

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17249

研究課題名(和文) レニンアンギオテンシン系に着目した先天性腎尿路異常の腎障害進展機序の解明

研究課題名(英文) The genetical mechanism of chronic kidney disease in congenital anomalies of kidney and urinary tract, focused on renal renin-angiotensin system

研究代表者

石森 真吾 (Ishimori, Shingo)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：30465950

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)：対象を片側多嚢胞性異形成腎9例、片腎6例とし、対照は年齢、性別をマッチさせた正常産児17例を健常コントロールとし腎内局所レニン・アンギオテンシン系の指標とされる尿中アンギオテンシノゲン(ANG)を測定し各種臨床パラメーターとともに比較検討した。3群において背景因子に差はなく、尿中アンギオテンシノゲン/Crは片腎例、コントロール例と比較し片側多嚢胞性異形成腎例が有意に高値であった($p=0.004$ 、 $p=0.01$)。収縮期血圧は片腎例と比較し片側多嚢胞性異形成腎例が有意に高値であった(111 vs 101 mmHg、 $p=0.01$)。片側多嚢胞性異形成腎は腎内レニン・アンギオテンシン活性化との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多嚢胞性異形成腎は、固有腎としての機能を有さず数年で自然退縮するが、その機序や病態は不明である。一方、近年レニンアンギオテンシン(RAS)系のうち、腎内局所RASが多くの慢性腎疾患や腎発生過程の在胎期間に関連が検証されているが、多嚢胞性異形成腎と腎内局所RASとの関連を検討した報告はない。今回の研究結果から片側多嚢胞性異形成腎は腎内RAS活性化との関連が示唆された。腎発生過程もしくは出生後経過のどちらに関連しているかは現時点では不明であるが、多嚢胞性異形成腎の自然退縮過程を含めた腎内RASの経時的変化を評価する計画であり、より病態の本質に迫ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated the relationship between unilateral multicystic dysplastic kidney (MCDK) and renin-angiotensin system, with a focus on a urinary angiotensinogen as a biomarker of the intra-renal renin-angiotensin system. We enrolled 7 children diagnosed with unilateral MCDK and 6 with solitary kidney in our institutions between 2010 and 2020, and 17 with healthy children as controls. There were no significant differences in the sex ratio, median age, gestational age and birth weight among MCDK, solitary kidney and control groups. Urinary angiotensinogen/Cr levels of the MCDK group (median: 8.7 $\mu\text{g}/\text{ng}\cdot\text{Cr}$) was significantly higher than those of the solitary kidney and control groups (3.0 $\mu\text{g}/\text{ng}\cdot\text{Cr}$, $p=0.004$, 5.9 $\mu\text{g}/\text{ng}\cdot\text{Cr}$, $p=0.01$). The level of systolic blood pressure in the MCDK group was significantly higher than that in the solitary kidney group (111 vs 101 mmHg, $p=0.01$). Our results showed that MCDK might be associated with intra-renal renin-angiotensin system.

研究分野：腎臓学

キーワード：レニン・アンギオテンシン系 先天性腎尿路異常 多嚢胞性異形成腎 尿中アンギオテンシノゲン

1. 研究開始当初の背景

先天性腎尿路異常 (CAKUT: Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract) CAKUT は腎の発生過程に異常を来たす疾患群であり、小児における慢性腎臓病 (CKD) 及び末期腎不全 (ESKD) の原因のうち最多を占める。CAKUT 患者においては胎児期より CKD への進行が始まり、出生後に緩徐に進行し最終的に ESKD へと至るが、その CKD 進展機序は未だに病態解明には至っていない。

近年、腎臓領域における RAS 系の研究が進展し、腎の発生及び CKD に重要な役割を担うことが判明した (図 1)。RAS 系関連遺伝子は尿管芽、腎集合管形成に深く関与し、動物モデルでは *AGTR2* (アンギオテンシン II (AT2) レセプター遺伝子) 変異マウスは重複尿管や膀胱尿管逆流症を合併し (Rossetti, et al. J Am Soc Nephrol 2007) ヒトにおけるレニンやアンギオテンシノゲン (AGT) などの単一遺伝子変異が Renal tubular dysgenesis を引き起こす (Oliver, et al. Nature Genetics 2005)。一方で RAS による CKD 進展は腎間質線維化が主病態であると判明し、マウス血中 RAS 濃度の上昇が腎線維化障害を来すことが報告され (Mori T, et al. Hypertension 2004) AT2 持続投与ラットでは活性酸素種産生が亢進して尿細管障害を誘導する (Jennings BL, et al. Am J Physiol Renal Physiol 2012)。アルドステロンは培養近位尿細管細胞のミトコンドリア障害を惹起し、さらに臓器の線維化に重要な役割を果たす Epithelial-to-mesenchymal transition を引き起こす (Yuan Y, et al. Free Radic Biol Med 2012)。すなわち RAS 系は腎の発生及び CKD の進展双方に重要な役割を担っている。しかし、CKD 進展機序の未解明な CAKUT と RAS 系による腎間質障害との関連についてはこれまで一切検討がなされていない。

2. 研究の目的

日本人 CAKUT 小児の CKD 進展メカニズムを明らかにするとともに、CKD 進展予防の疾患特異的新規治療法の開発を行う。以下のように研究をすすめていく。

3. 研究の方法

計画当初の方法は以下の通りであった。

各 CAKUT 小児患者の血液を用い、次世代シーケンサーシーケンスパネルによって網羅的に遺伝子解析を行い、遺伝子型-表現型の相関について詳細に検討する。

CAKUT 小児の尿検体を用いて、腎内 RAS 活性化マーカーである尿中 AGT 測定を行う。さらに血液検体にて RAS 関連マーカーの測定や GFR の算出、腎超音波による腎体積の評価を行う。で行った次世代シーケンサーによる RAS 系関連遺伝子変異例における、尿中 AGT と腎糸球体濾過率や画像的腎形態との関連を詳細に検討する。

上記の尿細管上皮細胞を用いて免疫染色、ウェスタンブロット法を行い、RAS 系関連遺伝子 (*REN*, *AGT*, *ACE*, *AGTR1*, *AGTR2*) と間質線維化マーカー (コラーゲン、フィブロネクチン等) 活性酸素関連因子 (ROS, HO, O[•]等) ミトコンドリア障害関連因子 (PGC-1 等) EMT (SMA 等) 間質線維化促進因子 (TGF- β , PAI-1 等) の発現の関連を解析する。さらに尿細管上皮細胞から抽出した cDNA を用いて、上記因子の発現についてリアルタイム定量 PCR で定量を行い、それぞれの相関を解析する。

上記の尿細管上皮細胞を用いて、RAS 系阻害薬ならびに活性酸素阻害薬 (グルタチオン等) を投与することによる RAS 系関連遺伝子と間質線維化マーカー、活性酸素関連因子、ミト

コンドリア障害関連因子、EMT、間質線維化促進因子の発現の関連を免疫染色、ウエスタンブロット法を行い解析する。さらに尿細管上皮細胞から抽出したcDNAを用いて、RAS系阻害薬ならびに活性酸素阻害薬することによる上記因子の発現についてリアルタイム定量PCRで定量を行い、それぞれの相関を解析する。

しかし、実際には の各CAKUT小児患者において、以下のように腎内RAS活性化マーカー測定と臨床背景の比較を行った。2010年から2020年に片側MCDK、片腎と診断された例を対象とし、腎内局所RASの指標とされる尿中アンギオテンシノゲン (AGT) を全身性RASの指標として血中AGTを測定し、各種臨床パラメーターとともに比較検討した。尿中及び血中AGTはhuman total angiotensinogen kit[®]を用いて、ELISA法にて測定した。早産低出生体重児、腎機能低下例、発熱性尿路感染既往例は除外した。腎機能は血清クレアチニン(Cr)を用いて日本人換算によるeGFRを計算し、Cr-eGFR < 90ml/min/1.73m²を腎機能低下例と定義した。高血圧は、米国小児高血圧ガイドラインにおける年齢、性別毎の基準値に準じ定義した。腹部超音波にて測定した腎長径(片側MCDK例は健側腎長径)は、年齢別基準値と比較し評価した。年齢、性別をマッチさせた正常産児を健常コントロールとした。

4 . 研究成果

症例は全32例(片側MCDK: 9例、片腎: 6例、健常コントロール: 17例)であった。3群において背景因子(年齢、性、在胎週数、出生体重)に差はなかった。尿中AGT/Crは片腎群(3.0 µg/ng・Cr)、コントロール群(5.9µg/ng・Cr)と比較し片側MCDK群(8.7µg/ng・Cr)が有意に高値であった(p=0.004、p=0.01)。血清AGT、Cr-eGFR、腎長径は片側MCDK群、片腎群で有意な差はなかった。高血圧合併例の割合は片側MCDK群、片腎群で差はなかったが(p=0.09)、収縮期血圧は片側MCDK群が有意に高値であった(111 vs 101 mmHg、p=0.01)。

片側MCDKは腎内RAS活性化との関連が示唆された。腎発生過程もしくは出生後経過のどちらに関与しているかは現時点では不明である。今後、MCDK腎の自然退縮過程を含めた腎内RASの経時的変化を評価する計画であり、より病態の本質に迫ることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石森真吾、藤村順也、堀之内智子、山村智彦、榊原菜々、長野智那、西田浩輔、藤岡一路、忍頂寺毅史、野津寛大
2. 発表標題 多嚢胞性異形成腎における腎内レニンアンジオテンシン系の関連：パイロットスタディ
3. 学会等名 第30回日本小児泌尿器病学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shingo Ishimori, Junya Fujimura, Tomoko Horinouchi, Tomohiko Yamamura, Nana Sakakibara, China Nagano, Kosuke Nishida, Kazumichi Fujioka, Takeshi Ninchoji, Kandai Nozu, Kazumoto Iijima
2. 発表標題 Examination Of Relationship Between Multicystic Dysplastic Kidney And Intra-renal Renin-angiotensin System: A Pilot Study Of New Biomarker
3. 学会等名 14th Asian Congress of Pediatric Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shingo Ishimori, Junya Fujimura, Atsushi Kondo, Tomoko Horinouchi, Nana Sakakibara, Kazumichi Fujioka, Kandai Nozu
2. 発表標題 Unilateral multicystic dysplastic kidney may be linked to intrarenal renin angiotensin system in a young girl
3. 学会等名 第57回日本小児腎臓病学会
4. 発表年 2022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	飯島 一誠 (Iijima Kazumoto) (00240854)	神戸大学医学研究科 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	野津 寛大 (Nozu Kandai) (70362796)	神戸大学医学研究科 (14501)	
研究協力者	森貞 直哉 (Morisada Naoya) (00389446)	神戸大学医学研究科 (14501)	

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