

微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS)38 例、巣状糸球体硬化症 (FSGS) 31 例、糖尿病性腎症 109 例である。腎生検パラフィン切片を用いて、FSP1 とコラーゲン・タイプ IV の発現を 2 重免疫染色で検討した。腎生検凍結切片を用いて、FSP1 とシナプトポジンの発現を 2 重免疫染色で検討した。MCNS と FSGS に対しては、Laser capture microdissection (LCM)法を用い、糸球体病変での FSP1 mRNA の発現量を real-time PCR 法で定量解析した。また糖尿病性腎症患者を対象に、全例から随時尿を採取し、尿中細胞をサイトスピンでスライドグラス上に固定後、FSP1 とポドカリキシンの 2 重染色を実施した。

(研究の倫理面への配慮)

研究内容は、本学 IRB にて承認されている。全患者から研究参加に対する書面による同意を取得している。

## C. 結果

### 1. MCNS と FSGS における FSP1 の糸球体内発現

MCNS の糸球体内には FSP1 陽性細胞がほとんど認められなかった。FSGS では、糸球体基底膜の外側に FSP1 陽性細胞が認められ、シナプトポジンとの 2 重染色から、FSP1 陽性細胞はポドサイトであることが明らかになった。

FSP1 陽性細胞数は、分節状硬化病変のある糸球体において有意に多かった。

LCM と real-time PCR 法での定量的

解析から、FSGS における糸球体内 FSP1 mRNA 発現量は MCNS に比して有意に高いことが明らかになった。

### 2. 糖尿病性腎症における FSP1 の糸球体内発現

糖尿病性腎症においても、FSP1 とシナプトポジンとの 2 重染色から FSP1 陽性ポドサイトが認められることが確認された。びまん性病変の進展や結節性病変の出現とともに FSP1 陽性ポドサイト数は増加した。結節性病変を複数認める糸球体では、FSP1 陽性ポドサイトの基底膜からの剥離が認められた。また、全節性硬化病変を呈する糸球体では、FSP1 陽性ポドサイト数が有意に減少した。

糖尿病性腎症患者の尿中には、FSP1 陽性ポドサイトが認められ、臨床病期が進むにつれて、尿中 FSP1 陽性ポドサイト数は有意に増加した。また尿中ポドサイトの 86%が FSP1 を発現していた。

## D. 考察

FSGS の硬化病変を呈する糸球体や糖尿病性腎症の結節性病変を有する糸球体で、FSP1 陽性ポドサイトが増加していることから、これらの病変の出現に FSP1 陽性ポドサイトが関与することが示唆される。また、糸球体から剥離した FSP1 陽性ポドサイトが認められることと尿中に FSP1 陽性ポドサイトが検出されることから、FSP1 陽性ポドサイトは基底膜から剥離しやすいと考えられる。FSP1 の発現は

細胞運動能を活発にするなどの線維芽細胞様変化に関与することから、EMT 様の変化がポドサイトに生じた結果、ポドサイトが糸球体基底膜から剥離したと推測される。

#### E. 結論

ポドサイトにおける FSP1 の発現が EMT を惹起し、基底膜からのポドサイト剥離を誘導し、糸球体硬化の進展に関与することが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特記事項はない。

#### G. 知的所有権の出現登録状況

なし。

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

投稿準備中

##### 2. 学会発表

1) 鮫島謙一、中谷公彦、吉本宗平、浅井 修、原田幸児、木村久仁子、山口通雅、赤井靖宏、西野俊彦、椎木英夫、岩野正之、斎藤能彦

巣状糸球体硬化症における糸球体内 FSP1 陽性細胞の役割

第 49 回日本腎臓学会学術総会

2006 年

2) 岩野正之、山口通雅、豊田雅夫、木村久仁子、原田幸児、赤井靖宏、吉本宗平、浅井 修、中谷公彦、西野俊彦、鈴木大輔、久保篤史、金内雅夫、

斎藤能彦

糖尿病性腎症の進展における FSP1 陽性ポドサイトの意義

第 49 回日本腎臓学会学術総会

2006 年

3) 山口通雅、岩野正之、久保篤史、木村久仁子、原田幸児、中谷公彦、吉本宗平、浅井 修、西野俊彦、赤井靖宏、金内雅夫、斎藤能彦

糖尿病性腎症の臨床病期と尿中 FSP1 陽性ポドサイトの関連について

第 49 回日本腎臓学会学術総会

2006 年

4) Yamaguchi Y, Iwano M, Toyoda M, Nakatani K, Kimura K, Akai Y, Harada K, Suzuki D, Kanauchi M, Neilson EG, Saito Y.

Podocyte expression of fibroblast-specific protein 1 in diabetic nephropathy of type 2 diabetes.

The 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Nephrology.

2006 年

5) Samejima K, Nakatani K, Iwano M, Yoshimoto Y, Asai O, Sakan H, Yamaguchi Y, Kimura K, Harada K, Akai Y, Shiiki H, Neilson EG, Saito Y.

Podocyte expression of fibroblast-specific protein 1 (FSP1) is a valuable tool for early diagnosis of focal segmental glomerulosclerosis .

The 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Nephrology.

2006 年

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

各個研究報告書

「パールカンのヘパラン硫酸鎖変異マウスにおける大量タンパク負荷時のポドサイトアクチンに関する解析」

研究協力者： 吉村吾志夫

共同研究者： 森田 博之、渡辺 励、井上 嘉彦、田山 宏典、小向 大輔、  
乾 聖子、中山 隆弘、山本 弓月、永山 恭嘉、原 恭子、  
正路 久美、小岩 文彦  
昭和大学藤が丘病院 内科腎臓

**研究要旨**

本研究の目的は、ポドサイトアクチン細胞骨格系の大きな異常を呈さずに大量タンパク尿が出現する病態を示すことにあった。パールカンヘパラン硫酸鎖変異マウス腹腔内に大量のアルブミン負荷を施すと大量のタンパク尿を呈する。今回、光顕レベルにおいてファロイジン染色を、電顕レベルにおいてタンニン酸染色、及び、抗アクチン抗体を用いた免疫電顕を用いてアクチン細胞骨格系の評価を行った。本実験系では足突起と足突起のアクチン発現は保たれていた。また、家族性 FSGS の動物モデルで報告されているポドサイト胞体内タンニン酸濃染部位（アクチンに富む）は稀にしか観察されなかった。結論的に、本実験系では大量タンパク尿はポドサイトアクチン細胞骨格系の異常以外の機序を介して起きている可能性が高い。糸球体基底膜の分子構築が傷害されているので、機序のさらなる解析とヒトで同様の現象が起きているか否か調べる事が望まれる。

**A. 研究目的**

スリット膜構成分子は、種々の分子を介してアクチン細胞骨格系と結びついている。スリット膜構成分子の遺伝子変異で大量のタンパク尿が出現し、足突起融合に代表されるポドサイトアクチン細胞骨格系の異常を呈することは近年大いに着目されている。しかしながら、アクチン細胞骨格系の

著明な異常を伴わず大量タンパク尿が出現する病態に関する解析は遅れている。本研究の目的は動物実験モデルを用いてこの病態の存在を示すことにあった。

**B. 研究方法**

大量タンパク尿を呈する実験系として、パールカンヘパラン硫酸鎖変異

マウス腹腔内大量のアルブミン負荷を用いた。アクチン細胞骨格系の評価は光顕レベルではファロイジン染色、電顕レベルではタンニン酸染色、及び、抗アクチン抗体を用いた免疫電顕を用いて行った。

今回の動物実験は昭和大学で正式に承認された。倫理面において格別問題はない。

### C. 結果

腹腔内に大量のアルブミン負荷を施したパールカンヘパラン硫酸鎖変異マウスの足突起と足突起のアクチン発現は良く保たれていた。家族性FSGSの一部とその動物モデルで報告されているアクチンを多く含むポドサイト胞体内タンニン酸濃染部位は変異マウスにおいて稀にしか観察されなかった。

### D. 考察

変異マウス腹腔内アルブミン負荷の系においてポドサイトアクチン細胞骨格系の著明な異常は形態学的に認められなかった。本実験系の大量タンパク尿はポドサイトアクチン細胞骨格系の異常以外の機序を介して起きている可能性が高い。変異マウスは糸球体基底膜の分子構築が傷害されているので、基底膜の高次分子構築異常によってタンパク尿が生じるか否か、さらなる解析を試みる価値がある。さらに、ヒトにおける高度タンパク尿でも、基底膜の高次分子構築異常

が認められるか調べる価値があるであろう。タンパク尿は広い病態を包含するので、スリット膜やポドサイトアクチン細胞骨格系の異常のみでその分子機序を解明することに無理があるように思われる。スリット膜異常とは異なる機序を解明することは、将来、個々の症例の病態生理に応じた治療戦略を立てる一助につながるかもしれない。

### E. 結論

パールカンヘパラン硫酸鎖変異マウス腹腔内に大量のアルブミン負荷を施して惹起させた大量タンパク尿の動物実験モデルでは、ポドサイトアクチン細胞骨格系の異常が（免疫）形態学的に認められなかった。

### F. 健康危険情報

特記事項なし。

### G. 知的所有権の出現登録状況

特になし。

### H. 研究発表

#### 1. 論文発表

Morita H and Yoshimura A: Glomerulonephritis in sarcoidosis (editorial). Clin Exp Nephrol 10: 85-86, 2006

Morita H, Yoshimura A (他6名): Heparan sulfate of perlecan is involved in glomerular filtration. J Am Soc Nephrol 16:1703-1710, 2005

## 2. 学会発表

Hiroyuki Morita, Yasuharu Numata,  
Kiyotaka Akiyama, Kiyoko Inui,,  
Mutsushi Matsuyama, Ashio Yoshimura:  
Laminin alpha chain is mutated in the  
BUF/Mna strain, a spontaneous rat model  
for focal and segmental  
glomerulosclerosis (FSGS) ASN's 39th  
Annual Renal Week Meeting of the  
American Society of Nephrology, 2006

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「各種蛋白尿関連因子がヘパラン硫酸硫酸転移酵素群の発現とヘパラン硫酸プロテオグリカンのN-硫酸化部位に与える影響」

研究協力者 佐藤博、中山謙二、杉浦章、名取泰博\*  
東北大学病院腎・高血圧・内分泌科、\*国立国際医療センター

研究要旨

ヘパラン硫酸（HS）プロテオグリカン（PG）はその側鎖硫酸基により糸球体基底膜の荷電選択性を規定している。この硫酸化はHS硫酸転移酵素群に制御されるが、蛋白尿関連メディエーター刺激がこれら酵素発現に与える影響を培養ラット糸球体上皮細胞で検討したところ、IL-13、IL-10およびアンジオテンシンIIにより硫酸転移酵素の一つNDST-1の発現が減少し、さらにIL-13ではHSPGのHS側鎖数を変化させることなくHSのN-硫酸化部位を減少させることが確認された。NDST-1を介したHSの硫酸化部位の変化がcharge barrierの破綻に寄与する可能性が示唆された。

A

・ 研究目的

ヘパラン硫酸（HS）プロテオグリカンはその側鎖硫酸基により糸球体基底膜において荷電選択性を規定している。この硫酸化は、硫酸化されていない2糖繰り返し構造に対するN-deacetylase/N-sulfotransferase-1（NDST-1）によるグルクロン酸の脱アセチル化および硫酸化から始まり、C5-epimerase、2-O-sulfotransferase（2-OST）、6-OST、3-OSTの順に酵素反応が進行して硫酸化が行われる。また、蛋白尿に関連するメディエーターとしてTh2サイトカイン、アンジオテンシンII（AngII）などが知られているが、

これらとHS硫酸化機構が何らかの相互作用を有することが想定されている。我々はすでにラットネフローゼモデルにおいてHS硫酸化のkey enzymeであるNDST-1およびN-硫酸化HSが減少することを報告しているが（J Lab Clin Med, 2004）、今回、その機序の詳細を明らかにするために、蛋白尿発現に関わる各種メディエーター刺激によるNDST-1の発現、およびHS鎖のN-硫酸化部位の変化を検討した。

B. 研究方法

培養ラット糸球体上皮細胞（Yamabe H, et al: Nephrol Dial Transplant, 8: 519,

1993) に、ラット IL-13、IL-4、IL-10、および アンジオテンシン II (AII) 等をメディウム添加して刺激し、一定時間後に RNA および蛋白を抽出し NDST-1 発現の変化を定量的 RT-PCR および WB にて測定した。さらに N-硫酸化部位を認識する 10E4 抗体を用いて免疫細胞染色および半定量的解析を施行した。

### C. 結果

IL-13 刺激 24hr 後の NDST-1 mRNA 発現は用量依存性に低下した (IL-13 10ng/ml で  $73.2 \pm 7.8\%$  of control、 $p < 0.05$ )。IL-10、A II の刺激でも 4hr で NDST-1 mRNA 発現低下が見られたが IL-4 および TNF- $\alpha$ 、LPS、IL-1 beta では変化を認めなかった。

NDST-1 蛋白発現も IL-13、IL-10、A II の刺激で減少した。

HS 側鎖の N-硫酸化部位を認識する 10E4 抗体での免疫細胞染色を行ったところ、control では細胞周囲、細胞外基質への強い染色がみられたが、IL-13、IL-10、A II の刺激で染色性の低下が認められた。酵素抗体法を用いた半定量解析にて、IL-13 刺激で優位に 10E4 抗体の染色性が低下した (コントロール群:  $8.15 \pm 2.61$  vs. IL-13 群:  $4.88 \pm 2.67$ 、 $P < 0.01$ )。さらに、ヘパリチネース消化後の露出抗原である不飽和ウロン酸残基を認識する 3G10 抗体での半定量解析では染色性の低下を認めず、HS 側鎖数への影響はなかった。

### D. 考察

今回の結果から IL-13、IL-10 等の Th2 サイトカインおよび AII が、NDST-1 の発現を減少させ、さらに IL-13 で HS 側鎖数に変化を与えずに N-硫酸化部位を減少することが示された。NDST-1 は硫酸転移酵素群の律速酵素であり、引き続きおこる他の硫酸化部位の減少も考えられた。

### E. 結論

IL-13、IL-10 等の Th2 サイトカインおよび AII による蛋白尿発現に、NDST-1 による HS 硫酸化部位の減少が関与する可能性が示唆された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 知的所有権の出現登録状況

なし

### H. 研究発表

#### 1. 論文発表

Nakayama K, et al.: Altered expression of NDST-1 messenger RNA in puromycin aminonucleoside nephrosis. J Lab Clin Med, 143: 106-114, 2004

#### 2. 学会発表

杉浦章、他：ヘパラン硫酸硫酸転移酵素の蛋白尿関連サイトカインによる発現変化. 第 48 回日本腎臓学会学術総会、横浜、2005

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「妊娠高血圧症に伴うネフローゼ症候群における巣状分節性糸球体硬化病変」

研究協力者：横山 仁

共同研究者：和田隆志\*，大田 聡\*\*

所属：金沢医科大学腎機能治療学(腎臓内科)（教授）

金沢大学医学部附属病院腎臓内科\*，富山市民病院内科\*\*

研究要旨

妊娠高血圧症においてネフローゼを伴い出産後も蛋白尿の遷延する症例では，巣状分節性硬化(FGS)病変を生じることが報告されている．今回，妊娠高血圧症 27 例について，腎生検組織を含めた臨床病理学的所見を検討した．対象は 19-37 歳（平均 28 歳），初産婦 25 例，多胎妊娠 2 例であり，12 例(58%)にネフローゼを合併していた．腎生検組織では，10 例（37%）が endotheliosis のみであり，うち 1 例ずつに IgA 腎症，非 IgA メサンギウム増殖性腎炎，基底膜菲薄症が合併していた．一方，FGS 病変を 17 例（63%，cellular variant 1 例，collapsing variant 3 例，tip variant 8 例，perihilar variant 1 例）に認め，妊娠腎では，いずれの FGS 病変を生じることが確認された．免疫抑制療法を併用した 1 例を除いて出産後 6 ヶ月以内に蛋白尿は消失し，臨床経過は追跡可能な範囲で良好であった．また，2 例で再妊娠を確認したが，再発は認められなかった．

A. 研究目的

妊娠高血圧症においてネフローゼを伴い出産後も蛋白尿の遷延する症例では，巣状分節性硬化病変が生じることが報告されている．この成因として胎盤由来の可溶性 VEGF 受容体 1 (sFlt-1)による糸球体糸球体系系蹄内皮細胞障害と VEGF 異常による上皮細胞障害が注目されている．今回，妊娠高血圧症性腎症について腎生検組織を含めた臨床病理学的所見を検討した．

B. 研究方法

金沢医科大学，金沢大学ならびにその関連施設において腎生検を施行した 27 例（年齢：19-37 歳，平均 28 歳；初産婦 25 例，多胎妊娠 2 例）を対象に，臨床所見（妊娠経過，血圧，蛋白尿，腎機能）と病理学的所見を光顕，免疫蛍光抗体法ならびに電顕で検討した．巣状分節性硬化病変は，D'Agatiらの分類に従って 1) collapsing variant, 2) tip variant, 3) cellular variant, 4) perihilar variant, 5) NOS (not otherwise



specified)の5つの病型に分類した。また、巣状分節性硬化病変例の臨床所見と予後を特発例44例、遺伝性4例ならびに他の因子7例と比較した。

### C. 結果

1. 臨床所見：いずれの症例も、妊娠第3期より高血圧あるいは蛋白尿を認めた。HELLP症候群を呈した1例を除き、他の26例は、純粹妊娠中毒症（現在の妊娠高血圧症候群）と診断された。

27例全例が蛋白尿を示し、定量された22例では1.0-14.5g/日（平均6.3g/日）の蛋白尿を伴い、うち12例(全体の58%)は出産時にネフローゼ状態を呈した。

その臨床経過をみると、免疫抑制療法を併用した1例を除いて出産後6ヶ月以内に蛋白尿は消失し、追跡可能の範囲で良好であった。また、2例で再妊娠を確認したが、再発は認められなかった。

2. 腎生検病理所見：腎生検組織では、10例(37%)がpreeclampsiaに特徴的な糸球体係蹄内皮細胞のendotheliosisのみであり、うち1例ずつにIgA腎症、非IgAメサンギウム増殖性腎炎、基底膜菲薄症が合併していた。一方、巣状分節性硬化病変は17例(63%)で観察された。その病型の内訳をみるとcellular variant 1例、collapsing variant 3例、tip variant 8例、perihilar variant 1例が認められた。妊娠腎では、いずれの巣状分節性硬化病変を生じることが確認された。

3. 病因における臨床病理学的比較：妊娠に伴う巣状分節性硬化症例における蛋白尿、硬化病変の頻度は、他の基礎疾患と同様であったが、間質病変を伴わない特徴があった(Table 1)。さらに免疫抑制療法を行った1例を除き、妊娠に伴う巣状分節性硬化症例のいずれもが自然寛解を示した点だが、他の病因による症例と異なっていた(Table 2)。

### D. 考察

近年の分子機序の解明により妊娠高血圧症では、流血中のsFlt-1などの生理活性物質により、糸球体係蹄内皮細胞ならびに上皮細胞の機能障害を生じる。今回の検討により病理学的には、いわゆるendotheliosisを主体に、一部の症例では上皮細胞の器質的障害に伴う巣状分節性硬化病変を併発することが示された。但し、これらの病変は妊娠に伴うことより、出産後に速やかに臨床所見は改善するが、器質的障害の程度が強いと考えられた症例では、蛋白尿が遷延し、特発性など他の病因との鑑別を要した。しかし、妊娠腎の場合、最終的には全例が寛解しており、同じ病理像を示しても、予後が良好であることは、特発性あるいは遺伝性とは異なる上皮細胞障害機序を反映しているものと推測された。

### E. 結論

妊娠腎では、従来より知られているendotheliosisに加えてすべての巣状分節性硬化症病変を併発するが、出産後

は自然寛解し、その予後は他の原因による巣状分節性糸球体硬化症に比較して良好である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 知的所有権の出現登録状況

特になし

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Saki N, Wada T, Furuichi K, Shimizu K, Kokubo S, Hara A, Yamahana J, Okumura T, Matsushima K, Yokoyama H, Kaneko S: MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes. *J Leukoc Biol* 79:555-563, 2006.
2. Sakai N, Wada T, Yokoyama H, Lipp M, Ueha S, Matsushima K, Kaneko S: Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. *PNAS* 103(38): 14098-14103, 2006.
3. Wada T, Azuma H, Furuichi K, Sakai N, Kitagawa K, Iwata Y, Matsushima K, Takahara S, Yokoyama H, Kaneko S: Reduction in chronic allograft nephropathy by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Nephrol* 26: 319-325, 2006.
4. Yamahana J, Wada T, Furuichi K, Sakai N, Yokoyama H, Kaneko S: TAK-603, an anti-inflammatory compound, reduces crescentic

glomerulonephritis and preserves renal function in WKY rats. *Nephrol Dial Transplant* 21: 2736- 2744, 2006.

5. Imai H, Hotta O, Yoshimura M, Konta T, Tsubakihara Y, Miyazaki M, Tomida C, Kobayashi M, Suzuki S, Shiiki H, Yamauchi A, Yokoyama H, Nose M.: Deoxyspergualin, an immunosuppressant, in patients suffering from nephropathies with crescent formation: an open-label trial to evaluate safety and efficacy. *Clin Exp Nephrol* 10: 40-54, 2006.

##### 2. 学会発表

1. Yokoyama H., S.Ohta, T.Wada: Glomerular lesions in preeclampsia can show every histologic variants of focal segmental glomerulo- sclerosis. *ASN 39th Annual Meeting*, 2006.

横山 仁, 和田隆志: 全身性疾患と腎障害 up to date ループス腎炎: 最近の知見. 第 36 回日本腎臓学会西部学術大会, 2006.

Table 1 : Clinical profiles of subjects

	Idiopathic (N=44)	Hereditary* (N=4)	Preeclampsia (N=11)	Others** (N=7)
Age (y.o.)	38±3	33±9	28±2	50±8
Male:Female	30:14	3:1	0:11	4:3
Follow-up (month)	74±11	47±25	218±11	45±19
Mean BP (mmHg)	99±3	92±4	112±6	99±5
Proteinuria (g/day)	7.4±0.6	6.8±0.4	5.6±0.2	6.4±0.2
Serum T. prot (g/dl)	4.5±0.1	6.8±0.4	5.6±0.2	6.4±0.2
Serum Alb (g/dl)	2.1±0.1	4.0±0.2	ND	4.0±0.2
FGS lesions (%)	37±4	20±11	24±8	24±7
Interstitial fibrosis (score)	0.7±0.1	1.5±0.5	0.0±0.0	1.0±0.0

\*: Mitochondria A3243G abnormality 1, PAX-2 exon 9 C1566A substitution 1, Klinefelter syndrome 1, unknown etiology 1;  
 \*\*: Unilateral kidney 2, Obesity 4, Post-HUS 1

Table 2: Clinical outcome of each group

	Idiopathic (N=44)	Hereditary (N=4)	Preeclampsia (N=11)	Others (N=7)
Proteinuria at onset	(N=44)	(N=4)	(N=11)	(N=7)
Nephrotic (>3.5g/day)	42 (95%)	2 (50%)	8 (73%)	1 (14%)
Moderate (3.5-1.0g/day)	2 (5%)	1 (25%)	3 (27%)	3 (43%)
Mild (<1.0g/day)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	3 (43%)
After treatment				
Remission	33 (75%)	0 (0%)	11 (100%)	7* (100%)
Partial	12 (27%)	0 (0%)	1 (9%)	6 (86%)
Complete	21 (48%)	0 (0%)	10 (91%)	1 (14%)
	(*:Dietary protein restriction + ACEi/ARB)			
Renal failure	14 (32%)	2 (50%)	0 (0%)	0
Alive on HD	4	1	-	-
Patients' death	17 (39%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)
Renal death	10	0	0	0
Non-renal death	7**	1***	0	0

(\*\*):Cancer 2, Apoplexy 2, AMI 2, Sepsis 1, \*\*\*: sudden death)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「ステロイド依存性ネフローゼ症候群におけるシクロスポリン併用と骨密度」

研究協力者 松本 紘一  
日本大学医学部 腎臓内分泌内科 教授  
共同研究者 中根千枝、藤田宜是  
日本大学医学部 腎臓内分泌内科

研究要旨

難治性ネフローゼでは副腎皮質ホルモン（ス剤）に免疫抑制薬が併用されるが免疫抑制薬による骨密度への影響は評価が一定していない。そこでシクロスポリン（シ剤）併用時の骨密度について検討した。ス剤単独群の%YAMは $85 \pm 9$ から $63 \pm 21$ と有意に低下した。シ剤併用群では $87 \pm 9$ から $79 \pm 5$ と有意差を認めなかった。シ剤併用前後のス剤総投与量は $20 \pm 16$  gと $60 \pm 39$  gで、シ剤はス剤誘発骨粗鬆症の進行に抑制的に作用した。

A. 研究目的

難治性ネフローゼ症候群（ネ症）では副腎皮質ステロイドホルモン（ス剤）に免疫抑制薬が併用される。ス剤の副作用に骨粗鬆症が知られているが免疫抑制薬による骨密度への影響は評価が一定していない。そこでシクロスポリン（シ剤）併用時の骨密度の推移について検討した。

B. 研究方法

ス剤使用中の難治性ネ症でス剤単独群 23 例とシ剤併用群 7 例について DXA 法で骨密度を複数回測定し経年変化を検討した。

（研究の倫理面への配慮）

シ剤の併用はガイドラインに準拠

して決定され、観察医の意向は加味されていない。

C. 結果

ス剤単独群の%YAMは $85 \pm 9$  % から $63 \pm 21$  %と有意に低下した。シ剤併用群では $87 \pm 9$  %から $79 \pm 5$  %と軽度に減少したが有意差を認めなかった。シ剤併用後のス剤の1日投与量は $28 \pm 6$  mgから $13 \pm 9$  mgと減少していたが、総投与量は $20 \pm 16$  gから $60 \pm 39$  gと増加していた。

D. 考察

骨組織の恒常性は破骨細胞による骨基質吸収と骨芽細胞による骨基質形成の反復により維持されている。ネ

症に広く使用されるス剤は投与量や投与期間に依存した骨密度低下が知られているが、シ剤の骨代謝への影響については相反する報告がある。我々はネ症でス剤単独投与群とシ剤併用群の腰椎の骨密度を比較し、シ剤併用群で単独群に比べ有意な低下抑制を認めた。昨年我々はシ剤併用によりス剤の使用量を軽減できると報告した。従ってシ剤併用による骨密度の低下抑制はシ剤による直接作用とス剤使用量軽減による効果が考えられた。いずれの場合でもネ症におけるシ剤併用はス剤単独投与よりも骨代謝の改善面からも有用であった。

#### E. 結論

シ剤がス剤誘発型骨粗鬆症の進行に抑制的に作用することから、難治性ネフローゼ症候群ではス剤にシ剤を併用することが骨粗鬆症の予防面からも望ましいと考えた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 知的所有権の出現登録状況

なし。

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takayuki Fujita, Atsushi Satomura, Mutsuko Hidaka, et al.: Acute alteration in bone mineral density and biochemical markers for bone metabolism in nephrotic patients receiving high-dose glucocorticoid and one-cycle etidronate therapy, *Calcified Tissue International* 66:195-199, 2000
- 2) 藤田宜是：ステロイド骨粗鬆症—予防と対策—, *日大医学雑誌* 59: 87, 2000

##### 2. 学会発表

- 1) 藤田宜是, 里村厚司, 日高睦子, 他：ネフローゼ症候群（ネ症）における glucocorticoid(ス剤)大量投与における骨代謝障害と etidronate による効果 第42回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 1999.6
- 2) 藤田宜是, 福家吉伸, 里村厚司, 他：ステロイド誘発型骨粗鬆症における活性型ビタミン D とビタミン K 併用投与時の骨密度・骨代謝マーカーの変動（ワークショップ：骨粗鬆症）, 日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2001.5

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「糖尿病における腎糸球体への ARB 作用の検討」

研究協力者 御手洗哲也<sup>1)</sup>、長谷川元<sup>2)</sup>、高柳佳織、吉川 賢  
所属と役職 埼玉医科大学総合医療センター腎高血圧内科<sup>1)</sup> 教授、<sup>2)</sup> 助教授

研究要旨

二次性の難治性ネフローゼ症候群の代表疾患として糖尿病性腎症に注目した。糖尿病の動物モデルに塩分負荷を行うと糸球体病変が増強するが、STZ-誘発糖尿病を3群に分け、アンジオテンシン受容体拮抗薬（ARB）の効果を検証するとともに、単離糸球体のマイクロアレイ解析により糸球体に発現する遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、糖尿病の動物モデルに塩分負荷を行うと糸球体病変が増強するが、ARB投与で軽減し、糸球体の遺伝子解析からはBMP 6やserine protease inhibitorなどが関与していることが示唆された。

A. 研究目的

臨床的に高齢者のネフローゼ症候群の原因疾患として糖尿病性腎症が多く、そのほとんどが難治例である。これまで、一次性ネフローゼ症候群を問題にしてきたが、日常遭遇する難治性ネフローゼ症候群として、本年度は糖尿病性腎症に注目し、研究を行った。

糖尿病では尿細管 Na 輸送体の発現変化により体液過剰を招来し、糸球体過剰ろ過や糸球体高血圧の維持機構が働き、これが糸球体障害に関与すると考えられる。教室では糖尿病の動物モデルに塩分負荷を行うと、糸球体病変が増強することを報告してきた。そこで、STZ-誘発糖尿病ラットに塩分負荷を行う糸球体障害モデルを用い、アンジオテンシン受容体拮抗薬（ARB）

投与の有無による形態学的変化の差異と、糸球体での遺伝子発現の網羅的解析を行った。

B. 研究方法

6 週 齢 の 雄 SD ラ ッ ト に streptozotocin を 60mg/Kg 腹腔内注射して STZ-誘発糖尿病を作成し、①通常食群、②塩分負荷群（6%NaCl）、③塩分負荷+ARB（candesartan）投与群の3群に分け、6 週間飼育した。血液サンプル採取後、腎を摘出し、形態検査用のサンプルを採取、残った組織からメッシュ法で糸球体を単離後、RNA を抽出し、cDNA 合成後 Affymetrix 社製 GeneChip Rat Genome 230 2.0 を用いて、マイクロアレイ解析を行った。

(研究の倫理面への配慮)

研究計画書を動物実験検討委員会に提出し、審査を受けている。

### C. 結果

血清クレアチニン値、血糖値には3群間に差は認められなかったが、ARB投与により、血圧は有意に低下していた。また、塩分負荷+ARB投与群では塩分負荷群に比較し、尿蛋白排泄量は約50%減少し、腎重量も低下していた。NIH-Imageソフトを用い測定したglomerular surface areaもARB投与群で減少しており、糸球体病変も軽減した。

マイクロアレイ解析では241遺伝子に有意な発現増加を、118遺伝子に発現低下を認めたが、前者の98遺伝子が、また後者の66遺伝子は塩分負荷に関連するものと思われた。この中で、ARBの影響を反映すると考えられた有意な発現変化を示した遺伝子として、bone morphogenic protein (BMP) 6とserine protease inhibitor : serpin遺伝子が注目された。

### D. 考察

教室では糖尿病の動物モデルに対して塩分負荷を行うと、糸球体サイズの増大、硬化病変の増加、TGF- $\beta$ 発現細胞の増加などが認められ、糸球体障害が増強することを報告してきた。一方、大規模臨床試験でもアンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACEIs)やARBが糖尿病性腎症の発症、進展を抑制することが明らかにされ、現在治療の第

一選択薬になってきた。しかし、これらの薬物による腎保護作用の機序が充分解明されたわけではない。

本研究から、塩分負荷を行った糖尿病モデル動物の糸球体障害をARB投与が軽減させることが示された。今回、糸球体に発現する遺伝子群の中で、ARB投与群で大きな変化を認めたBMP-6は、BMP familyのメンバーとして同定され、TGF- $\beta$ による分化・増殖のシグナル伝達に関与することが明らかにされている。腎での正確な局在は明確にされていないが、DM腎症の進展に共通する硬化・線維化のシグナル伝達に関与している可能性が考えられる。一方、現時点ではserpin 2c遺伝子の作用や腎での局在に関して明らかにされていないが、腎に発現するSerine protease inhibitor familyには細胞外器質増生やメサンギウム細胞増殖作用が報告されており、本遺伝子も何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。

### E. 結論

糖尿病の動物モデルに塩分負荷を行うと糸球体病変が増強する、糸球体の網羅的遺伝子解析からはBMP 6やserine protease inhibitorなどが関与していることが示唆された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 知的所有権の出現登録状況

なし

## H. 研究発表

1. 論文発表  
準備中

2. 学会発表

Kikkawa M, Hasegawa H, Takayanagi K, et al.

Ameliorating effect of candesartan on glomerular damage in rats with diabetes and high salt diet, studied by glomerular microarray analysis.

Am Society of Nephrol meeting 2006



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「慢性腎臓病(CKD)に対する肥満の影響」

研究協力者 西 慎一<sup>1)</sup>、今井直史<sup>2)</sup>、井口清太郎<sup>2)</sup>、上野光博<sup>2)</sup>、下条文武<sup>2)</sup>  
新潟大学医歯学総合病院 血液浄化療法部 助教授<sup>1)</sup>  
新潟大学大学院医歯学総合研究科腎膠原病内科学<sup>2)</sup>

研究要旨

近年内臓肥満を伴うメタボリック症候群の症例が増加し、心血管系疾患の発症危険因子として注目されている。また、肥満そのものも高血圧、高脂血症、高尿酸血症、糖尿病に対する発症危険因子、あるいは増悪因子として注目されている。腎疾患と肥満との関連をみると、現在までに肥満関連腎症の存在が報告されている。本研究では、肥満が慢性腎臓病(CKD)にどのように影響するのか、この点を明らかにするために腎生検症例を対象として横断的解析を試みた。肥満群と非肥満群を比較すると、尿蛋白、血圧、総コレステロール、中性脂肪、尿酸の平均値は肥満群の値が有意に高値であった。しかし両群のクレアチンクリアランス、血清クレアチニン値には有意差はなかった。結論として、肥満はCKD症例における高血圧、高脂血症、高尿酸血症に対する増悪因子と判断された。しかも尿蛋白増加因子ではあるが、腎機能に対しては必ずしも障害因子であると結論できなかつた。

A. 研究目的

メタボリック症候群、あるいは肥満は、生活習慣病である高血圧、高脂血症、高尿酸血症、糖尿病に対する発症促進因子あるいは増悪因子である。近年、この事実が多く疫学的調査から証明されている。肥満とこれらの生活習慣病の合併は、心血管系臓器の動脈硬化病変を悪化させる危険因子であることが報告されている。肥満は全ての臓器の動脈硬化を促進することが推測される。従って、肥満は、腎動脈あるいは腎内動脈の硬化を促進し、

しいては、腎機能低下を加速し、慢性腎臓病(CKD)を悪化させることが予測される。今までに、肥満は、肥満関連腎症(ORG)と呼ばれる独立した糸球体疾患を発症させることも認識されてきた。このORGの報告は、1974年のWeisingerら<sup>1)</sup>の報告に始まる。彼らはネフローゼ症候群を呈する4人の肥満症例に腎生検を施行したところ、糸球体肥大と巣状分節性硬化所見が認められたことから、これらを特徴的組織所見と報告した。その後も<sup>2)</sup>、肥満関連腎症の報告は続き、ダイエットによ

り尿蛋白量が低下する可逆的なものであることも報告されてきた。

以上の背景から、CKD における肥満の実態調査を行ない、肥満が CKD 症例の尿所見、腎機能、その他の臨床データに及ぼす影響を疫学的に調査することを目的とした。

## B. 研究方法

1995 年から 2005 年までに、新潟大学医歯学総合病院および関連病院で腎生検を受け、原発性糸球体腎炎による CKD と診断された 3510 例の内、必要データが揃った 1602 例を対象とした。腎生検に関しては患者個々よりインフォームドコンセントを得た上で実施された。肥満の定義は、腎生検時の身長と体重より求めた body mass index(BMI)が 25 以上とした。腎生検時の臨床データとして、年齢、血圧、尿蛋白量、腎機能(クレアチニンクリアランス)、血液データとして、血清クレアチニン、尿酸、総蛋白量、アルブミン、総コレステロール、中性脂肪、空腹時血糖の値を検討した。糖尿病性腎症と診断された症例は除外した。

対象症例を肥満群と非肥満群に分け、2 群間で腎生検時の臨床データの平均値と、腎生検組織所見を比較した。また、肥満と臨床検査値との関連を分析する目的で、多変量解析を施行した。BMI を独立因子として、他のデータを独立因子ととして重回帰分析を施行した。また、肥満を従属因子、その他臨床データを独立因子としてロジスティック重回帰分析を施行した。

(研究の倫理面への配慮)

腎生検を施行するに当たっては、個々の患者さんに対して、腎生検の必要性と危険性について説明を行い、インフォームドコンセントを十分得た上で実施した。データ解析は、患者個人が特定できないように配慮し行なった。

## C. 結果

CKD 対象症例 1602 例の内、BMI 25 以上の肥満例は 592 例(37.3%)であった。臨床検査値を非肥満例 1010 例(62.3%)と比較すると、年齢、尿蛋白量、収縮期血圧、拡張期血圧、尿酸、総コレステロール、中性脂肪、空腹時血糖の平均値は肥満群が有意に高値であった。アルブミンは肥満群の方が有意に低値であった。一方、クレアチニンクリアランス(Ccr)、血清クレアチニン、総蛋白に関しては、両群間で平均値に有意差は認められなかった(表 1)。

CKD 症例において、BMI と他の臨床データとの関連を調べるために、重回帰分析を施行した。その結果では、年齢、収縮期血圧、尿蛋白量、Ccr、尿酸、中性脂肪、アルブミンが正の回帰係数をもって有意な関連因子として算出された。(表 2)。

次に、肥満を従属因子、その他の臨床データを独立因子としたロジスティック重回帰分析も実施した。その結果では、収縮期血圧、尿蛋白量、Ccr、尿酸、中性脂肪が肥満に対しての有意な関連因子であることが確認された(表 3)。

最後に、肥満群と非肥満群における糸球体病変を比較した。注目したのは、肥満関連腎症に特徴的とされる巣状分節性硬化病変の存在率である。肥満群と非肥満群の分節性硬化像の頻度はそれぞれ 30.3%、34.9%であり、両群に有意差はなかった。

#### D. 考察

肥満関連腎症においては、肥満そのものが尿蛋白量の増悪因子と注目されている。その機序としては、肥満による糸球体濾過量、あるいは糸球体内高血圧ではないかと推測されている<sup>3)</sup>。

今回の解析では、原発性糸球体腎炎による CKD 症例を対象としても、肥満群の尿蛋白量は有意に多く ( $p < 0.0001$ )、多変量解析でも、BMI あるいは肥満は、尿蛋白量と密接かつ有意な関連があることが証明された ( $p < 0.05$ )。このことから、CKD 症例においても、肥満が尿蛋白増加に対する危険因子であることが証明されたと考えられる。

一般的に腎疾患を合併しない症例では、肥満は高血圧、高脂血症、高尿酸血症、糖尿病に対する増悪因子と認識されている。今回の原発性糸球体腎炎 CKD 症例を対象とした肥満群と非肥満群との単変量解析でも、やはり肥満は血圧、血中脂質、尿酸、血糖値の増悪因子であることが示唆された。しかし、多変量解析に持ち込むと、収縮期血圧、尿酸、中性脂肪の3項目のみが肥満に対する独立した有意関連因子であることが判明した。

血圧は糸球体腎炎の増悪因子であることはしばしば報告されている。しかし、尿酸、中性脂肪に関して、それらが単独で糸球体腎炎の増悪因子であるとする報告は少ない。

今回は横断的な解析であるが、肥満が CKD 症例の腎機能に及ぼす影響に関しては興味深い結果が得られた。肥満群と非肥満群を比較しても、Ccr と血清クレアチニンに有意差がないことが単変量解析で判明し、多変量解析でも、肥満例のクレアチンクリアランスは上昇する傾向が示された。つまり、肥満が腎機能保持にポジティブに関与していると判断されるデータであった。この結果に対する解釈としては、肥満群の尿蛋白量が多いことも含めて考察すると、肥満に伴う糸球体過剰濾過が関与しているのではないかと推測された。今回の解析は横断的なものであり、このような肥満に伴う糸球体過剰濾過が長期的関与した場合、その後の腎機能低下を促進するか否か、縦断的解析が必要と思われる。

肥満関連腎症では、糸球体の分節性硬化所見が特徴とされている。今回私たちが対象とした肥満群と非肥満群では、分節性硬化所見の出現頻度に有意差は確認されなかった。この事実から、本邦で認められる比較的軽症肥満例では、肥満そのものが単独で肥満化関連糸球体障害の一型である分節性硬化所見を惹起するものではないと判断された。

## E. 結論

肥満は原発性糸球体腎炎を有するCKD症例において、高血圧、蛋白尿、高中性脂肪血症、高尿酸血症の増悪因子である。しかし、腎機能に対しては、保護的に働いており、背景に糸球体過剰濾過が関与していると推測された。また、肥満が、肥満関連腎症に特徴とされる分節性糸球体硬化所見の出現に対する有意な誘導因子であることは証明されなかった。

## 参考文献

1. Weisinger JR, Kempson RL, Eldridge FL, Swenson RS : The nephrotic syndrome: a complication of massive obesity. *Ann Intern Med* 4 : 440-447, 1974
2. Wesson DE, Kurtzman NA, Frommer JP : Massive obesity and nephrotic proteinuria with a normal renal biopsy. *Nephron* : 40 :235-237, 1985
3. Chalmers L, Kaskel FJ, Bamgbola O.: The role of obesity and its biochemical correlates in the progression of chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 13:352-64,2006
4. Kaartinen K, Syrjanen J, Porsti I, Harmoinen A, Pasternack A, Huhtala H, Niemela O, Mustonen J: Insulin resistance and the progression of IgA glomerulonephritis.
5. *Nephrol Dial Transplant.* 22:778-83,2006

## F. 健康危険情報

この研究においては、特記すべきことなし。

## G. 知的所有権の出現登録状況

なし

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Imai N, Nishi S, Alchi B, Ueno M, Fukase S, Arakawa M, Saito K, Takahashi K, Gejyo F · Immunohistochemical evidence of activated lecithin pathway in kidney allografts with peritubular capillary C4d deposition. *Clin Transplant* · 21:2589-2595, 2006

### 2. 学会発表

- 1) 西 慎一、下条文武、高橋公太:腎移植患者の生活習慣病 第36回日本腎臓学会 西部学術大会 2006
- 2) 荒川正昭 西 慎一:運動と生活習慣病 第17回日本臨床スポーツ医学学術集会 2006