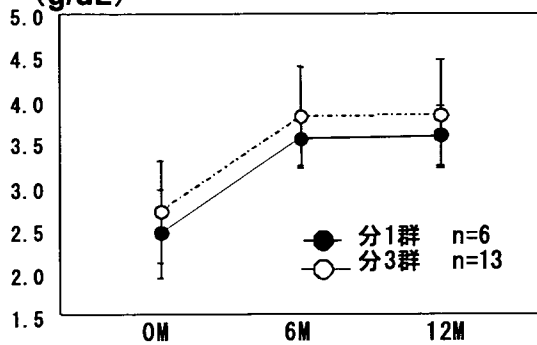


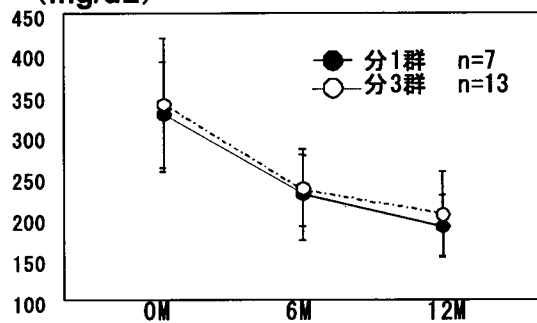
血清アルブミン
(g/dL)



分1群 性別 男:女=5:1
年齢 57.5±7.7歳(平均±SD)

分3群 性別 男:女=10:3
年齢 59.6±7.1歳

総コレステロール
(mg/dL)



分1群 性別 男:女=5:2
年齢 54.3±11.1歳(平均±SD)

分3群 性別 男:女=10:3
年齢 59.6±7.2歳

図13 PSLとMZR併用療法における血清アルブミンと血清総コレステロールの群間比較

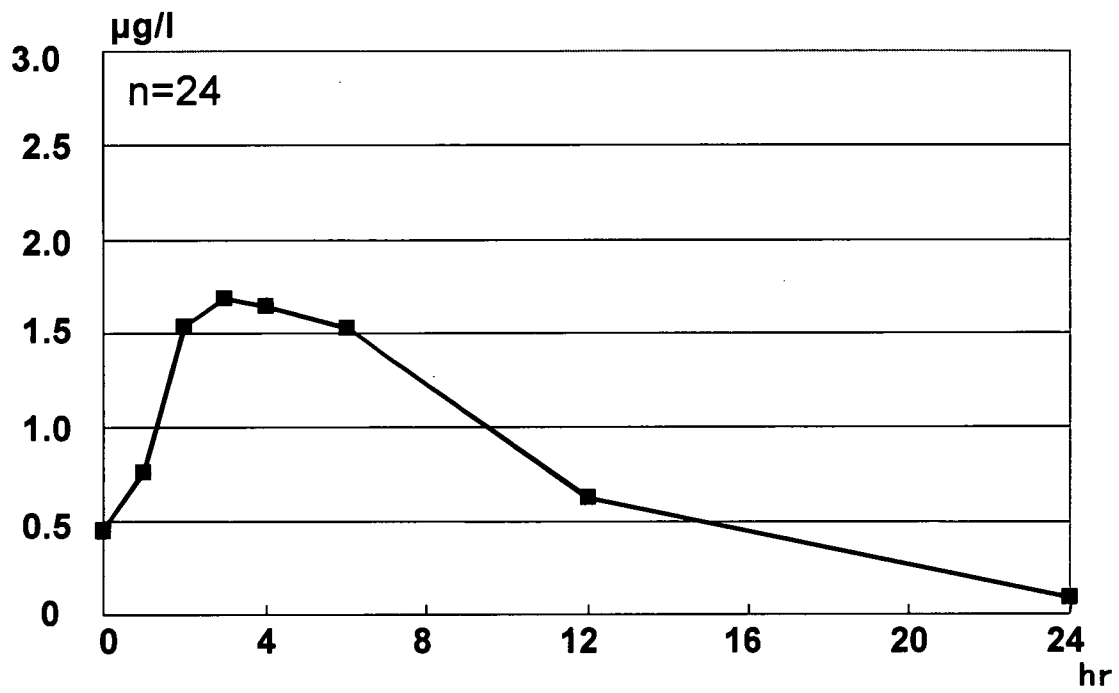


図14 ミソリピン平均血中濃度曲線

表4 ミゾリビンの至適投与量

$$C2 = 1.24 - 0.02 \times GFR(\text{MDRD}) + 0.55 \times MZR(\text{mg/kg})$$

$$|R|=0.56$$

Tmax: C2 = 2 (µg/l)とすると

$$MZR(\text{mg/kg}) = (0.02 \times GFR(\text{MDRD}) + 2 - 1.24) / 0.55$$

CKD stage	GFR(ml/min)	MZR(mg/kg)
1	≥ 90	4.65
2	60-89	3.56
3	30-59	2.47
4	15-29	1.92
5	<15	-

表5 シクロスポリン使用・腎生検アンケート調査

1)使用症例数	428例 (31例/施設)	
2)投与量	1.5mg/kg (MCNS)(ときに3mgまで) 2~3mg/kg (MGN, FSGS)	
3)投与期間	6ヵ月	2施設
	12ヵ月	2施設
	24ヵ月	6施設
	25ヵ月以上	7施設
	不明	1施設
4)腎生検症例	52例(8施設)	
5)腎生検目的	腎機能障害疑い、長期使用のため	
6)CyA腎症診断例	34例	平均投与期間 43ヵ月
軽微	9例	27ヵ月
軽症	20例	47ヵ月
中等症	4例	22ヵ月
重症	1例	120ヵ月

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

「間質線維化の進展における HIF-1 α の関与」

研究協力者 岩野正之

奈良県立医科大学第1内科・講師

共同研究者 木村久仁子、山口通雅、斎藤能彦

研究要旨

Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α)は低酸素応答で中心的役割を果たす転写因子であるが、間質線維化との関連を証明した報告は少ない。われわれは、HIF-1 α が間質線維化の進展に直接的に関与するか否かを明らかにするために、尿細管上皮細胞特異的にHIF-1 α 遺伝子を欠損させた遺伝子改変マウス(HIF-1 $^{-/-}$ マウス)およびHIF-1 α の分解に重要である von Hippel-Lindau tumor suppressor (VHL) 遺伝子を欠損させた遺伝子改変マウス(VHL $^{-/-}$ マウス)を作製し、各種実験腎炎における腎病変を検討した。さらに、HIF-1 α インヒビター(YC-1)を用いて、腎間質線維化に対する新しい治療法の開発を試みた。本研究から、尿細管上皮細胞におけるHIF-1 α の発現は間質線維化進展に重要な役割を果たすことが示された。また、HIF-1 α の活性抑制は間質線維化の新しい治療法として期待される。

A. 研究目的

間質線維化の進展には、慢性低酸素状態が関与すると考えられている。低酸素応答で中心的役割を果たす Hypoxia-Inducible Factors (HIF) の中で腎臓での発現が確認されているのはHIF-1とHIF-2である。HIFは20% O₂条件でユビキチン・プロテオソームシステムを介して分解される α サブユニットと恒常的に発現している β サブユニットから構成される転写因子であり、その下流には血管形成、嫌気性解糖、細胞増殖やアポトーシスに

関与する多くの遺伝子群が存在する。腎臓では虚血再還流モデルなどの急性低酸素モデルで、HIFが腎保護的に働くことが報告されているが、慢性腎臓病(CKD)の進展に重要である慢性低酸素状態におけるHIFの役割は明らかではない。尿細管上皮細胞では、HIF-1が主たる低酸素応答因子であることが知られている。HIF-1の下流には epithelial-mesenchymal transition (EMT)を促進する遺伝子群が存在することも報告されていることから、HIF-1が間質線維化を誘導する可能性

も考えられる。本研究では、間質線維化の進展における HIF-1 の役割を明らかにするために、尿細管上皮細胞特異的に HIF-1 α 遺伝子を欠損させた遺伝子改変マウス (HIF-1 $^{-/-}$ マウス) および HIF-1 α の分解に重要である von Hippel-Lindau tumor suppressor (VHL) 遺伝子を欠損させた遺伝子改変マウス (VHL $^{-/-}$ マウス) を作製し、各種実験腎炎における腎病変を検討した。

B. 研究方法

1. Cre-loxP システムを用いて、尿細管上皮細胞特異的に HIF-1 α 遺伝子を欠損させたマウス (HIF-1 $^{-/-}$) と VHL 遺伝子を欠損させたマウス (VHL $^{-/-}$) を作製した。これらのマウスに一側尿管結紮 (UUO) モデルおよび 5/6 腎摘モデルを作製し、腎病変を経時的に検討した。

2. HIF-1 $^{-/-}$ マウスとコントロールである HIF-1 $^{+/+}$ マウスから尿細管上皮細胞の初代培養系 (HIF-1 $^{-/-}$ TEC と HIF-1 $^{+/+}$ TEC) を確立した。両細胞を低酸素下 (1%O₂) に培養し、EMT 関連因子の発現を検討した。さらに、細胞運動能を cell scratch assay を用いて検討した。

3. 8 週齢 C57/BL6 マウスに UUO モデルを作製した。一側尿管を結紮した翌日から連日、HIF-1 のインヒビターである YC-1 (30 μ g/g) あるいは vehicle を腹腔内投与し、10 日目に sacrifice し、腎病変を検討した。

C. 結果

1. HIF-1 $^{-/-}$ マウスとコントロールである HIF-1 $^{+/+}$ マウスに UUO モデルを作製した。尿管結紮後 8 日目に sacrifice し、腎病変を比較した。HIF-1 $^{-/-}$ マウスでは、間質線維化面積が有意に減少しており、FSP1 陽性線維芽細胞数も有意に減少していた。

VHL $^{-/-}$ マウスと VHL $^{+/+}$ マウスに 5/6 腎摘を施行して 20 週後に腎病変を比較した。VHL $^{-/-}$ マウスでは VHL $^{+/+}$ マウスと比較して、尿細管間質の FSP1 陽性線維芽細胞数が有意に増加し、I 型コラーゲンの蓄積も高度であった。また、VHL $^{-/-}$ マウスでは有意な尿蛋白の上昇と軽度の腎機能低下が認められた。さらに、高齢 (60 週齢以上) VHL $^{-/-}$ マウスの腎臓では、間質線維化の進展が認められた。

2. HIF-1 $^{+/+}$ TEC を 1%O₂ 下に培養すると、細胞形体が紡錘形に変化し、上皮系細胞マーカーである ZO-1 の発現低下と間葉系細胞マーカーである α SMA と FSP1 の発現上昇が認められた。さらに、細胞運動能に関与する lysyl oxidase の発現亢進も認められ、scratch assay における細胞運動能の亢進も検出された。HIF-1 $^{-/-}$ TEC を用いた場合は、1%O₂ 下で培養しても、上記のような現象は認められなかった。

3. YC-1 の投与により、一側尿管結紮モデルに認められる FSP1 陽性細胞の増加および間質線維化は有意に抑制されていた。

D. 考察

尿細管上皮細胞における HIF-1 α 遺伝子発現を欠損させることで間質線維化の進展が抑制され、VHL 遺伝子を欠損させて HIF-1 α の発現を安定化することで間質線維化が悪化したことから、HIF-1 は間質線維化進展の主誘因となると考えられる。また、培養系の実験から、HIF-1 は epithelial-mesenchymal transition (EMT) を介して線維化の誘導に関与することが示唆される。

E. 結論

尿細管上皮細胞における HIF-1 α の発現は間質線維化進展に重要な役割を果たすことが示された。HIF-1 α の活性抑制は間質線維化の新しい治療法として期待される。

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) Higgins DF, Kimura K, Iwano M (他 10 名) . Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. J Clin Invest. 117(12):3810-3820, 2007

2) Yoshimoto S, Nakatani K, Iwano M

(他 9 名). Elevated levels of fractalkine expression and accumulation of CD16+ monocytes in glomeruli of active lupus nephritis. Am J Kidney Dis. 50(1):47-58, 2007

3) Higgins DF, Kimura K, Iwano M, Haase VH. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. Cell Cycle, in press.

2. 学会発表

1) 木村久仁子、岩野正之、山口通雅、原田幸児、中谷公彦、久保篤史、赤井靖宏、金内雅夫、斎藤能彦
近位尿細管上皮細胞特異的 VHL 欠損マウスを用いた間質線維化の検討
第 50 回日本腎臓学会学術総会
2007 年

2) 岩野正之、山口通雅、木村久仁子、原田幸児、中谷公彦、赤井靖宏、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ポドサイトの epithelial-mesenchymal transition (EMT) の関与について
第 50 回日本腎臓学会学術総会
2007 年

3) 木村久仁子、岩野正之、斎藤能彦
シンポジウム；慢性腎疾患進行の低酸素機序：間質線維化の進展における HIF-1 α の役割
第 37 回日本腎臓学会西部学術大会
2007 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

腎疾患患者における頸動脈壁弾性特性の測定
—「高精度超音波ドプラ法」の有用性—
研究協力者 佐藤博、杉浦章、伊藤貞嘉
(東北大学病院 腎・高血圧・内分泌科)

研究要旨

慢性腎不全は心血管イベントのリスクファクターとして認識されている。本研究では、腎不全時の動脈硬化病変を評価する目的で、新しく開発された高精度超音波ドプラ法を用いて慢性腎不全患者の頸動脈壁弾性特性を計測し、動脈硬化の程度を評価した。その結果、本法によって計測される弾性特性 Er は、腎機能 (eGFR) の低下とともに高値を示し、多変量解析でも唯一 eGFR が Er と有意に相関した。eGFR < 30ml/min 以下の群における原疾患別の検討では、 Er 値は慢性腎炎群に比較して糖尿病性腎症群で有意に高値を示した。本手法を用いることで早期の動脈硬化病変や腎不全特有の石灰化病変を描出することが可能であった。慢性腎不全患者の血管病変の評価に際し、高精度超音波ドプラ法による弾性特性の計測が非常に有用と考えられた。

A. 研究目的

透析患者の多くが心血管イベント (CVD) で死亡することが以前から知られていたが、その前段階である保存期腎不全においても腎機能障害の進行とともに CVD が増加することが明らかとなり、動脈硬化病変管理の重要性が指摘されている。評価法として従来から頸動脈エコーで計測される内中膜複合体厚 (IMT) が有用とされてきたが、壁肥厚のない早期病変や中膜石灰化等が評価できない欠点があった。近年東北大学で開発された高精度超音波ドプラ法 (位相差トラッキングエコー) は、超音波を利用して一心拍

中の血管壁微小領域の厚み変化 (0.2 μ m の精度で検出) と血圧から弾性特性 (Er) を測定し、動脈壁の組織性状 (硬さ・軟らかさ) を非侵襲的かつ定量的に診断するシステムである (Kanai H, et al. *Circulation*, 107: 3018-20, 2003)。これを用いて慢性腎不全患者における頸動脈壁の弾性特性について研究した。

B. 研究方法

2003 年からの 3 年間に当科入院した 70 名 (男 42 名、女 28 名) の腎疾患症例を対象に (平均年齢 58.4 歳、原病は糖尿病 54%、慢性糸球体腎炎

17%、腎硬化症 13%など、末期腎不全患者は除外)、高精度超音波ドプラ計測を行い頸動脈壁の壁弾性特性を計測した。腎機能およびその他の臨床的パラメータとの相関について検討した。

C. 結果

腎機能 (eGFR) の低下とともに弾性特性 E_r が高値を示し ($r=-0.34$, $p=0.0038$)、多変量解析でも唯一 eGFR が E_r と有意に相関することが示された (standard regression coefficient: -0.24 , 95%CI: -0.321 to -0.07 , $p<0.05$)。原疾患別の検討では全体的に糖尿病性腎症の患者の E_r 値が高い傾向にあり、eGFR が比較的保たれている時期でも既に高値を呈している例が散見された。eGFR $< 30\text{ml/min}$ 以下を対象として原疾患毎の E_r 値の比較を行うと、糖尿病性腎症群 66.3 ± 16.5 、慢性腎炎群 52.0 ± 13.9 、腎硬化症群 52.4 ± 15.0 であり慢性腎炎群に比較して糖尿病性腎症群で有意に高値を示した ($p<0.01$)。

D. 考察

本手法を用いることで IMT の肥厚がみられない早期の動脈硬化病変や腎不全特有のメンケベルク型中膜石灰化病変を描出することが可能であった。今回の結果より慢性腎不全患者の血管病変の評価に際して、高精度超音波ドプラ法による弾性特性の計測が非常に有用と考えられた。特に糖尿病性腎症患者での高度の動脈硬化病

変が確認され、早期病変が検出可能である本手法を用いる事で更なる病態解明の可能性が示唆された。

E. 結論

慢性腎不全患者において、高精度超音波ドプラ法を用いた頸動脈壁弾性特性の計測が、腎不全と関連した動脈硬化病変を評価するのに極めて有用と考えられた。

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

- 1) 杉浦章, 佐藤寿伸, 佐藤博, 伊藤貞嘉, 小岩喜郎, 加藤豪, 下川宏明: 慢性腎不全患者における頸動脈壁弾性特性の計測. 第8回みやぎ末梢循環障害フォーラム, 仙台, Sep 27, 2007
- 2) Sugiura A, Sato T, Nakayama K, Sato H, Ito S, Koiwa Y, Kanai H: A novel method for evaluating carotid artery elasticity in patients with chronic kidney disease. 40th annual meeting of American Society of Nephrology, San Francisco, Oct 31 - Nov 5, 2007

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

「免疫抑制治療反応性ネフローゼ症候群（微小変化型および巣状分節性糸球体硬化症）における寛解導入維持」

研究協力者：横山 仁 金沢医科大学腎機能治療学（腎臓内科）教授

共同研究者：藤本圭司，近澤芳寛，中川 卓，山谷秀喜，浅香充宏

金沢医科大学腎機能治療学（腎臓内科）

研究要旨

微小変化型ネフローゼ(MCNS)および巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)に対するメチルプレドニゾロン・パルス療法(MPT)+低用量プレドニゾロン(PSL)・シクロスポリン(CyA)療法の寛解導入，ステロイド減量ならびに寛解維持効果に関して，MCNS14例(14-80歳) およびtip型FSGS(57歳)を対象に検討した． MPT+PSL(20mg/日)+CyA群(2-3mg/kg/日，trough 50-100 ng/ml)7例とMPT+PSL(40mg/日)群8例の2群間で寛解までの日数，PSL総投与量，治療開始から退院までの日数ならびに寛解維持期間を評価した． また，治療開始からの尿蛋白量，血清アルブミン(sAlb)，血清IgE値，尿蛋白選択性(SI)ならびに総コレステロール値の推移についても検討した． 全例が6-33日で完全寛解した． 寛解までの日数とPSL総投与量には2群間で差を認めなかったが，急性腎不全合併と治療開始前のsAlb低値が完全寛解までの期間を延長した． 一方，退院までの日数はCyA群で有意に短縮され，Cox回帰分析でも最も有意因子であった． 再発は，薬剤減量時の4例で10回認められ，CyA群では1例1回のみであり改善傾向を示した．

A. 研究目的

微小変化型ネフローゼ症候群(minimal change nephrotic syndrome, MCNS)は，腎炎所見を伴わない副腎皮質ステロイド感受性ネフローゼ症候群を特徴とする]. 発症年齢はや日本において小学校就学前後(3~7歳)をピークとするが，成人においても各年齢層で発症が見られ特発性ネフロ

ーゼ症候群の約1/3を占め，成人人口20万対年間1人程度の発生と推測されている． 成人MCNSおよびこれと鑑別すべき巣状分節性糸球体硬化症(focal segmental glomerulosclerosis, FSGS)に対する寛解導入ならびに維持療法に関しては未だ一定のプロトコルは確立していない． 今回，メチルプレドニゾロン・パルス療法

(Methylprednisolone pulse therapy, MPT)+低用量プレドニゾロン(prednisolone, PSL)・シクロスポリン(cyclosporine-A, CyA)療法の寛解導入, ステロイド減量ならびに寛解維持効果を検討した。

B. 研究方法

MCNS14例(14-80歳) およびtip型FSGS(57歳)を対象とし, MCNS2例は急性腎不全(ARF)を伴い, うち1例に血液透析を実施した。治療は, MPT(mPSL500mg/日・3日間/クール)+PSL(20mg/日)+CyA群(2-3mg/kg/日, trough 50-100ng/ml)7例とMPT(mPSL500mg/日・3日間)+PSL(40mg/日)群8例の2群間で寛解までの日数, PSL総投与量, 治療開始から退院までの日数ならびに寛解維持期間を評価した。また, 治療開始からの尿蛋白量, 血清アルブミン濃度(sAlb), 血清IgE値, 尿蛋白選択性(SI)ならびに総コレステロール(T-chol)値の推移についても検討した。

全例に治療開始時に治療内容と発表に関するインフォームドコンセントを実施し, 了解を得た。

C. 結果

治療開始時の年齢, T-Chol値, 血清IgE値には両群間で有意差はなかったが, sAlb値はMPT+PSL+CyA群で有意に低値であった(MPT+PSL群: 1.7 ± 0.5 g/dl, MPT+PSL+CsA群: 1.2 ± 0.4 g/dl, $p=0.03$)。一方, SIはMPT+PSL群で低値を示し, 選択性が良好であった($p=0.01$)。全例が6-33日で完全寛解し

た。寛解までの日数とPSL総投与量には, 2群間で差を認めなかったが, ARF合併と治療開始前のsAlb低値が完全寛解までの期間を延長した。一方, 退院までの日数はMPT+PSL+CyA群で有意に短縮され(MPT+PSL群: 68.1 ± 14.5 日, MPT+PSL+CsA群: 35.7 ± 11.0 日, $P=0.003$)。Cox回帰分析でも, 在院日数に対する最も有意因子であった。再発は, 薬剤減量時の4例で10回認められ, CyA群では1例1回のみであり改善傾向を示した。Steroidによる有害事象(DM, 感染症)はMPT+PSL群で多い傾向を認めた。一方, MPT+PSL+CyA群では主にtrough値(C0)を指標にしながらCyA投与量を調節したが, 全例でC0を50~150ng/mlの範囲でコントロールすることができ, 腎機能障害などの重篤なCyAの有害事象は認めなかった。

D. 考察

CyAはCD4陽性Tリンパ球に対する免疫抑制効果ならびに糸球体係蹄壁のサイズバリアの改善効果に加えて, ステロイド受容体の増強や薬剤抵抗性蛋白であるP糖蛋白の抑制によりステロイド感受性も上昇させると考えられる。実際, 小児MCNSの頻回再発型においてステロイドとCyAを併用することでステロイドを減量または中止できることが示されており, 成人領域においてもMPT・CyAの併用療法が早期寛解導入と寛解維持に有効であったとの報告がある。以上を踏まえて成人領域のMCNS・FSGSに対するMPT+PSL+CyA療法はMPT+PSL療法と比較

してより少ないsteroid投与量で同等の寛解導入ならびに寛解導入維持ができると考えられる。今回の検討の結果では、少量ステロイドにCyA併用は少なくとも通常のPSL40mg/日と同等の寛解導入を認めるとともに、入院期間の有意な短縮とsteroidによる有害事象ならびに再発率の減少傾向を認めた。今後、成人領域でも小児と同様に早期社会復帰と長期寛解維持療法として期待できると考えられた。また、薬剤濃度はC0を指標としてCyA投与量を調節したが、CyAの重篤な合併症である腎機能障害は認めておらず、低用量CyA療法の安全性が確認できた。今後、さらに観察期間を延長して再発率を検証するとともにより少ない投与量での有効性についてC2, AUC0-4を用いた確認が必要と考えられる。

E. 結論

成人MCNS/FSGS (tip型)に対するMPT+低用量PSL+CyA療法は、MPT+PSL療法と比較して同等の寛解導入効果と入院日数短縮ならびに再発の減少によるQOLの改善が期待される。

F. 健康危険情報

特記なし。

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)横山 仁, 浅香充宏, 山谷秀喜, 和

田隆志:ネフローゼ症候群治療の進歩-成人領域. 日本腎臓学会誌 49(2): 108-112, 2007.

2)山谷秀喜, 左古ひとみ, 横山 仁:ネフローゼ症候群の食事療法. からだの科学 255: 128-132, 2007.

3)横山 仁, 藤本圭司:「EBM 腎臓病の治療 2008-2009」:微小変化型ネフローゼ症候群のステロイド療法はどのように行なうのでしょうか? 中外医学社. (印刷中)

2. 学会発表

1) Hitoshi Yokoyama, Takashi Wada: Application of lymphocytapheresis for nephrotic syndrome. Workshop 5: Clinical effects of apheresis in renal diseases, ISFA/WAA, Yokohama, 2007年.

2) 藤本圭司:当院における微小変化型ネフローゼ症候群に対するMPT+low dose PSL+low dose CsA療法とMPT+PSL療法の比較検討, 第50回日本腎臓学会総会, 浜松, 2007年.

3) 横山仁:難治性ネフローゼ症候群の治療の進歩-新しい治療の展望. 第37回日本腎臓学会西部学術大会教育講演, 福井, 2007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

「タンパク尿自然発症 BUF/Mna ラットの Impg1 遺伝子変異」

昭和大学藤が丘病院内科腎臓 吉村 吾志夫

研究協力者 （昭和大学藤が丘病院内科腎臓）森田博之、渡辺励、井上嘉彦、田山宏典、乾 聖子、小向大輔、廣瀬 眞、山本弓月、永山嘉恭、河嶋英里、和田幸寛、森永 潤、正路久美、真田大介、西脇宏樹、小岩文彦

研究要旨

疾患自然発症モデル”BUF/Mna ラット”のタンパク尿発症感受性遺伝子Pur1のmodifier gene同定を本研究の目的とした。[(BUF/Mna x WKY/NCrj)F1 x BUF/Mna] 退交配F2コホートをを用いてphenotype（尿タンパク）とDNA marker genotype間の相関関係を見た後に、modifier geneが存在する候補領域を選び出す目的で、QTL解析を行った。Ensembl data baseにて候補領域にある遺伝子をretrieveしBUF/Mna、WKY/NCrj、BN間で多型がある遺伝子の同定をめざしてcDNAを鋳型としたPCR direct sequencingで塩基配列を調べた。その結果、第8番染色体上のD8Mit5、及び、Acph間を候補領域（81.6-86.6 Mb）とした。候補領域に30個の遺伝子が存在した。全長cDNA塩基配列解析でInterphotoreceptor matrix proteoglycan 1 (Impg1)のみBUF/Mnaにてロイシン・プロリン置換を伴う点変異が判明した。結論として、Impg1遺伝子の変異がPur1遺伝子のmodifier geneである可能性が示唆された。

A. 研究目的

種々の疾患時にみられるタンパク尿発症・進展に遺伝的背景（ie 複数個の感受性遺伝子の組み合わせ）が関与するが、ヒトの common diseaseでは未だタンパク尿発症・進展感受性遺伝子は同定されていない。感受性遺伝子同定はタンパク尿を減少・制御させる本質的治療法に繋がるポテンシ

ヤルを持つ。我々は疾患自然発症モデル”BUF/Mna ラット”のタンパク尿発症感受性遺伝子について報告してきた。第13番染色体上のPur1は同定に成功した疾患感受性遺伝子である（Mamm Genome 2008, 19:41-50）。本モデルでは gene-gene interaction によって massive proteinuria が発症する。Pur1の modifier gene 同定を本研究の目的

とした。

B. 研究方法

タンパク尿自然発症ラット BUF/Mna 系と非発症の WKY/NCrj 系を用いて、[(BUF/Mna x WKY/NCrj)F1 x BUF/Mna] 退交配 F2 コホートを作成した。コホート内で phenotype (尿タンパク) と genotype (DNA マーカーの多型) 間の相関関係を t 検定にて見た後に、modifier gene が存在する染色体上における候補領域を選び出す目的で、QTL 解析を行った。候補領域に存在し、Ensembl data base に登録されている遺伝子をすべて retrieve した。それら総てについて BUF/Mna、WKY/NCrj、BN 間で多型がある遺伝子の同定をめざして c DNA を鋳型とした PCR direct sequencing で coding sequence の塩基配列を調べた。

(研究の倫理面への配慮)

実験動物に不必要な苦痛を与えないよう、倫理的配慮がなされた。

C. 結果

QTL 解析を行った結果、ラット第 8 番染色体上の microsatellite marker である D8Mit5、及び、AcpH 間を候補領域 (81.6-86.6 Mb) とみなすことが出来た。Ensembl data base によれば、本候補領域には 30 個の遺伝子が存在した。Genomic DNA を template とする PCR direct sequencing 法による全長 coding sequence 塩基配列解析で Interphotoreceptor matrix proteoglycan 1 (Impg1) のみ BUF/Mna にてロイシ

ン・プロリン置換を伴う点変異が存在することが判明した。

D. 考察

今回の解析では coding sequence に着目し、アミノ酸配列の変化を伴う塩基配列変異を見つけ出そうという研究戦略をとった。遺伝子発現の違いという観点から候補領域に存在した 30 個の遺伝子を screening しなかった。(遺伝子のプロモーター領域の塩基配列解析もしていない。) そのため、another candidate を見落とした可能性は完全には否定できない。しかしながらより重要な点は、ひとたび候補遺伝子を捕まえたら変異が機能異常を伴うか否か実験的に検討することにあると考える。今後は機能解析実験を進めていきたい。

尚、本研究は日本たばこ産業株式会社医薬探索研究所との共同研究である。

E. 結論

Impg1 遺伝子の変異が Pur1 遺伝子のタンパク尿惹起能力を modify する可能性が示唆された。変異分子の機能解析実験が望まれる。

F. 健康危険情報

本研究は動物レベルでの研究である。ヒトの健康に影響を与えない。

G. 知的所有権の出現登録状況

知的所有権は今のところ出現していない。

H. 研究発表

1. 論文発表

Akiyama K, Morita H, Suetsugu S, Kuraba S, Numata Y, Yamamoto Y, Inui K, Ideura T, Wakisaka N, Nakano K, Oniki H, Takenawa T, Matsuyama M, Yoshimura A: Actin-related protein 3 (Arp3) is mutated in proteinuric BUF/Mna rats. *Mamm Genome* 19:41-50, 2008

Nagayama Y, Morita H, Komukai D, Watanabe S, Yoshimura A: Type B insulin resistance syndrome induced by increased activity of systemic lupus erythematosus in a hemodialysis patient. *Clin Nephrol* 69:130-134, 2008

Morita H, Yoshimura A, Kimata K: The role of heparin sulfate in the glomerular basement membrane. *Kidney Int* 73:247-248, 2008

Kyoko Hara, Nakayama T, Yamamoto Y, Komukai D, Inoue Y, Watanabe S, Inui K, Morita H, Yoshimura A: Infiltration of activated macrophages and their disappearance are involved in the effect of tonsillectomy combined with steroid pulse therapy for patients with IgA nephropathy. *Contrib Nephrol* 157: 199-200, 2007

2. 学会発表

Inui K, Chen H, Nakayama T, Hara K, Yamamoto Y, Morita H, Yoshimura A: Regulation of active inflammation in early phase of unilateral ureteral obstruction by eplerenone, novel selective aldosterone blocker, is critical for suppression of subsequent development of fibrosis. 2007 Annual Meeting of the American Society of Nephrology (San Francisco, 2007)

Hiroyuki Morita, Yasuharu Numata, Kiyotaka Akiyama, Seiko Kuraba, Yoshihisa Yamamoto, Kiyoko Inui, Mutushi Matsuyama, Ashio Yoshimura. Mutation of interphotoreceptor matrix proteoglycan (*Impg1*) in a rat model of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). 2007 Annual Meeting of the American Society of Nephrology (San Francisco, 2007)

森田博之、乾聖子、相沢 純子、原恭子、中山隆弘、小向大輔、井上嘉彦、渡辺励、松山睦司、吉村吾志夫。タンパク尿自然発症 BUF/Mna ラットの *Impg1* 遺伝子変異。第 50 回日本腎臓学会学術総会。平成 19 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

「原発性膜性腎症における免疫抑制薬ミゾリビンの尿蛋白排泄量への影響」

研究協力者 松本紘一

日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野教授

共同研究者 藤田宜是、福家吉伸、中根千枝

日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野

研究要旨 難治性ネフローゼ症候群を呈する膜性腎症の治療は副腎皮質ステロイドホルモン（ス薬）の効果が不十分で、しばしば免疫抑制薬が併用投与される。種々の理由でス薬投与が困難な症例に免疫抑制薬ミゾリビンを単独投与する機会を得たので、その経過について検討を行った。膜性腎症患者4例を対象に、ス薬治療が困難なためミゾリビンを単独投与した。尿蛋白量等を投与前と投与後1ヶ月毎に5ヵ月目まで検討した。尿蛋白量は投与直後より有意に減少し3ヶ月目で投与前の $55 \pm 21\%$ となったが、その後増加し5ヶ月目には投与前との有意差が消失した。

A. 研究目的

膜性腎症は糸球体基底膜に免疫複合体が沈着することで蛋白尿をきたし、しばしば難治性ネフローゼ症候群をきたす。治療は副腎皮質ステロイドホルモン（ス薬）投与が無効なことが多く、免疫抑制薬が併用される。しかし現在使用されている免疫抑制薬は作用機序が単一でなく、尿蛋白改善効果についての評価は確立してはいない。使用方法については免疫抑制薬はス薬と併用することが基本となっているが、ス薬との相互作用について十分な解明がされていない。

我々は蛋白尿を認める原発性膜性腎症患者で合併症による不利益など

種々の理由でス薬投与が困難であった症例に免疫抑制薬ミゾリビンを単独投与する機会を得たので、その経過について検討を行った。

B. 研究方法

対象は原発性ネフローゼ症候群の診断で日本大学医学部附属板橋病院に入院し、経皮的腎生検にて組織学的に膜性腎症と診断された4例（女性4名；平均年齢60.3歳）である。この4症例は精神疾患や糖尿病、肝炎の既往などでス薬の治療が不可能であった。インフォームドコンセントの結果ス薬以外の治療を希望したが、姑息的治療では有意な効果を認めなか

った。

浮腫の長期化に伴う全身状態の悪化が危惧されたため、この4症例にミゾリビン 150 mg/day を朝1回連日経口投与した。経過観察には投与前と投与1ヶ月後から5ヶ月後まで血圧測定、血液・尿検査（尿蛋白・尿潜血・血清総蛋白・クレアチニン・コレステロール・血算・抗核抗体・シスタチンC・C3・IgGなど）を施行した。浮腫の消失後は外来にて継続測定を行った。

（研究の倫理面への配慮）

対象とした症例は多量の蛋白尿により浮腫をきたし日常生活が困難であったが、ス薬治療が困難なため利尿薬のみの治療を余儀なくされていた。免疫抑制薬はス薬に併用するのが基本となっているが、ス薬との相互作用についても十分な説明がされていない。また、単独投与の有効性は糖尿病性腎症では実験動物や臨床症例でも報告されている。浮腫の長期化に伴う全身状態の悪化が危惧されたため、十分なリスク説明のうえに希望者のみに投与を行った。

C. 結果

ミゾリビン投与前の4症例の臨床背景の平均では、血圧 119/71 mmHg、尿蛋白は 188 ± 57 mg/dl、尿潜血は4名とも陰性、血清総蛋白は 5.9 ± 0.2 g/dl、血清クレアチニンは 0.72 ± 0.07 mg/dl、総コレステロールは 309 ± 65 mg/dl、シスタチンCは 0.83 ± 0.06 mg/ml であった。

投与後の変動をみると、尿蛋白は1ヶ月後が投与前の $72 \pm 24\%$ 、3ヶ月後が $55 \pm 21\%$ と1ヶ月後より3ヶ月目までは著明な改善傾向を認め、その後は逆に悪化し5ヶ月目では投与前と有意差を認めなかった。腎機能など、その他の検査結果は観察期間中有意な変動を認めなかった。

D. 考察

膜性腎症では糸球体基底膜に免疫複合体が沈着して蛋白尿を来すことから免疫抑制薬の効果が期待されている。ミゾリビンは他の免疫抑制薬と異なり骨髄抑制が少なく、ス薬との併用によりス薬の効果を増強するとされてきた。最近ではミコフェノール酸モフェチル(MMF)との類似性から抗炎症作用も注目されている。さらに動物モデルでは単独使用でマクロファージ抑制作用から糸球体硬化阻止や間質線維化阻止が報告されている。またヒトでも糖尿病性腎症において腎障害の進行阻止効果が報告されている。しかしながら今回の検討ではミゾリビン投与による蛋白減少効果は一過性で既存の免疫抑制作用機序では説明が困難で、臨床経過を反映する接着分子やケモカインの変化を観察する必要があると考えられた。

ス薬にミゾリビンを併用するとス薬感受性が上昇し少ないス薬投与量でも十分な効果が期待できるという報告があり、ミゾリビンのス薬受容体への何らかの作用が示唆されている。原発性膜性腎症によるネフローゼ症

候群ではス薬の単独投与では近接効果は期待できず、遠隔成績の改善には少量のス薬が使用されることが多いため初期からミゾリビンと少量のス薬を用いる選択肢も考慮に値すると考える。

E. 結論

ミゾリビンは単独投与により、短期間に有意な尿蛋白の改善をみるが、その後は再度悪化し、その効果は3ヶ月程度に限られた。

F. 健康危険情報

ミゾリビンは副作用として白血球減少、血小板減少、赤血球減少、食欲不振、悪心・嘔吐、肝障害、発熱、脱毛、感染症、口内炎、尿酸値上昇、 γ グロブリン低下などが知られている。今回の4症例では経過中これらの諸症状は出現しなかった。

G. 知的所有権の出現登録状況

なし

H. 研究発表

1. 学会発表

藤田宜是、中根千枝、福家吉伸、里村厚司、松本紘一：原発性膜性腎症における免疫抑制薬・ミゾリビンの尿蛋白排泄量への影響. 第52回日本リウマチ学会総会、2008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

「膜性腎症に対する H. Pylori 菌感染の影響」

研究協力者 西 慎一¹⁾
今井直史²⁾、井口清太郎²⁾ 下条文武²⁾

新潟大学医歯学総合病院 血液浄化療法部 准教授¹⁾
新潟大学大学院医歯学総合研究科腎膠原病内科学²⁾

研究要旨

膜性腎症の上皮細胞下腔沈着物形成に関する H. Pylori 菌感染の関与を調査した。血中抗 H. Pylori 抗体レベルより、Pylori 菌感染陽性である原発性膜性腎症、V 型 SLE 腎症、IgA 腎症、腎移植ドナーを対象とし、抗 H. Pylori 抗体による免疫組織化学法にて H. Pylori 菌抗原の糸球体内沈着を検討した。原発性膜性腎症では糸球体径疇上皮細胞下腔沈着物に diffuse global に、V 型 SLE 腎症では focal segmental に陽性所見が見られた。IgA 腎症、腎移植ドナーは、陽性反応を示さなかった。血中抗 H. Pylori 抗体レベルと尿蛋白量、腎機能との間に相関はなかった。レクチン経路活性例は、H. Pylori 陽性膜性腎症例の一部に認められた。H. Pylori 菌抗原は必ずしも全ての膜性腎症の発症原因抗原ではなく、原発性、二次性を問わず膜性腎症の上皮細胞下腔沈着物の形成促進因子として関与している可能性があると考えられた。

A. 研究目的

膜性腎症は、ネフローゼ症候群を呈する糸球体腎炎の代表であるが、好発年齢が 40 歳～70 歳程度の中高齢である。膜性腎症の原因抗原候補として、既に報告があるのは、B 型肝炎抗原、腫瘍抗原、薬剤などである。しかし、未だに多くの膜性腎症の原因抗原は同定されていない。1997 年に注目すべき論文が膜性腎症原因抗原に関して

報告された。ヘリコバクター・ピロリ菌の菌体抗原に対する抗体に、膜性腎症の上皮細胞下腔沈着物が反応する事実である。ヘリコバクター・ピロリ菌の菌体抗原が膜性腎症の原因抗原であるのか。膠原病続発性の二次性膜性腎症においても同様な事実が当てはまるのか。菌体表面に豊富な糖鎖抗原が原因である可能性もあり、補体活性経路の一つであるレクチン経路が

活性化されている可能性はあるのか。以上の疑問点を解決するために、以下の臨床研究を実施した。

B. 研究方法

悪性腫瘍、ウイルス感染症、膠原病などの合併が否定され、原発性膜性腎症と判定された 10 例と、全身性エリテマトーデスに合併したループス腎炎で V 型(膜性腎症型)と診断された 5 例を対象とし、症例の光顕組織標本を抗 H. Pylori 抗体で免疫染色を行なった。対照例として、IgA 腎症 10 例と腎移植ドナー 5 例を用いた。

レクチン経路の活性化の証明としては、上皮細胞下腔沈着物におけるマンノース結合レクチン(MBL)、フィコリンの局在を、抗 MBL 抗体、抗フィコリン抗体を用い蛍光抗体法で確認した。

更に、上記の原発性膜性腎症 10 例、ループス腎炎 5 例と原発性 IgA 腎症と診断された 10 例の血中抗 H. Pylori 抗体価を測定し、臨床データとの関連を調査した。

(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、腎生検の必要性和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紙面で得た後に施行した。患者個人が特定できないように配慮しデータ作成は行なった。

C. 結果

膜性腎症 10 例のうち 7 例は、抗 H. Pylori 抗体に反応して、上皮下腔沈着物が diffuse global に陽性所見を示

した(図 1)。V 型ループス腎炎 5 例は、抗 H. Pylori 抗体に反応して、上皮下腔沈着物が diffuse segmental に陽性所見を示した(図 2)。IgA 腎症 10 例、移植ドナー 5 例の糸球体は、抗 H. Pylori 抗体に対して陽性所見は示さなかった(図 3)。

陽性所見を示した膜性腎症 7 例と、V 型ループス腎炎 5 例の血中抗 H. Pylori 抗体価は、陽性基準の 10 IU/ml を超えていた。一方、抗 H. Pylori 抗体に反応しない膜性腎症 3 例は、血中抗 H. Pylori 抗体価が陽性基準の 10 IU/ml 未満であった。

抗 H. Pylori 抗体に反応する膜性腎症 7 例のうち、3 例が MBL 陽性、2 例がフィコリン陽性と判断され(図 4)、レクチン経路が活性化している症例はのべ 4 例であった。

血中抗 H. Pylori 抗体価は、IgA 腎症例では、6 例が陽性、4 例が陰性と判断された。抗体価の平均値には両群で有意差は認められなかった。また、膜性腎症 10 例の抗体価と、尿蛋白量、免疫グロブリン IgG、腎機能(Ccr)との相関を調べたが、有意な関連は認められなかった。

D. 考察

膜性腎症は、若年者に少なく、中高年齢に好発することは古くから知られていた。その理由を明確に説明する仮説はなかった。Nagashima らが¹⁾、H. Pylori 菌の菌体抗原に対する抗体に、膜性腎症の上皮細胞下腔沈着物が反応する事実を 1997 年報告したが、H. Pylori 菌感染率は、年齢とともに

増加することが知られており、興味深い事実である。

また、H. Pyroli 菌感は、単に、胃粘膜で増殖し胃潰瘍の原因となる、または胃癌発生率を増加させる一因となる以外に、消化器系疾患以外との関連が示唆されている。特発性血小板減少性紫斑病²⁾、慢性蕁麻疹³⁾などがそれであり、薬物による除菌がこれらの疾患の病状改善につながることを報告されている。Sugimoto らは⁴⁾、H. Pyroli 菌感染が陽性であるネフローゼ症候群を呈する膜性腎症例の治療過程で、除菌治療を行なったところ、尿蛋白量の減少が認められ、除菌治療が膜性腎症の治療に有効である可能性を報告している。

今回の我々の検討では、全ての特発性膜性腎症例が、抗 H. Pyroli 抗体に陽性反応を示さなかった事実より、H. Pyroli 菌体抗原が特発性膜性腎症の普遍的原因抗原ではないと考えられる。また、V型ループス腎炎では、上皮腔沈着物の一部が陽性に反応するのみであったことも、二次性膜性腎症においても普遍的原因抗原ないことを示唆していると考えられる。

H. Pylori 菌は、菌体表面にリポポリサッカライド、糖脂質など、糖鎖抗原を有している。これらの菌体成分が抗原である場合、膜性腎症において、レクチン経過が活性化される可能性が高い。しかし、抗 H. Pyroli 抗体に反応した症例の一部にしか、活性化が確認されなかった。この事実より、糖鎖抗原成分が主たる抗原とは考えら

れなかった。

今回の検討からは、H. Pyroli 菌体抗原が膜性腎症の上皮細胞下腔沈着物の形成に関与していることは確認された。恐らく、上皮細胞下腔沈着物の形成あるいは成長を促進しているものと推測される。よって、上皮細胞沈着物の形成抑制として、H. Pyroli 菌感染を有する膜性腎症例において、除菌による血中 H. Pyroli 抗原の低下、あるいは血中抗 H. Pyroli 抗体の低下が、膜性腎症の蛋白尿改善に結びつく期待が持てるのではないかと考えられる。今後、臨床的に除菌の有効性を確認する必要があると考えられる。

E. 結論

H. Pylori 菌抗原は必ずしも全ての膜性腎症の発症原因抗原ではなく、原発性、二次性を問わず膜性腎症の上皮細胞下腔沈着物の形成促進因子として関与している可能性があると考えられた。

参考文献

1. Nagashima R, Maeda K, Yuda F, Kudo K, Saitoh M, Takahashi T : Helicobacter pylori antigen in the glomeruli of patients with membranous nephropathy. Virchows Arch :431:235-239, 1997
2. Gasbarrini A, Franceschi F : Autoimmune diseases and Helicobacter pylori infection. Biomed Pharmacother :53:223-226, 1999