体障害が進行している症例が存在する。また、肥満症においても早期には検尿異常を認めない症例も多く、微量アルブミン尿より精度の高い早期診断法の開発が求められている。

多くの糸球体疾患において、様々な原因によって生じるポドサイト障害の持続に伴うポドサイトの脱落が糸球体硬化の主因である(Podocyte depletion 仮説)。ポドサイトは糸球体の基底膜の上皮側に存在し、ポドサイトが障害され脱落すると尿中に検出されるため、ポドサイト関連分子の尿中バイオマーカーとしての有用性が示唆される。申請者らはこれまでポドサイトを特異的に障害できる遺伝子改変ラットを用いて、尿沈渣中ポドシン mRNA 排泄量が糸球体疾患のバイオマーカーとして有用であること、また、ヒト IgA 腎症や抗 GBM 腎炎症例においても同マーカーが ongoing な病勢を反映することを明らかとした(Fukuda A et al. *Kidney Int* 2012, *Nephrol Dial Transplant* 2012, 2015, 2017)。

前述のように、生活習慣病に関連した腎症の早期診断に微量アルブミン尿は必ずしも有用ではないため、より精度の高い診断法が求められる。肥満症や糖尿病では糸球体肥大が認められるが、近年では我々の報告を含めて、糖尿病の比較的早期より糸球体肥大・ポドサイト障害が生じ、糖尿病性腎症において尿沈渣中ポドシン mRNA 排泄量や尿中ポドカリキシン蛋白定量などの尿中ポドサイトマーカーが早期診断及び疾患活動性を反映するバイオマーカーになることが示された。肥満症においても同様に尿沈渣中ポドシン mRNA 排泄量などの尿中ポドサイトマーカーが有用となることが予想される。

2. 研究の目的

本研究では、肥満関連腎症の早期及び疾患活動性を反映するバイオマーカーとしての尿沈渣中ポドシン mRNA 排泄量などの尿中ポドサイトマーカー測定の意義について微量アルブミン尿と比較することにより明らかとする。さらに、未だ明確ではない肥満関連腎症進展メカニズムについてもポドサイト障害に焦点を当てて動物モデルと臨床症例で明らかにする。

3. 研究の方法

肥満関連腎症モデルラット(Zucker-fatty ラット)を使用し、尿沈渣中ポドシン mRNA 排泄量の有用性の検討および腎病変の評価と腎症進展メカニズムの解明を行う。

Zucker-fatty ラット(Lep^{rfa}/Lep^{rfa})は、肥満制御ホルモンであるレプチンの受容体欠損ラットで、過食に伴う肥満を4週齢頃より認め、10週齢頃までに急速に肥満が進行し、高脂血症、高インスリン血症、高レプチン血症を呈する。20週齢には糸球体肥大を認め、30、40週齢と糸球体硬化性病変の進行がみられる。本研究では、4週齢の雄性 Zucker-fatty ラットを購入し、コントロールとして、雄性 Zucker-lean(Lep^{rfa} /+ or +/+)ラットを使用する。同モデルラットを3群(疾患群・治療群・コントロール群)に分け、早期より経時的に採尿し、各群における尿沈渣中ポドシン mRNA 排泄量の程度を評価する。また、病理学的重症度の確認のため、同一個体で数回、経時的に腎生検を行い、病理組織学的な評価を行う。ポドサイト障害の程度は、ポドサイト特異的蛋白(GLEPP1 や WT1)の免疫染色により評価する。病理所見と、得られた尿沈渣中ポドシン mRNA 排泄量との相関を解析し、尿沈渣中ポドシン mRNA 排泄量が肥満関連腎症の病勢を反映するかを評価する。また、早期からのポドサイト障害の有無を評価するとともに、モデルラットの血清や尿のメタローム解析や腎組織のマイクロアレイなどを行い、肥満関連腎症進展メカニズムについても明らかにする。

肥満臨床症例(特に高度肥満症例)における尿中ポドサイトマーカーの有用性

当科入院および外来通院中の肥満患者(特に高度肥満症例 BMI>35)をリクルートする。正常コントロールは、健診や人間ドック受診者で肥満、高血圧や糖尿病などの生活習慣病を有さない受診者の尿を用いる。採尿した50 ml の尿を遠心分離し、ラットと同様の方法で尿沈渣中ポドシン mRNA 排泄量を RT-PCR 法にて測定する。特に、微量アルブミン尿を認めない症例における尿中ポドサイトマーカーの上昇を検証することにより早期診断マーカーとしての有用性を明らかにする。

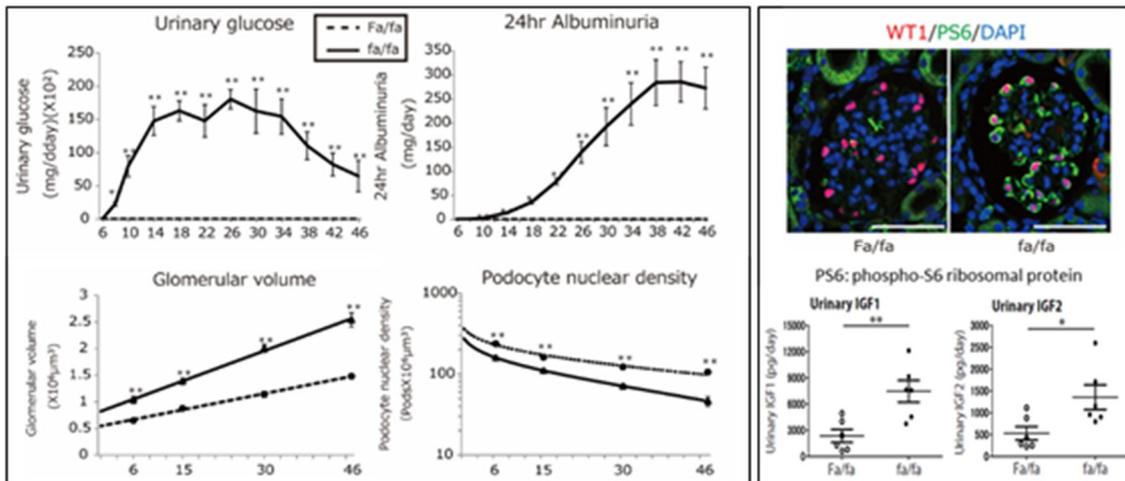
以上より、肥満関連腎症において、尿中ポドサイトマーカーが微量アルブミン尿より精度の高い

マーカーとして有用性であること、肥満関連腎症進展メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

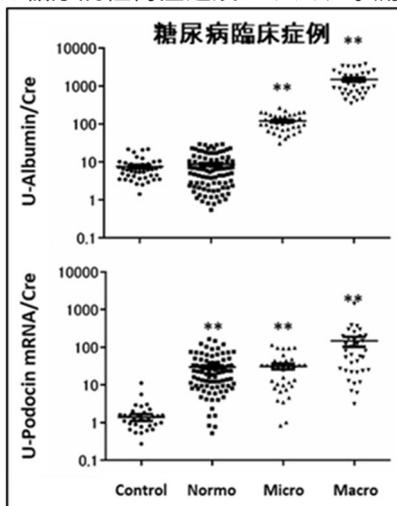
(1) 肥満糖尿病性腎症ラットモデル (Zucker-Diabetic-fatty rat) での検討

本研究開始前に、2016年-2018年度の研究「糖尿病性腎症における尿中ポドサイト mRNA の早期診断マーカーとしての有用性の検討」の継続を行った。その結果、肥満糖尿病性腎症モデルラットでは微量アルブミン尿よりも早期に、また血糖上昇以前に尿沈渣中ポドサイト mRNA 排泄量が増加した。さらに早期の時点で Growth factor や mTORC1 活性化による糸球体肥大がポドサイト障害を引き起こし、アルブミン尿の出現、ポドサイトの脱落、糸球体硬化に繋がり腎症が進展し、カロリー制限により進展を抑制できることを明らかとした (Sci Rep 2019)。



(2) 糖尿病臨床症例での検討

臨床症例でも尿沈渣中ポドサイト mRNA 排泄量は糖尿病性腎症の早期診断マーカーとして、また糖尿病性腎症進展のリスク予測因子であることを明らかとした (Sci Rep 2020)。



(3) 肥満関連腎症ラットモデル (Zucker-fatty rat) での検討

Zucker fatty ラット群では、コントロール群と比較して経時的に有意な体重増加を認め (32 週齢: 695g vs 430g)、16 週齢より尿量増加、尿蛋白増加を認めた。また、16、24、32 週と経過に伴い、ポドサイト数の減少は認めなかったが、糸球体容積、ポドサイト容積ともに増大し、糸球体とポドサイトの容量ミスマッチの指標であるポドサイト density の低下を認めた。本研究結果については 2022 年 6 月開催の第 95 回日本内分泌学会総会および第 65 回日本腎臓学会総会で発表した。

今後、尿沈渣中ポドシン mRNA 排泄量の評価を行う。また、薬剤投与などによる治療群の評価やマイクロアレイ解析などによる肥満関連腎症メカニズム解明についても進めていく予定である。

(4) 高度肥満症例での検討

高度肥満症例 31 例 (年齢 43.9 ± 9.5 歳、BMI 40.0 ± 7.8 kg/m²) と、健診で肥満、糖尿病、高血圧、腎機能障害を認めない 31 例 (年齢 54.0 ± 11.8 歳、BMI 21.5 ± 2.2 kg/m²) を対象として尿中アルブミンおよび尿沈渣中ポドサイト (ポドシン・ネフリン) mRNA 排泄量を測定し比較した。

高度肥満群と Control 群で尿沈渣中ポドシン、ネフリン mRNA 排泄量に有意な上昇は認めなかった。高度肥満症例群において eGFR < 60 (n=5), 60 ≤ eGFR < 100 (n=20), eGFR ≥ 100 (n=6) の 3 群に分けて比較すると eGFR < 60 群でのみアルブミン尿は上昇傾向であり、一方で e-GFR < 60, eGFR ≥ 100 の群において、60 ≤ eGFR < 100 群と比較して尿沈渣中ポドシン (平均 8.1 倍、2.8 倍) およびネフリン (平均 1.8 倍、1.6 倍) mRNA 排泄量の上昇傾向を認めた。このことから尿沈渣中ポドサイト mRNA 排泄量は肥満症における糸球体過剰濾過をアルブミン尿より早期に検出できる可能性が示唆された。本研究結果については 2022 年 6 月開催の第 95 回日本内分泌学会総会で発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fukuda Akihiro, Minakawa Akihiro, Sato Yuji, Shibata Hirotaka, Hara Masanori, Fujimoto Shouichi	4. 巻 3
2. 論文標題 Excretion Patterns of Urinary Sediment and Supernatant Podocyte Biomarkers in Patients with CKD	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney360	6. 最初と最後の頁 63~73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34067/KID.0004772021	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 Fukuda Akihiro, Minakawa Akihiro, Kikuchi Masao, Sato Yuji, Nagatomo Masanao, Nakamura Shuji, Mizoguchi Tetsu, Fukunaga Naoya, Shibata Hirotaka, Naik Abhijit S., Wiggins Roger C., Fujimoto Shouichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Urinary podocyte mRNAs precede microalbuminuria as a progression risk marker in human type 2 diabetic nephropathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-75320-1	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

1. 著者名 Minakawa Akihiro, Fukuda Akihiro, Sato Yuji, Kikuchi Masao, Kitamura Kazuo, Wiggins Roger C., Fujimoto Shouichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Podocyte hypertrophic stress and detachment precedes hyperglycemia or albuminuria in a rat model of obesity and type2 diabetes-associated nephropathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18485
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54692-z	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木美穂、福田顕弘、福長直也、柴田洋孝
2. 発表標題 肥満関連腎症は糸球体とポドサイトの容量ミスマッチにより進展する
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田顕弘、鈴木美穂、福長直也、正木孝幸、柴田洋孝
2. 発表標題 高度肥満症における尿沈渣中ポドサイトmRNA排泄量の検討
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木美穂、福田顕弘、福長直也、柴田洋孝
2. 発表標題 肥満関連腎症は糸球体とポドサイトの容量ミスマッチにより進展する
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田顕弘、工藤明子、鈴木美穂、河野恵美子、青木宏平、中田健、溝口哲、黒澤寛之、原正則、福長直也、柴田洋孝
2. 発表標題 尿中ポドカリキシン蛋白定量は加齢腎症の早期バイオマーカーとなりうる
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 Akihiro Fukuda, Akiko Kudo, Miho Suzuki, Kohei Aoki, Takeshi Nakata, Testu Mizoguchi, Hiroyuki Kurosawa, Masanori Hara, Naoya Fukunaga, Hirotaka Shibata
2. 発表標題 Urinary podocalyxin protein excretion is an early biomarker in age-associated kidney disease
3. 学会等名 The American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田顕弘、佐藤祐二、皆川明大、菊池正雄、藤元昭一
2. 発表標題 尿中ポドサイトmRNA排泄量は糖尿病性腎症進展のリスク予測因子である
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔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
研究協力者	柴田 洋孝 (Shibata Hirotaka)		
研究協力者	正木 孝幸 (Masaki Takayuki)		
研究協力者	工藤 明子 (Kudo Akiko)		

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