

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02935

研究課題名（和文）早期CKD患者の精密医療を目指した予後評価法の開発

研究課題名（英文）Development of a prognostic evaluation method for precision medicine of early-stage CKD patients

研究代表者

猪阪 善隆（Isaka, Yoshitaka）

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00379166

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：早期慢性腎臓病(CKD)患者の精密医療を目指した予後評価法を開発するために、1)人工知能(AI)や超解像度顕微鏡を利用した組織学的側面からの新規腎病理評価法確立するとともに、2)腎生検組織のsingle cell RNA sequence (scrNA-seq)解析やCKD患者の末梢血細胞FACS解析を用いた一細胞レベルの精密な遺伝子発現及び細胞間コミュニケーションの検討や3)腎病変進展に保護的役割を担うオートファジーの非侵襲的定量法の開発を行うとともに、4)既存の電子カルテ情報や新規腎病態マーカーとしてのD-アミノ酸解析データを統合し、5)AIを用いて腎予後を規定する本質的特徴量を抽出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年提唱された糖尿病関連腎臓病は、従来の「糖尿病性腎症」に加え、非典型的な経過を辿る糖尿病関連腎疾患を包括している。糸球体腎炎にもステロイドに反応良好な患者と反応不良な患者が存在する。このように一つの疾患概念に、病態の異なる複数の異なる病態が混在している場合、その臨床的鑑別が困難であるだけでなく、適切な治療を行う事もできない。2028年までに年間新規透析導入患者数を35,000人以下に減少させるというKPIを設定している。このようなKPIを達成するために、本研究で行った個々のCKD患者の病態を的確に把握したうえで患者を層別化し、病態に応じた精密医療を早期から開始する重要性が確認できた。

研究成果の概要（英文）：To develop a prognostic evaluation method for precision medicine of patients with early-stage chronic kidney disease (CKD), we will 1) establish a novel histological evaluation method for renal pathology using artificial intelligence (AI) and super-resolution microscopy, 2) investigate precise gene expression and intercellular communication at the single cell level using single cell RNA sequence (scrNA-seq) analysis of renal biopsy tissue and FACS analysis of peripheral blood cells from CKD patients, 3) develop a non-invasive quantitative method for autophagy, which plays a protective role in renal lesion development, 4) integrate existing electronic medical record information and D-amino acid analysis data as a novel marker of renal pathology, and 5) extract essential features that define renal prognosis by using AI.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：CKD 精密医療 AIによる腎病理診断 シングルセルRNA解析 D-アミノ酸 オートファジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国における腎疾患患者・透析患者の増加は医療経済的にも重大な問題であり、その対処法開発は喫緊の課題である。疾患に対する本質的な治療介入を行うためには、病態を的確に把握することが重要である。現在、「糖尿病関連腎臓病」という概念が提唱されているが、糖尿病性腎症と「糖尿病関連腎疾患」の境界は不明瞭であり、適切な治療介入の妨げになっている。すべての糖尿病患者に腎生検をすることは不可能であり、病態を反映する適切なバイオマーカーの同定は重要である。また、種々の糸球体腎炎 (IgA 腎症や膜性腎症、微小変化群など) の病態は異なっており、多くは原因も不明である。本来、病態にあった適切な治療が行われるべきであるが、ほとんどの糸球体腎炎にステロイド治療が行われており、その副作用が問題となる。このように一つの疾患概念に、複数の異なる病態が混在している場合、その臨床的鑑別が困難であるだけでなく、適切な治療を行う事もできない。2018 年度腎疾患対策報告書は、CKD 重症化予防を徹底し、2028 年までに年間新規透析導入患者数を 35,000 人以下に減少させるという KPI を設定している。このような KPI を達成するためには、個々の CKD 患者の病態を的確に把握したうえで患者を層別化し、病態に応じた精密医療を早期から開始する必要がある。

### 2. 研究の目的

早期慢性腎臓病(CKD)患者の精密医療を目指した予後評価法を開発するために、1)人工知能(AI)や超解像度顕微鏡を利用した組織学的側面からの新規腎病理評価法確立するとともに、2)腎生検組織の single cell RNA sequence (scRNA-seq)解析や CKD 患者の末梢血細胞 FACS 解析を用いた一細胞レベルの精密な遺伝子発現及び細胞間コミュニケーションを検討し、3)腎病変進展に保護的役割を担うオートファジーの非侵襲的定量法の開発を行うとともに、4)既存の電子カルテ情報や新規腎病態マーカーとしての D-アミノ酸解析データを統合し、5)AI を用いて腎予後を規定する本質的特徴量を抽出することを目的とする。

### 3. 研究の方法

1)AI を用いた腎生検診断において、内皮細胞、メサンギウム領域、基底膜、上皮細胞の領域ごとに詳細な所見を付けるために、組織学的特徴量抽出プロセスの効率化が望まれる。本研究では自己教師あり学習の一つである DINO を糸球体画像に応用し、その有用性を検討した。腎生検 PAS 染色画像 384 枚から目視で得た糸球体 10423 枚を用い、VisionTransformer (ViT) を backbone として DINO により学習させたモデルの注目箇所について得られた feature map を PCA を用いて解析した。

2)高齢者や CKD 患者は急性腎障害 (AKI) のリスクが高い。高齢者や AKI 患者の腎臓で発現が低下していることが報告されている転写因子 MondoA が AKI の発症や AKI から CKD への移行における役割について検討した。

3)腎臓病の発症および進展には、糸球体上皮細胞の足突起癒合や尿細管細胞のミトコンドリア障害などが関与している。しかし、これらの構造化は非常に微細なため、日常臨床で使用する光学顕微鏡では観察できない。そこで、患者の腎臓病診断に用いられたマッソントリクローム染色腎生検プレートをそのまま超解像度顕微鏡で観察することにより、上述の腎微細構造変化が観察可能であるか検討した。さらに、フーリエ変換を用いてこれらの構造変化を定量評価する方法を検討した。

4)腎尿細管細胞におけるオートファジーやリソソーム生合成を制御する転写因子 TFEB に着目して、研究を行った。

5)207 人の生体腎移植ドナーとレシピエントを対象にイヌリンクリアランス (C-in) による GFR と d-アミノ酸のレベルの関連性は、多変量因子分析を用いて検討した。

### 4. 研究成果

1)DINO により学習させたモデルの注目箇所について得られた feature map を PCA を用いて解析したところ、糸球体の形態的特徴を個別に認識していることを確認した。また、疾患分類タスク (微小糸球体病変、メサンギウム増殖性糸球体腎炎、膜性腎症、糖尿病性腎症の 4 クラス分類) では、DINO 学習済み ViT を用いることにより糸球体の特徴をより効果的に抽出できる可能性があることを確認した。

2)CKD 患者の腎尿細管では MONDOA の発現が低下していた。また、マウス腎臓では、MONDOA の発現は虚血下で減少し、再灌流下で増加した。尿酸細胞における MondoA の遺伝子ノックダウンはオートファジーを阻害し、Rubicon の発現増加を介して AKI に対する脆弱性を増加させた。MondoA 欠損 I/R 障害腎における Rubicon の抑制はオートファジーを活性化し、ミトコンドリア機能を保護した。I/R 後の回復期に MondoA を欠損させると、TFEB-PGC1 軸のダウンレギュレーションを介して腎障害が悪化した。以上より、MondoA がオートファジーを維持することによって AKI に対する脆弱性を防御し、その後ミトコンドリア機能を回復させることにより CKD への進行を

予防することが確認できた。

3) 超解像度顕微鏡を用いた検討により、糸球体足突起の変化を病態に応じて検討することが可能となった。尿細管細胞のミトコンドリア形態変化を定量評価すると、腎生検後の腎機能低下速度を予測できることが明らかになった。本研究成果を臨床に応用することにより、腎生検組織から患者個々の病態をこれまで以上に詳細に把握できる可能性がある。

4) 飽和脂肪酸の一つであるパルミチン酸は、TFEB を活性化するが、この TFEB 活性化は脂肪酸毒性に対抗し細胞を保護することを見出した。また、空胞病変は MLB 蓄積により生じるが、TFEB は蓄積した MLB を尿細管腔に排泄することで蓄積を減らすことが判明した。さらに、肥満患者では、尿細管の TFEB 活性が低下していることが判明し、TFEB 活性低下が胞病変を悪化させることが示唆された。これらの研究により、TFEB を標的とすることで、肥満や生活習慣病に伴う腎臓病に対する新しい治療の開発が期待される。

5) 多変量解析により d-アスパラギンの血中濃度が GFR を反映することが確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 18件／うち国際共著 18件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Yasuda Seiichi, Inoue Kazunori, Matsui Isao, Matsumoto Ayumi, Katsuma Yusuke, Okushima Hiroki, Imai Atsuhiko, Sakaguchi Yusuke, Kaimori Jun-ya, Yamamoto Ryohei, Mizui Masayuki, Isaka Yoshitaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Hepatic phosphate uptake and subsequent nerve-mediated phosphaturia are crucial for phosphate homeostasis following portal vein passage of phosphate in rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-32856-2	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 Nakamura J, Yamamoto T, Takabatake Y, Namba-Hamano T, Minami S, Takahashi A, Matsuda J, Sakai S, Yonishi H, Maeda S, Matsui S, Matsui I, Hamano T, Takahashi M, Goto M, Izumi Y, Bamba T, Sasai M, Yamamoto M, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Nakamura S, Yoshimori T, Ballabio A, Isaka Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 TFEB-mediated lysosomal exocytosis alleviates high-fat diet-induced lipotoxicity in the kidney.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight.	6. 最初と最後の頁 e162498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.162498.	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 Kaimori J. et al	4. 巻 7
2. 論文標題 A heterozygous LAMA5 variant may contribute to slowly progressive, vinculin-enhanced familial FSGS and pulmonary defects	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e158378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.158378	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 Morita Masashi, Mizui Masayuki, Masuyama Satoshi, Tsokos George C., Isaka Yoshitaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Reduction of Cell Surface T-Cell Receptor by Non-Mitogenic CD3 Antibody to Mitigate Murine Lupus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 855812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.855812	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 Yamamoto-Imoto Hitomi. et al.	4. 巻 38
2. 論文標題 Age-associated decline of MondoA drives cellular senescence through impaired autophagy and mitochondrial homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110444 ~ 110444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110444	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 Iwata Yukimasa, Okushima Hiroki, Hesaka Atsushi, Kawamura Masataka, Imamura Ryoichi, Takahara Shiro, Horio Masaru, Tanaka Youko, Ikeda Tatsuhiko, Nakane Maiko, Mita Masashi, Hayashi Terumasa, Isaka Yoshitaka, Kimura Tomonori	4. 巻 2
2. 論文標題 Identification of Diabetic Nephropathy in Patients Undergoing Kidney Biopsy through Blood and Urinary Profiles of d-Serine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney360	6. 最初と最後の頁 1734 ~ 1742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34067/KID.0004282021	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 該当する

1. 著者名 Hesaka Atsushi, Tsukamoto Yusuke, Nada Shigeyuki, Kawamura Masataka, Ichimaru Naotsugu, Sakai Shinsuke, Nakane Maiko, Mita Masashi, Okuzaki Daisuke, Okada Masato, Isaka Yoshitaka, Kimura Tomonori	4. 巻 2
2. 論文標題 d-Serine Mediates Cellular Proliferation for Kidney Remodeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney360	6. 最初と最後の頁 1611 ~ 1624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34067/KID.0000832021	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 該当する

1. 著者名 H Yamamoto-Imoto, S Minami, T Shioda, Y Yamashita, S Sakai, S Maeda, T Yamamoto, S Oki, M Takashima, T Yamamuro, K Yanagawa, R Edahiro, M Iwatani, M So, A Tokumura, T Abe, R Imamura, N Nonomura, Y Okada, DE Ayer Donald E. H Ogawa, E Hara, Y Takabatake, Y Isaka, S Nakamura, T Yoshimor	4. 巻 38
2. 論文標題 Age-associated decline of MondoA drives cellular senescence through impaired autophagy and mitochondrial homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110444 ~ 110444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110444	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 該当する

1. 著者名 Matsumoto Ayumi, Matsui Isao, Katsuma Yusuke, Yasuda Seiichi, Shimada Karin, Namba-Hamano Tomoko, Sakaguchi Yusuke, Kaimori Jun-ya, Takabatake Yoshitsugu, Inoue Kazunori, Isaka Yoshitaka	4. 巻 6
2. 論文標題 Quantitative Analyses of Foot Processes, Mitochondria, and Basement Membranes by Structured Illumination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney International Reports	6. 最初と最後の頁 1923 ~ 1938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2021.04.021	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 該当する

1. 著者名 Matsui Isao, Matsumoto Ayumi, Inoue Kazunori, Katsuma Yusuke, Yasuda Seiichi, Shimada Karin, Sakaguchi Yusuke, Mizui Masayuki, Kaimori Jun-ya, Takabatake Yoshitsugu, Isaka Yoshitaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Single cell RNA sequencing uncovers cellular developmental sequences and novel potential intercellular communications in embryonic kidney	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80154-y	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 該当する

1. 著者名 Ishii Chiharu, Akita Takeyuki, Kimura Tomonori, Sakai Shinsuke, Mita Masashi, Ide Tomomi, Isaka Yoshitaka, Hamase Kenji	4. 巻 96
2. 論文標題 Evaluation of Individual Variation of d-Amino Acids in Human Plasma by a Two-Dimensional LC-MS/MS System and Application to the Early Diagnosis of Chronic Kidney Disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 4876 ~ 4883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.3c05309	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 該当する

1. 著者名 Asahina Yuta, Sakaguchi Yusuke, Oka Tatsufumi, Hattori Koki, Kawaoka Takayuki, Doi Yohei, Yamamoto Ryohei, Matsui Isao, Mizui Masayuki, Kaimori Jun-Ya, Isaka Yoshitaka	4. 巻 14
2. 論文標題 Association between urinary uric acid excretion and kidney outcome in patients with CKD	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-55809-9	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 Oyaide Mai, Ishii Chiharu, Akita Takeyuki, Kimura Tomonori, Sakai Shinsuke, Mizui Masayuki, Mita Masashi, Ide Tomomi, Isaka Yoshitaka, Hamase Kenji	4. 巻 1719
2. 論文標題 Development of a three-dimensional HPLC system for the determination of serine, threonine and allo-threonine enantiomers in the plasma of patients with chronic kidney disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 464739 ~ 464739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2024.464739	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 該当する

1. 著者名 Cui Mengying, Yamano Koji, Yamamoto Kenichi, et al	4. 巻 121
2. 論文標題 HKDC1, a target of TFEB, is essential to maintain both mitochondrial and lysosomal homeostasis, preventing cellular senescence	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2306454120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2306454120	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 Sakai Shinsuke, Tanaka Youichi, Tsukamoto Yusuke, Kimura-Ohba Shihoko, Hesaka Atsushi, Hamase Kenji, Hsieh Chin-Ling, Kawakami Eiryō, Ono Hiraku, Yokote Kotaro, Yoshino Mitsuki, Okuzaki Daisuke, Matsumura Hiroyo, Fukushima Atsuko, Mita Masashi, Nakane Maiko, Doi Masao, Isaka Yoshitaka, Kimura Tomonori	4. 巻 5
2. 論文標題 d-Alanine Affects the Circadian Clock to Regulate Glucose Metabolism in the Kidney	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Kidney360	6. 最初と最後の頁 237 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34067/KID.0000000000000345	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 Matsumoto Ayumi, Matsui Isao, Uchinomiya Shohei, Katsuma Yusuke, Yasuda Seiichi, Okushima Hiroki, Imai Atsuhiko, Yamamoto Takeshi, Ojida Akio, Inoue Kazunori, Isaka Yoshitaka	4. 巻 325
2. 論文標題 Spatiotemporally quantitative in vivo imaging of mitochondrial fatty acid -oxidation at cellular-level resolution in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 E552 ~ E561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpendo.00147.2023	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 該当する

1. 著者名 Minami Satoshi, Sakai Shinsuke, Yamamoto Takeshi, Takabatake Yoshitsugu, Namba-Hamano Tomoko, Takahashi Atsushi, Matsuda Jun, Yonishi Hiroaki, Nakamura Jun, Maeda Shihomi, Matsui Sho, Matsui Isao, Isaka Yoshitaka	4. 巻 20
2. 論文標題 FGF21 and autophagy coordinately counteract kidney disease progression during aging and obesity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 489 ~ 504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2023.2259282	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 Taniguchi Ayumu, Kawamura Masataka, Sakai Shinsuke, Kimura-Ohba Shihoko, Tanaka Yoko, Fukae Shota, Tanaka Ryo, Nakazawa Shigeaki, Yamanaka Kazuaki, Horio Masaru, Takahara Shiro, Nonomura Norio, Isaka Yoshitaka, Imamura Ryoichi, Kimura Tomonori	4. 巻 8
2. 論文標題 D-Asparagine is an Ideal Endogenous Molecule for Measuring the Glomerular Filtration Rate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Kidney International Reports	6. 最初と最後の頁 1192 ~ 1200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2023.03.009	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0件

〔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
研究分担者	山本 陵平 (Yamamoto Ryohei)  (00533853)	大阪大学・キャンパスライフ健康支援・相談センター・准教授  (14401)	
研究分担者	木村 友則 (Kimura Tomonori)  (00631300)	大阪大学・大学院医学系研究科・招へい准教授  (14401)	

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
研究分担者	井上 和則  (Inoue Kazunori)  (10631301)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教    (14401)	
研究分担者	水井 理之  (Mizui Masayuki)  (30423106)	大阪大学・大学院医学系研究科・講師    (14401)	
研究分担者	松井 功  (Matsui Isao)  (60456986)	大阪大学・大学院医学系研究科・講師    (14401)	
研究分担者	高島 義嗣  (Takabatake Yoshitsugu)  (30403075)	大阪大学・医学系研究科・講師    (14401)	

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