

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880002

研究課題名（和文） 新規腎疾患診断法の開発 - Urinary Molecular Profiling -

研究課題名（英文） Development of innovative method for diagnosing renal disease - Urinary Molecular Profiling -

研究代表者

市居 修 (ICHII OSAMU)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：60547769

研究成果の概要（和文）：本研究では、腎疾患モデル動物および伴侶動物の腎臓および尿の解析を通じて、腎実質細胞が病態進行と共に尿中に脱落し、その質的および量的変化は腎臓の病態・機能の悪化と相関することを解明した。さらに、尿中の脱落細胞はmRNA・microRNAをターゲットとした分子生物学的手法で検出可能であり、腎病変の存在を「尿検査」という非侵襲的手法（Urinary Molecular Profiling）によって予測できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：This study clarified that the renal parenchymal cells were dropped into urine in renal pathological conditions. The quantitative and qualitative urinary cellular patterns correlated with the deteriorations of renal pathology and function in renal disease models and companion animals. Importantly, these urinary cells could be detected by molecular biological methods targeting mRNA and microRNA in urine. These data indicated the possibility that the urinary tests based on the detections of urinary cells, entitled “Urinary Molecular Profiling” in the present study, could be noninvasive diagnosis methods for renal disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

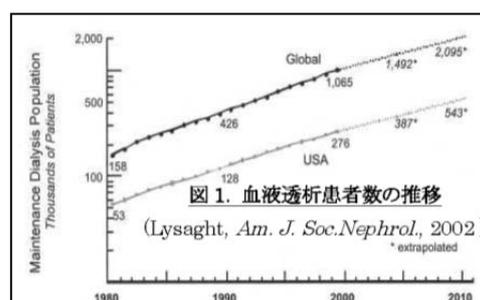
研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：バイオマーカー、尿、慢性腎臓病、伴侶動物、mRNA/microRNA、糸球体傷害、尿細管間質病変、Luminal Epithelial Deciduation (LED)

1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化社会を背景に人工透析患者数が世界的に増加傾向にある。この対策のため、慢性腎臓病（CKD）という概念が提唱されるようになった。CKDは腎障害の存在が明らか、糸球体濾過率の低下のいずれか、または両方が3ヶ月以上続く状態と定義され、末期腎不全の予備軍とされる。高齢化社会に伴う腎臓病罹患率増加は、獣医学領域でも深刻であり、

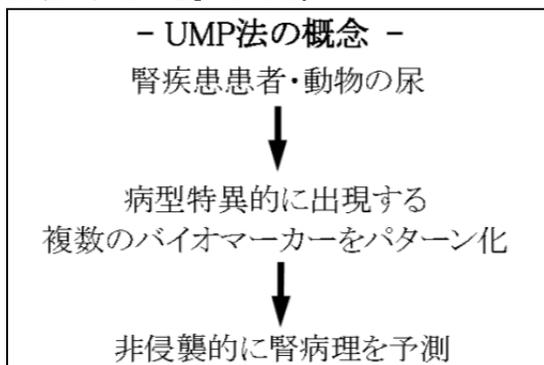


IRIS は伴侶動物の CKD ステージ分類・積極的な制御法を提唱している。

腎臓は体液恒常性の維持、血圧調節など多くの生体必須機能を担う。腎臓は非再生性の臓器であるため、腎臓病制御には予防医学的措置が必須である。腎臓病の確定診断は生検によるが、侵襲性が高い。即ち、現在の腎臓病制御における課題は「非侵襲的な早期診断法の確立」である。経験的に腎疾患罹患者の尿中には腎実質細胞の出現が知られている。そこで本研究では、新規の腎疾患診断方法として「尿中脱落細胞の評価」に着目した。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、「腎疾患モデル動物の尿中に出現するバイオマーカー候補を網羅的に解析し、病勢・病型ごとの変動パターンを明らかにすることで、尿による分子診断法 (Urinary Molecular Profiling: UMP 法) を確立すること」である。



3. 研究の方法

(1) 尿中バイオマーカーの選抜方法: CKD の原因疾患は糖尿病性腎症、慢性糸球体腎炎が大部分を占める。これらの疾患モデルの腎臓・尿を採取し、mRNA/microRNA (miRNA) の網羅的発現解析を行う。選出したバイオマーカー候補の尿中発現を定量的 Real-time PCR 法によって確認し、カットオフ値を算定する。

(2) 尿中バイオマーカーの腎臓内発現解析: 選出したバイオマーカーの局在を、各種腎疾患モデルマウスの腎臓で解析し、病型および傷害部位との関連性を明らかにする。

(3) UMP 法の確立-病態差・動物種差の確認: 得られた尿中バイオマーカーの出現パターンを他の動物種でも確認し、病型特異性を検証する。病態差および動物種差を確認後、臨床現場にて UMP 法を簡便に行えるキットの開発を目指す。

4. 研究成果

(1) 尿中バイオマーカーの選抜 ①

健常マウスと CKD モデルとして B6.MRLc1 慢性糸球体腎炎モデルマウスの腎臓内 mRNA 発現を PCRarray 法で網羅的に解析した。CKD マウスでは、炎症性メディエーターであるケ

モカイン (*Cxcl1s, Ccl1s*) とその受容体 (*Ccrs, Cxcrs*) の mRNA 発現が総体的に増加していた。

一方、最も顕著な増加を示した遺伝子は炎症性サイトカインの interleukin-1 family, member 6 (IL-1F6) であり、その腎臓内 mRNA・蛋白レベルの発現増加を定量的 PCR および免疫ブロット法で明らかにした。

CKD マウスの腎臓において、IL-1F6 蛋白は尿細管間質病変部の遠位尿細管から集合管上皮細胞の細胞質および核に局在し、IL-1F6 発現細管数は尿細管間質病変の進行と有意な正の相関を示した。

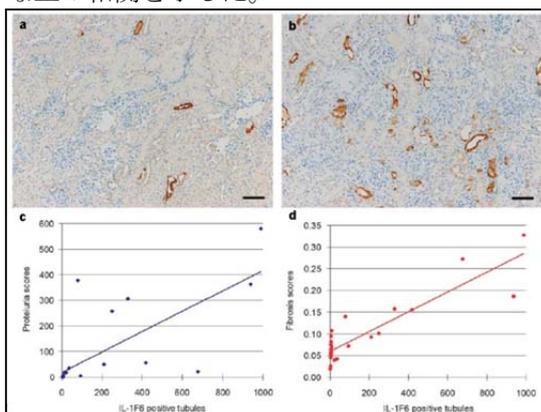


図1. IL-1F6 蛋白の局在。CKD モデルの腎臓(a 初期, b 最盛期)。IL-1F6 陽性細管数と尿中蛋白 (c)、線維化スコア (d) との相関。

STZ 誘導性糖尿病モデルマウスについても同様に解析を行い、病態の進行とともに腎臓内の IL-1F6 の発現が蛋白および mRNA レベルで増加することを確認した。

以上の結果より、IL-1F6 の腎臓内発現増加は、尿細管間質病変の指標となることが示唆された。IL-1F6 のバイオマーカーとしての可能性に着目し、CKD および STZ 誘導性糖尿病モデルマウスの尿を採取し、IL-1F6 の mRNA 発現を解析した。結果、モデルマウスの尿中で高率に IL-1F6 mRNA が検出された。

上皮細胞において IL-1F6 の発現を誘導するメカニズムを解明するために、マウス集合管上皮細胞 (M-1) と脾臓細胞との共培養を確立し、*in vitro* 尿細管間質病変を作出した。共培養系において、M-1 における IL-1F6 mRNA 発現は脾臓細胞の濃度依存性に増加し、上皮細胞マーカー mRNA 発現の減少および間葉マーカー mRNA 発現の上昇が認められた。

上皮細胞における上皮系マーカーの発現減少および間葉系マーカーの発現上昇は、上皮-間葉転換 (EMT) で認められるイベントである。尿細管間質病変では、周囲に浸潤する炎症性細胞あるいは上皮細胞自身が産生する因子によって IL-1F6 の発現が誘導されたと考えられた。

結論として、腎疾患時における腎臓内 IL-1F6 の発現増加は尿細管間質病変の進行と強く相関することが明らかとなった。さらに、IL-1F6 を発現する上皮細胞は脱落し、尿

中の IL-1F6 mRNA をターゲットとして検出可能であったことから、IL-1F6 は UMP 法における尿細管間質病変バイオマーカーになり得る。また、一連の管腔上皮脱落機構を Luminal Epithelial Deciduation (LED) と名付け、EMT を介した新規病理発生機構として提唱している。

(2) 尿中バイオマーカーの選抜 ②

前述の研究結果より、腎疾患の進行とともに尿中には腎実質由来の脱落細胞が出現することが明らかとなった。本パートでは、CKD の主たる一次疾患である糸球体腎炎に焦点を当て、尿中脱落細胞の動態と腎臓病理の相関をさらに詳細に解析した。

糸球体腎炎モデルとして雄の BXS/MpJ (BXS) を用いた。BXS の尿沈渣塗抹には、不定形大小不同の細胞が観察され、その数は C57BL/6 よりも有意に多かった。

BXS の尿中細胞数は、組織切片上の糸球体腎炎スコア (総細胞数/1 糸球体) および尿中アルブミン濃度と有意な正の相関を示した。

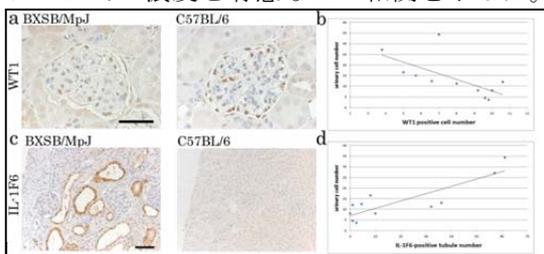


図 2. 腎病理と尿中細胞数の相関。糸球体上皮細胞の局在(a)と尿中細胞数と相関(b)、傷害尿細管の局在(c)と尿中細胞数との相関(d)。

以上の結果より、糸球体腎炎罹患動物では病態の進行に伴う尿中細胞数の増加が明らかとなった。

しかしながら、形態学的手法では尿中に出現する細胞型の同定は困難で合ったため、各種細胞マーカーを用いた RT-PCR 法を試みたところ、糸球体上皮 (*Wt1*)、遠位尿細管 (*Slc12a1*) および集合管 (*Aqp2*) の上皮細胞マーカー mRNA が BXS の尿中で高率に検出された。

また、BXS の尿中細胞数は組織切片上の WT1 陽性糸球体上皮細胞数および IL-1F6 陽性傷害尿細管数と有意な相関を示し、腎臓における糸球体上皮細胞数の減少および遠位尿細管・集合管上皮細胞の LED 増加が示唆された。

更なるバイオマーカー探索のため、BXS の腎臓内 mRNA 発現を網羅的に解析した。BXS の腎臓では *Il-10*、*Cxc12*、*C3* の mRNA 発現上昇が認められ、特に *C3* mRNA は尿中に高率に検出された。さらに、*C3* 蛋白および mRNA は腎皮質の尿細管に局在した。

以上より、糸球体腎炎における尿中脱落細胞増加は腎疾患増悪と有意に相関することが明らかとなり、特に糸球体上皮細胞、傷害尿

細管上皮細胞マーカー、および *C3* が UMP 法におけるバイオマーカーとなることが示唆された。これらは尿中脱落細胞の分子細胞診が非侵襲的かつ特異的腎疾患診断法となることを支持する。

(3) 病態差の確認

これまでの結果より、IL-1F6 が尿細管間質病変の尿中バイオマーカーとなることを糸球体腎炎モデル (B6.MRLc1, BXS) および STZ 投与モデルマウスで確認した。本パートでは、上記モデルマウスに加えて、ループス腎炎 (NZB/WF1, MRL/lpr) およびネフローゼ症候群 (ICGN) のモデルマウスを解析した。ループス腎炎およびネフローゼ症候群モデルにおける腎臓内 IL-1F6 の mRNA および蛋白発現量は健常マウスよりも高い値を示した。

さらにモデルマウスの尿中に IL-1F6 の mRNA が高率に出現することも確認した。

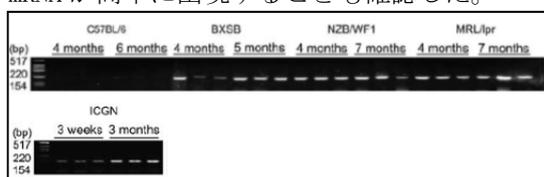


図 3. 各種腎疾患モデルの尿中に出現する IL-1F6 mRNA.

以上より、IL-1F6 は腎疾患の病型に依存せず、尿細管間質病変の指標となり、尿中にその mRNA が出現することを確認した。

(4) 伴侶動物における尿中バイオマーカー

これまでのマウスを用いた解析結果より、CKD 罹患動物の尿中には糸球体上皮細胞由来の脱落細胞が出現することを明らかにした。CKD において、糸球体濾過バリアーの破綻に起因する尿中蛋白の増加は、低蛋白血症や再吸収負荷の増大に伴う尿細管上皮細胞傷害を引き起こす。腎臓の糸球体毛細血管壁は、血管内皮細胞、基底膜および糸球体上皮細胞足突起によって構成される。糸球体上皮細胞の足突起間には、「スリット膜」と呼ばれる構造物が構成され、内皮細胞、基底膜およびスリット膜の三層構造が全身循環血液の濾過バリアーとして機能する。近年、ヒトおよび実験動物で、糸球体上皮細胞の減少 (Podocytopenia) およびスリット膜関連分子の遺伝子多型や機能低下が糸球体傷害に深く関与することが報告されている。本パートでは伴侶動物の CKD における糸球体上皮細胞傷害に着目し、イヌおよびネコの CKD におけるスリット膜関連分子 (ネフリン、ポドシン、ACTN4) の動態と尿中出现、および腎機能との関連性を解析した。

北海道大学および鹿児島大学付属動物病院で病理解剖されたイヌおよびネコからの腎臓、尿および血清学的データを本研究に供した。病理組織学的観察の結果、イヌおよび

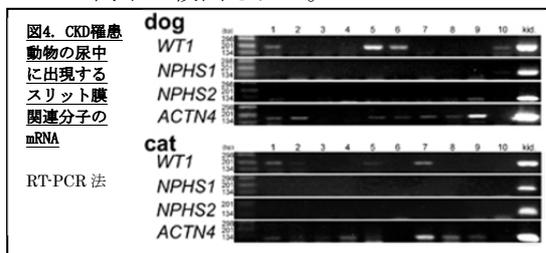
ネコのCKD群において、糸球体の肥大、メサンギウム基質の増加および基底膜の肥厚が認められ、特に重度の腎機能傷害を示す動物では間質の細胞浸潤や線維化など、尿細管間質病変も観察された。

免疫組織化学法 (IHC) の結果、イヌおよびネコの腎臓において、WT1 は糸球体上皮細胞の核に、ネフリン、ポドシンおよび ACTN4 は糸球体係蹄に沿って線状に局在した。蛍光抗体法において、イヌのCKD群におけるネフリンおよび ACTN4 陽性シグナルは健常群よりも弱く、顆粒状シグナルを示す部分も認められた。

イヌおよびネコのCKD群において、WT1 陽性細胞数は健常群よりも有意に低値であり、特にイヌで顕著な有意差が認められた。IHC スコアでは、ネフリンおよび ACTN4 において、イヌのCKD群が健常群よりも有意に低いスコアを示した。

腎機能と IHC スコアの相関解析の結果、イヌの血清クレアチニン値 (Cre) がネフリンおよび ACTN4 と有意な逆相関を示した。遺伝子発現解析の結果、イヌのCKD群におけるネフリン mRNA 発現量は健常群よりも有意に低く、腎機能との相関解析では Cre とネフリンに有意な逆相関が認められた。一方、ネコではスリット膜関連分子の動態と腎機能の間に有意な相関は認められなかった。

さらに、イヌのCKD群の尿中には ACTN4 の mRNA が高率に検出された。



CKD における糸球体上皮細胞傷害およびスリット膜関連分子の発現低下は、ネコよりもイヌで顕著に認められた。イヌの腎臓におけるスリット膜関連分子、特に腎臓内ネフリンおよび ACTN4 の発現量低下は腎機能悪化と強く相関し、傷害と共に糸球体上皮細胞は尿中脱落することが明らかとなった。以上より、CKD の病理発生メカニズムはイヌとネコで異なり、獣医腎泌尿器学領域では種特異的なCKD 制御戦略が重要であると考えられる。

(5) 尿中の腎疾患関連 miRNA の検索(未公表データにつき、図は無い)

miRNA は短鎖の一本鎖 RNA であり、mRNA を標的としてタンパク質発現を制御する。近年、腫瘍や免疫介在性疾患の病態に関与する miRNA が同定され、その病理学的役割が注目されている。本研究では、CKD に焦点を当て、バイオマーカーと成り得る miRNA を探索した。

健常群に C57BL/6、CKD 群に B6.MRLc1 系統のマウスを用いた。腎臓を採取し、マイクロアレイ法で miRNA の解析候補を選抜した。選抜した miRNA の腎臓および尿における定量化、発現細胞の同定、組織切片上の CKD スコアならび病態マーカーの腎臓内 mRNA 発現量との相関解析を試みた。

マイクロアレイ解析によって、CKD 群の腎臓で高発現する mi-R146a (2.2 倍 vs 健常群) を選抜し、腎臓および尿沈渣を用いた定量的 PCR 解析で CKD 群が健常群よりも高値を示すことを確認した。

同月齢における CKD スコア (糸球体細胞数、線維化面積、F4/80 陽性マクロファージ浸潤面積、IL-1F6 陽性傷害尿細管数) はいずれも CKD 群が高値を示し、腎臓内 mi-R146a 発現は全 CKD スコアと有意な正の相関を示した。

in situ hybridization 法およびレーザーマイクロダイセクション法で mi-R146a 発現細胞は主に腎間質の細胞浸潤病変に局在することを確認した。

CKD 群の腎臓内では、マクロファージ (CD68)、線維芽細胞 (S100A4)、尿細管上皮傷害 (IL-1F6) および炎症マーカー (IL-1 β 、IL-1RA、IL-10、CXCL2) の mRNA 発現が健常群よりも高く、いずれも腎臓内 mi-R146a 発現と有意な正の相関を示した。

以上より、CKD の腎臓で高発現する mi-R146a は間質病変の局所遺伝子発現制御に参加し、慢性炎症性病変の増悪あるいは抑制に関与していると考えられる。また、尿中でも検出可能であることから、バイオマーカー miRNA になり得る。

以上、本研究では腎疾患モデルおよび伴侶動物の腎臓および尿の解析を通じて、尿中には病態進行と共に腎臓由来の脱落細胞が出現し、その質的および量的変化は腎臓の病態機能の悪化と相関することを解明した。さらに、尿中脱落細胞は mRNA・microRNA をターゲットとした分子生物学的手法で検出可能であり、腎病変の存在を「尿検査」という非侵襲的手法 (Urinary Molecular Profiling) によって予測できる可能性を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Ichii O (1 番目、他 10 名). Pathological correlations between podocyte injuries and renal functions in canine and feline chronic kidney diseases. *Histol Histopathol*, in press, 2011, 査読有り.
- (2) Kimura J, Ichii O (2 番目、他 5 名). Quantitative and Qualitative Urinary Cellular Patterns Correlate with Progression of Murine

- Glomerulonephritis. *PLoS ONE*, 6(1): e16472, 2011, 査読有り.
- (3) Kanazawa T, **Ichii O** (2 番目、他 4 名). Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha Is Associated with Mesenchymal-Epithelial Transition in Developing Kidneys of C57BL/6 Mice. *J Vet Med Sci*, Epub ahead of print, 2010, 査読有り.
- (4) **Ichii O** (2 番目、他 8 名). Local overexpression of interleukin-1 family, member 6 relates to the development of tubulointerstitial lesions. *Lab Invest*, 90(3):459-475, 2010, 査読あり.
- (5) **Ichii O** (1 番目、他 6 名). Overexpression of interferon-activated gene 202 (Ifi202) correlates with the progression of autoimmune glomerulonephritis associated with the MRL chromosome 1. *Lupus*, 19(8):897-905, 2010, 査読有り.
- (6) **Ichii O**. Can we control the chronic kidney disease? -analysis of biological targets in animal disease models- (in Japanese). *J Hokkaido Vet Med Assoc*, 53: 638-644, 2009, 査読無し.

[学会発表] (計 11 件)

- (1) 西野智博、**市居 修** (4 番目、他 2 名). 129^{Ter}/Sv マウスの遺伝的背景は腎糸球体硬化症に抵抗性である. 第 151 回 日本獣医学会学術集会. 2011 年 3 月 31 日. 東京農工大学(開催中止につき要旨集への掲載のみ).
- (2) 瀬戸隆弘、**市居 修** (6 番目、他 3 名). 腎症候性出血熱の致死感染モデルの開発とその病態解析. 第 151 回 日本獣医学会学術集会. 2011 年 3 月 31 日. 東京農工大学(開催中止につき要旨集への掲載のみ).
- (3) **市居 修** (1 番目、他 6 名). 慢性腎臓病における microRNA の発現解析—腎間質病変に関与する mi-R146a—. 第 151 回 日本獣医学会学術集会. 2011 年 3 月 31 日. 東京農工大学 (開催中止につき要旨集への掲載のみ).
- (4) **市居 修** (1 番目、他 7 名). DBA/2 マウスの腎臓における遠位尿管上皮傷害 -多発性嚢胞腎の早期病変としての可能性-. 第 150 回 日本獣医学会学術集会. 2010 年 9 月 18 日. 帯広畜産大学(北海道帯広市).
- (5) 木村純平、**市居 修** (2 番目、他 5 名). 尿中脱落細胞の動態は腎疾患の増悪と相関する -糸球体腎炎モデルの解析. 第 150 回 日本獣医学会学術集会. 2010 年 9 月 18 日. 帯広畜産大学 (北海道帯広市).

- (6) **市居 修** (1 番目、他 10 名). 慢性腎臓病における糸球体上皮細胞傷害の解析—腎機能とスリット膜関連分子の動態はイヌとネコで異なる—. 第 3 回 日本獣医師泌尿器学会学術集会. 2010 年 7 月 11 日. 北里大学 (東京都港区).
- (7) 金澤智則、大塚沙織、**市居 修** (3 番目、他 2 名). マウスのネフロン形成過程における間葉 - 上皮転換 (MET) の解析. 第 149 回 日本獣医学会学術集会. 2010 年 3 月 28 日. 日本獣医生命科学大学 (東京都武蔵野市).
- (8) **市居 修** (1 番目、他 8 名). イヌおよびネコの腎疾患における病態差—腎機能とスリット膜関連分子の動態—. 第 149 回 日本獣医学会学術集会. 2010 年 3 月 28 日. 日本獣医生命科学大学 (東京都武蔵野市).
- (9) 木村純平、**市居 修** (2 番目、他 3 名). Development of innovative method for diagnosis renal disease - Analysis of urinary cells in model mice -. Hokkaido University International Symposium on Sustainability Weeks 2009. 2009 年 11 月 2 日. 北海道大学(北海道札幌市).
- (10) **市居 修** (1 番目、他 6 名). (DBA/2 x C57BL/6) F2 交雑マウスに出現する水腎症. 第 148 回 日本獣医学会学術集会. 2009 年 9 月 25 日. とりぎん文化会館(鳥取県鳥取市).
- (11) **市居 修** (1 番目、他 8 名). 腎疾患の新しい診断指標—Interleukin 1 family, member 6 は尿細管傷害マーカーになり得る. 第 147 回 日本獣医学会学術集会. 2009 年 4 月 2 日. 栃木県総合文化センター (栃木県宇都宮市).

[図書] (計 1 件)

- (1) 岡田 利也、**市居 修**、日本獣医解剖学会編. 学窓社. 獣医組織学第 5 版 第 12 章 泌尿器 腎臓. 2011. 361(p179-190).

[その他]

ホームページ等

- (1) <http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/anat/index.html>
- (2) [http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGLOBAL_ID=200901045319589831&t=1&d=1&q=\(205\)%3D6000011355](http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGLOBAL_ID=200901045319589831&t=1&d=1&q=(205)%3D6000011355)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
市居 修 (ICHII OSAMU)
北海道大学・大学院獣医学研究科・助教
研究者番号: 60547769