

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17254

研究課題名(和文)腎幹細胞の老化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism of renal stem cell aging

研究代表者

大野 和寿(Ono, Kazutoshi)

自治医科大学・医学部・臨床助教

研究者番号：50867520

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、急性腎障害(AKI)患者(n=99)の尿中Epidermal growth factor(EGF)をELISAで測定し、尿細管障害の重症度および腎予後との関連を調べた。健康人と比較し、AKIで尿中EGFは有意に減少していた(14522 ± 2190 vs 3201 ± 459.7 pg/mL, p<0.05)。腎性AKIでは、腎前性AKIよりも尿中EGFは有意に低かった。AKIステージ3では、AKIステージ1よりも尿中EGFが有意に低かった。血清EGFと尿中EGFに有意な相関を認めなかった。以上より、尿中EGFはAKI後の尿細管修復を反映する非侵襲的なマーカーとして有用と思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により急性腎障害の診療における尿中EGFの重要性が示された。得られた知見は、「早期診断と病因の特定」「進行の監視と重症度の評価」「薬物の投与や調整のガイド」「予後の予測とリスクの評価」など様々な場面で活用できると思われる。バイオマーカーと他の臨床情報(症状、身体所見、検査結果など)とを組み合わせた総合的な判断により、急性腎障害の診療レベルのさらなる向上が期待できると思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we measured urinary Epidermal Growth Factor (EGF) levels in patients with acute kidney injury (AKI) (n=99) using ELISA, and examined its association with the severity of tubular injury and renal outcomes. Compared to healthy individuals, urinary EGF was significantly decreased in AKI patients (14522 ± 2190 vs 3201 ± 459.7 pg/mL, p<0.05). In renal AKI, urinary EGF levels were significantly lower than in prerenal AKI. In AKI stage 3, urinary EGF levels were significantly lower than in AKI stage 1. There was no significant correlation between serum EGF and urinary EGF. Based on these findings, urinary EGF appears to be a useful non-invasive marker reflecting tubular repair after AKI.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：急性腎障害 バイオマーカー EGF 尿細管再生

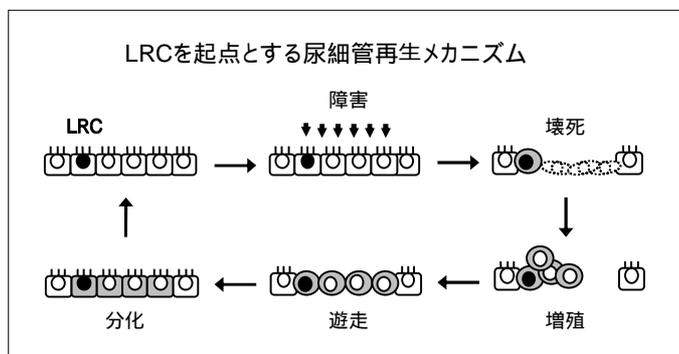
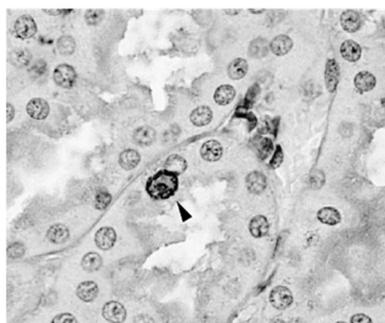
1. 研究開始当初の背景

腎臓の大部分を占める尿細管上皮細胞は、様々なチャネルやトランスポーターを発現し、電解質やアミノ酸、種々の薬剤の再吸収・分泌を司る重要な生理機能を担っている。一方、尿細管細胞は強い障害を受けても、一過性に尿細管壊死に陥るものの、非常に高い再生能力を発揮して元の構造を再構築することができる。臨床的には急性腎障害がこれに相当する。

ところが高齢者では急性腎障害が加わると腎機能の回復が遅い。加齢に伴い尿細管再生能(修復能)が低下するため、腎機能が改善せず慢性腎不全に移行し、透析導入に至るケースも少なくない。高齢の腎不全患者や透析導入患者数を減らすためにも、「加齢に伴って尿細管再生能が失われるメカニズム」を明らかにすることは、今後の高齢者腎疾患の診療の向上につながる重要課題と思われる。

申請者が所属する研究グループ(責任者:前嶋明人)は、これまで「腎臓の再生機序」、特に腎幹細胞に関して以下の研究を行ってきた。まず、急性腎障害の回復過程で観察される増殖細胞(再生細胞)の起源を調べるため、腎幹細胞の同定を試みた。その結果、組織幹細胞に共通した「細胞の分裂速度が非常に遅い」細胞、いわゆる **Label-retaining 細胞(LRC)** がラット成体腎の尿細管に存在することを確認した(下の写真)。さらに、虚血・再灌流障害の回復過程のごく初期から細胞分裂を開始し、その後増殖を繰り返して、最終的には成熟した尿細管上皮へ分化する、という腎幹細胞的な役割を果たす細胞集団であることを世界に先駆けて報告した(Maeshima A, et al. *J Am Soc Nephrol* 14: 3138-3146, 2003)(前頁の図)。また、In vitro で解析した結果、LRC には様々な腎臓構成細胞に分化する能力(多分化能)が備わっていることも判明している(Maeshima A, et al. *J Am Soc Nephrol* 17: 188-198, 2006)。

LRCs (矢印)



興味深いことに、若年ラットと比較して高齢ラットの LRC の数は有意に減少しており、加齢に伴う尿細管再生能の低下の要因と考えられた(Miya M, Maeshima A, et al. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F694-702, 2012)。しかし、加齢とともに腎幹細胞(LRC)の数がなぜ減ってしまうのかについては、よく分かっていない。

本研究では上記研究成果をさらに発展させて、加齢に伴う腎幹細胞の老化メカニズムを明らかにするために Histone 2B-GFP マウスを用いた研究計画を立てていた。しかし、新型コロナウイルス感染の蔓延により Histone 2B-GFP マウスの海外輸入が困難となったため、研究テーマを「急性腎障害における尿中 EGF 測定の有用性に関する検討」に置き換えて実験を進めた。

2. 研究の目的

AKI の診断は、血清クレアチニンの上昇や尿量の減少に基づいている。しかし、感度が鈍いため診断時には既に治療介入のタイミングを逸していることが少なくない。「早期診断と病因の特定」「進行の監視と重症度の評価」「薬物の投与や調整のガイド」「予後の予測とリスクの評価」など様々な場面で利用可能なバイオマーカーが求められている。

本研究では尿中 EGF に着目し、AKI バイオマーカーとしての有用性を検証した。

3. 研究の方法

自治医科大学(2018年12月から2020年1月、承認番号A18-081)で加療し、同意の得られた AKI 症例(計99名)から血清および尿サンプルを採取した。

AKI 診断時の血清および尿中 EGF を ELISA (R&D systems, San Diego, USA) で測定し、各種臨床パラメーターとの相関を解析した。生体腎移植ドナー14症例の尿を健常コントロール

として使用した。AKI の診断及び重症度は KDIGO ガイドラインに示された AKI 基準を使用した。

統計解析は GraphPad Prism 9 を用いて、2 群間比較 (Student's t-test/Welch's t test または Mann-Whitney test)、多群間比較 (Kruskal-Wallis test)、相関解析 (Spearman's rank correlation test) を行った。

4 . 研究成果

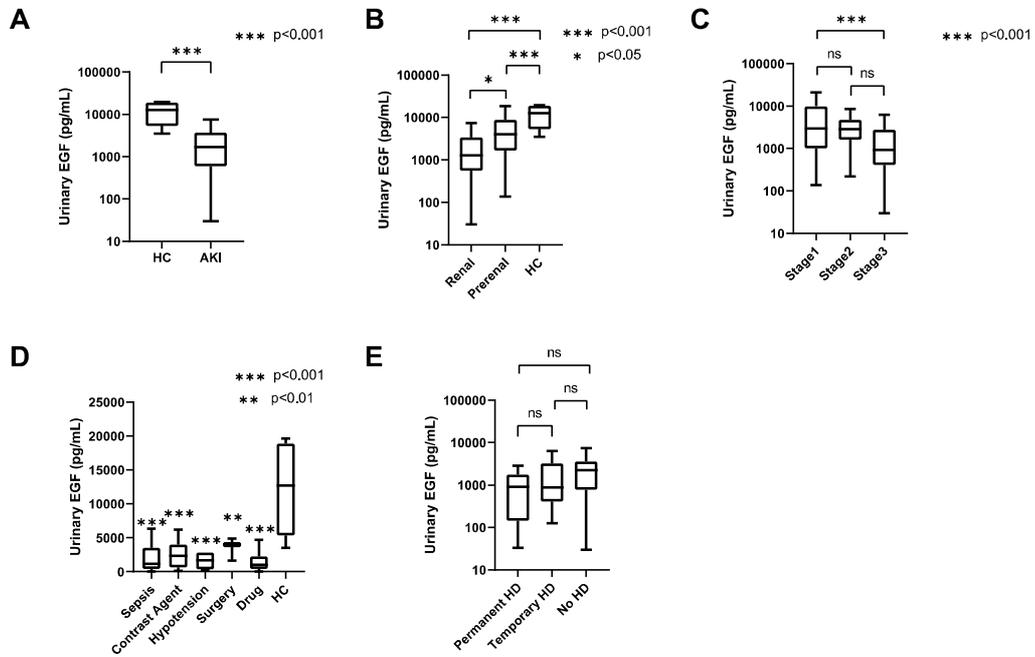
この研究に登録された症例の患者背景を表 1 に示す。急性腎障害 (AKI) の症例のうち、男性 71 人、女性 28 人であった。平均年齢は 64.1±1.5 歳 (平均±SE) であった。AKI 患者と健常対照群の合併症の頻度に有意差はなかった。血尿素窒素 (BUN)、血清クレアチニン、および CRP は AKI 患者では有意に高く、血清ナトリウム、推定糸球体濾過率 (GFR)、およびヘモグロビンは AKI 患者では有意に低値であった。

Table1. Clinical Characteristics and Outcomes

	AKI		Healthy Control		P
	n=99		n=16		
Age, years, mean ± S.E.	64.3 ± 1.5		54.9 ± 2.9		0.0159
BMI, kg/m ² , mean ± S.E.	24.4 ± 0.6		23.4 ± 0.8		0.4722
Male gender, n (%)	71 (71.7)		4 (25.0)		
Weight, kg, mean ± S.E.	63.8 ± 1.7		60.2 ± 3.2		0.3981
Complications, n (%)					
Diabetes	33 (33.3)		1 (6.3)		0.0363
Hypertension	69 (69.7)		7 (43.8)		0.0508
Dislipidemia	36 (36.4)		1 (6.3)		0.0193
Old myocardial infarction	7 (7.1)		0 (0.0)		0.5908
Old cerebral infarction	4 (4.0)		0 (0.0)		>0.9999
Angina pectoris	11 (11.1)		0 (0.0)		0.3577
Chronic obstructive pulmonary disease	1 (1.0)		0 (0.0)		>0.9999
Liver disease	5 (5.1)		0 (0.0)		>0.9999
Hematological data, mean ± S.E.					
Na, mEq/L	138 ± 0.6		142.1 ± 0.5		0.0034
K, mEq/L	4.4 ± 0.1		4.2 ± 0.1		0.3394
Cl, mEq/L	104 ± 0.6		105.9 ± 0.6		0.1111
BUN, mg/dL	53 ± 3.0		14.1 ± 0.8		<0.0001
Creatinine, mg/dL	4.02 ± 0.31		0.68 ± 0.04		<0.0001
eGFR, mL/min	20.1 ± 1.8		79.9 ± 3.6		<0.0001
Hemoglobin, mg/dL	10.4 ± 0.2		13.3 ± 0.2		<0.0001
Platelets, x10 ³ /μL	18.1 ± 1.0		26.1 ± 1.7		0.0035
WBC, x10 ³ /μL	9.4 ± 0.6		5.7 ± 0.4		0.0203
CRP, mg/dL	7.2 ± 0.9		0.24 ± 0.1		0.0011
Urinalysis, mean ± S.E.					
Urinary protein, mg/dL	221.3 ± 45.1		7.8 ± 2.4		<0.0001
NAG, IU/L	31.0 ± 3.5		4.2 ± 1.2		<0.0001
α1MG, mg/dL	58.1 ± 7.5		3.4 ± 0.8		<0.0001
β2MG, mg/dL	12220.8 ± 2370.3		162.9 ± 32.2		0.0026
NGAL, ng/mL	867.3 ± 150.4		21.8 ± 8.4		<0.0001
KIM-1, ng/mL	2.8 ± 0.3		1.5 ± 0.7		0.1152
L-FABP, ng/mL	161.7 ± 66.7		2.1 ± 0.6		<0.0001
FENa, %	3.7 ± 0.7		0.7 ± 0.1		0.0536
FEUrea, %	35.7 ± 2.3		37.3 ± 3.4		0.7537

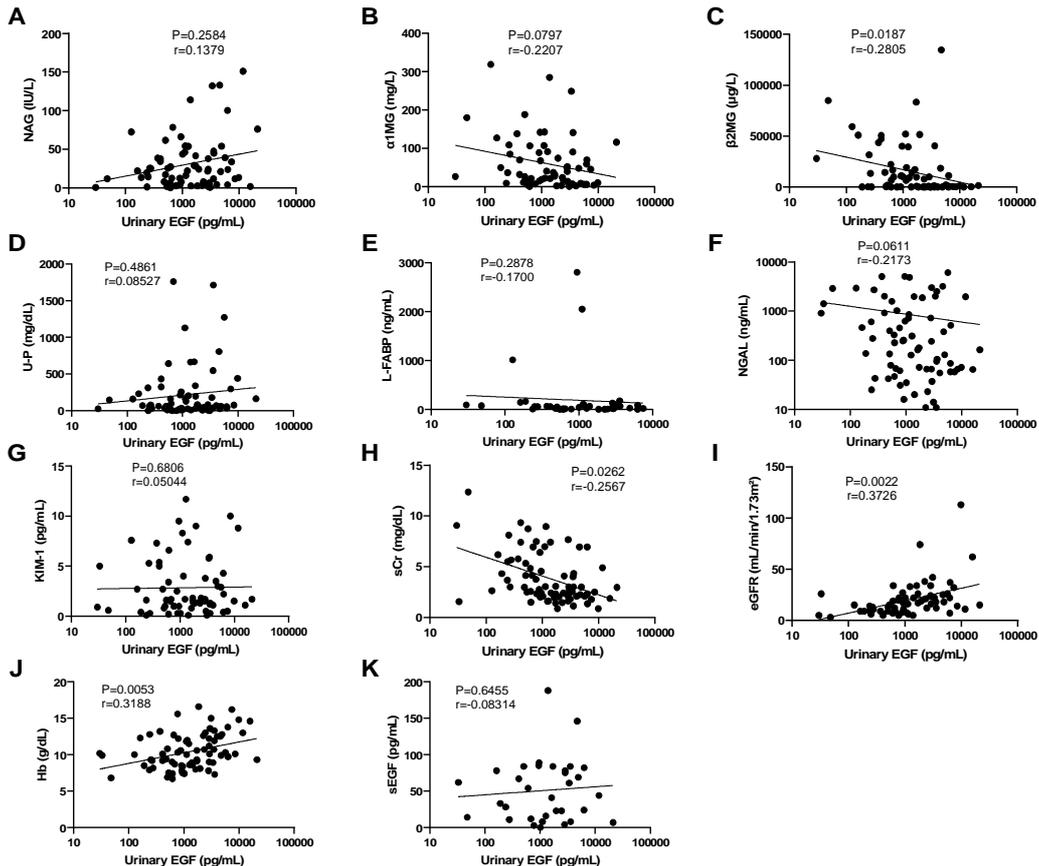
AKI 患者の尿中 EGF の有意な減少

まず、ELISA 法で AKI 患者の尿中 EGF レベルを測定した。AKI 患者の尿中 EGF は健常対照群と比較して有意に低下していた (図 1a)。腎前性 AKI と比較して、腎性 AKI の尿中 EGF は有意に低値であった (図 1b)。AKI のステージ別に尿中 EGF を比較すると、AKI ステージ 3 の尿中 EGF は AKI ステージ 1 よりも有意に低値であった (図 1c)。AKI の要因に関係なく、腎性 AKI 患者の尿中 EGF は有意に低下していた (図 1d)。腎代替療法を必要とした AKI 患者とそうでない患者の間に、尿中 EGF の有意な差はなかった (図 1e)。



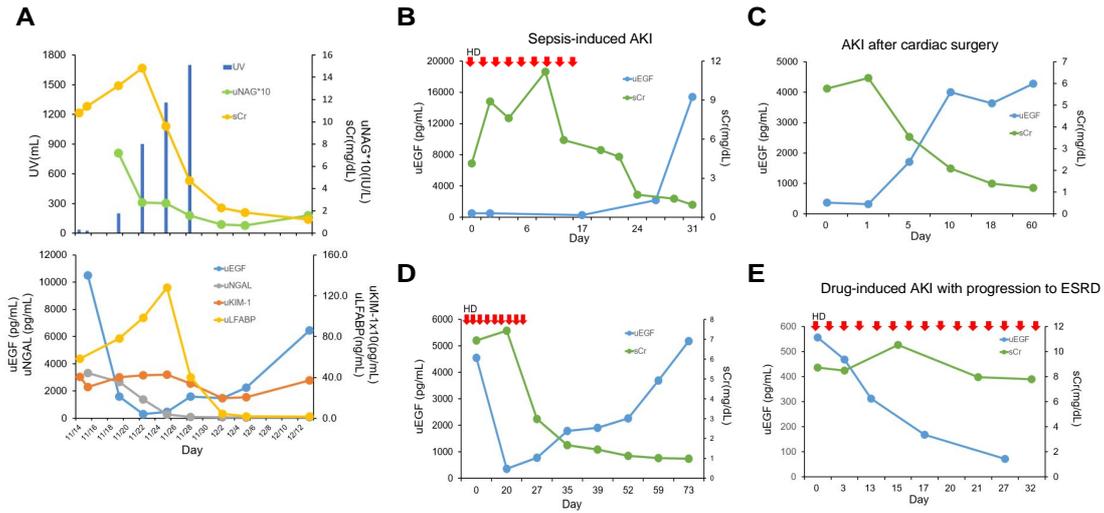
尿中 EGF と臨床的なパラメータとの関連

次に、尿中 EGF と臨床的なパラメータとの相関を調べた。尿中 NAG (図 2a)、尿中 α 1MG (図 2b)、尿蛋白濃度 (図 2d)、L-FABP (図 2e)、尿中 NGAL (図 2f)、尿中 KIM-1 (図 2g) および血清 EGF (図 2k) とは相関していなかった。一方、尿中 EGF は β 2MG (図 2c)、血清クレアチニン (図 2h)、eGFR (図 2i)、Hb (図 2j) と有意な相関を認めた。



さまざまな原因による AKI 患者における尿中 EGF の経時的変化

薬剤性 AKI の 1 例における尿中 EGF レベルと他の AKI バイオマーカーの経時的変化を比較した。この患者は RRT を必要としたが、尿量は徐々に増加し、腎機能も回復した（図 4a、上のグラフ）。入院時尿中 EGF レベルは有意に高値であったが、血清クレアチニン値、NGAL、KIM-1、および L-FABP の上昇と同時に急速に低下した。その後、尿中 EGF レベルは他のバイオマーカーと同様に基準値に回復した（図 4a、下のグラフ）。



次に、様々な原因による AKI 患者における血清クレアチニン値、尿中 EGF 濃度、および他の尿中バイオマーカーの経時的変化を調べた。敗血症症例の場合、尿中 EGF は著明に減少し、上昇していた血清クレアチニン値が低下すると同時に尿中 EGF は増加した（図 3a、b）。心臓手術後の AKI および一時的な血液透析を要した薬剤性 AKI においても同様に、血清クレアチニン値が高い時は尿中 EGF が減少し、血清クレアチニン値が改善すると尿中 EGF は回復傾向を示した（図 3c、d）。薬剤性 AKI が末期腎不全（ESKD）に進行した場合、尿中 EGF レベルは退院まで持続的に低下し、血清クレアチニン値の改善は認めなかった（図 3e）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Matsuoka Ryo, Masuda Takahiro, Akiyama Yuki, Muto Takafumi, Miyamoto Yuka, Imai Toshimi, Kamiyama Tomoki, Yokoyama Manami, Iwamoto Sumiya, Sugie Shun, Ono Kazutoshi, Nagayama Izumi, Kohara-Miura Marina, Komada Takanori, Suzuki Michiko, Maeshima Akito, Akimoto Tetsu, Saito Osamu, Nagata Daisuke	4. 巻 66
2. 論文標題 Protection of Dialysis Staff From COVID-19 Infection: Setting Up and Impact of Extended Blood Lines During Dialysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ASAIO Journal	6. 最初と最後の頁 1073 ~ 1075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MAT.0000000000001240	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩下山連, 永山泉, 大野和寿, 長田太助, 長谷川元, 前嶋明人
2. 発表標題 尿中Uromodulin: 急性腎障害の回復を反映する新規バイオマーカー
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菱田英里華, 大野和寿, 長田太助
2. 発表標題 尿細管・血管内皮Nrf2欠損が腎間質線維化に及ぼす影響についての検討
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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