

奨励金No.1456

腎臓病の個別化医療実現に向けた尿中落下細胞を用いた非侵襲的検査法の確立

鈴木 教郎

東北大学 大学院医学系研究科 教授

Establishment of a non-invasive diagnosis strategy for personalized precision medicine against kidney disease by using urine exfoliated cells

Norio Suzuki,

Tohoku University, Professor



慢性腎臓病（CKD）患者の尿中に含まれる腎細胞（尿中落下細胞）の病態理解における有用性を検証した。まず、尿中落下細胞は3～5世代の継代および凍結融解が可能であることを確認した。次に、フローサイトメトリー解析から、尿中落下細胞には線維芽細胞や尿細管上皮細胞などが様々な割合で含まれることを示した。さらに、腎性貧血治療薬であるHIF-PH阻害薬が培養尿中落下細胞のEPO遺伝子発現を誘導することを見出した。尿中落下細胞はCKD患者の薬剤応答性の個別予測やバイオマーカー探索として有用である。

Urinary exfoliated cells (UECs) are living kidney cells non-invasively isolated from the urine of chronic kidney disease (CKD) patients. This study aimed to determine whether UECs would help in precise and personalized medicine for CKD. We discovered that in-vitro cultured UECs, even after freezing-thawing, contained various types of kidney cells, including fibroblasts and tubular epithelial cells. Additionally, hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitors stimulated erythropoietin production in cultured UECs. These findings suggest that UECs, which can be non-invasively isolated from the urine of CKD patients, have the potential to predict drug responsiveness and screen for CKD biomarkers.

1. 研究内容

1.1 目的

CKD患者数は世界的に増加の一途を辿っているが、治療法が確立されておらず、血液透析や腎移植などの高額な対症療法に頼らざるを得ない。そのため、CKDは世界各国で医療費高騰の主因となっており、CKDの病態理解を進め、効果的治療法を確立することは喫緊の課題である。一方、CKDの成因は遺伝背景から生活習慣など多様であり、病状や予後も様々であることから、患者個別の精密な医療が求められている。実際に、尿や血液を対象としたバイオマーカー探索が行われてき

たが、CKDの病状や予後と関連する適切なマーカー分子は同定されていない。また、病態把握のために侵襲的な腎生検採取が行われているが、穿刺による腎組織の傷害は病態をさらに増悪させることが懸念されている。

CKDは多様な病態を示すが、共通して腎間質に筋線維芽細胞が出現し、腎臓が線維化する。研究代表者は遺伝子改変マウスを駆使した腎臓病の分子病態解明に取り組んでおり、線維化腎の筋線維芽細胞は、腎間質線維芽細胞の形質転換により出現することを明らかにした。また、腎間質線維芽細胞は赤血球造血因子エリスロポエチン（EPO）

を産生する役割を担うが、形質転換によってEPO産生能を喪失することが、CKDで頻発する貧血の原因となることを見出した。さらに、CKD患者の腎EPO産生を誘導する薬剤（hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitor：HIF-PH阻害薬）が貧血治療に使われているが、その効果は病状に大きく依存することから、薬剤の使用に際して患者個別の効果予測が必要であることを提唱した。

ヒト尿中には腎臓由来の生細胞「尿中落下細胞」が含まれており、培養可能であることが知られている。尿中落下細胞は患者を傷つけることなく容易に採取できる生細胞であり、高い増殖能を保持している。また、基礎的な細胞培養技術があれば、あらゆる施設で簡便に培養し、増殖させることができるため、検査・診断に用いる生細胞検体のソースとして適している。そこで本研究では、CKD患者の尿中落下細胞の分子特性を解析し、病状や予後と相関する因子（バイオマーカー）の同定および患者個別の薬剤応答性診断の検査系開発における有効性について検証を試みた。

1.2 方法

尿中落下細胞は、提供者の同意を得たうえで、東北大学病院において、東北大学の承認のもと収集した。尿中落下細胞は尿中濃度が非常に薄いため、遠心によって尿から採取した直後であっても、顕微鏡下で検出することは難しいが、高い増殖能を有しているため、1週間ほどの培養によって細胞コロニーを形成することが知られている。本研究期間では、9名のCKD患者の尿中落下細胞の培養に成功した。

培養ディッシュの底面に接着している尿中落下細胞を回収し、継代を繰り返すことにより、尿中落下細胞の増殖能と培養可能期間を調べた。また、継代後に凍結および融解し、再培養を行うことにより、尿中落下細胞の凍結保存の可否についても検討した。

培養した尿中落下細胞を蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメトリーを行うことにより、培養尿中落下細胞に含まれる細胞の種類を解析した。とくに、尿細管上皮細胞、間質線維芽細胞、血管内皮細胞に特異的な細胞表面分子の（それぞれEpCAM、CD73、KDR）発現に着目して解析を進めた。また、障害を受けた尿細管上皮細胞で発現することが知られているCD44についても解析した。

遺伝子発現についても、尿中落下細胞からRNAを採取し、定量的reverse-transcription polymerase chain reaction（RT-PCR法）によって解析した。得られたデータとフローサイトメトリーの結果を照合するとともに、患者の病態情報との関連を調べた。

1.3 成果および考察

小児CKD患者9名（IgA腎症2名、アルポート症候群5名、紫斑病性腎炎2名）の尿中から遠心によって細胞を採取し、培養したところ、1週間以内に目視可能な細胞コロニーが多数形成された。これらの細胞は、3～5世代の継代が可能であり、凍結融解を経ても培養可能であった。

次に、培養尿中落下細胞のフローサイトメトリー解析を行い、CD73（線維芽細胞）とEpCAM（CD326、上皮細胞）の発現を解析した。その結果、尿中落下細胞の各サンプルには、様々な割合で線維芽細胞と尿細管上皮細胞が含まれることが確認された。また、一部の検体において、損傷した尿細管上皮細胞で高発現するCD44の強陽性分画が含まれることを確認した。一方、血管内皮（KDR）と血球系（CD45）のマーカーは検出されなかった。

培養尿中落下細胞の遺伝子発現をRT-PCR法によって解析したところ、線維芽細胞と尿細管上皮細胞の遺伝子発現は検出されたが、血管内皮と血球系の遺伝子の発現は検出されなかった。これらの結果は、前述のフローサイトメトリー解析の結

果と一致する。また、一部の検体は筋線維芽細胞で発現する遺伝子群を高発現していたことから、尿中落下細胞の遺伝子発現が腎線維化の指標となることが考えられた。

さらに、尿中落下細胞が生細胞であることを利用し、HIF-PH 阻害薬に対する応答性を検討した。その結果、すべてのサンプルにおいて、HIF-PH 阻害薬添加から24時間後に、低酸素誘導性転写因子 HIF1 α の蓄積と HIF1 α 標的遺伝子群の発現誘導が検出された。また、その誘導性はサンプル間で大きく異なっていた。HIF1 α タンパク質は HIF-PH 阻害薬によって安定化し、活性化することが知られていることから、尿中落下細胞は HIF-PH 阻害薬応答性を備えており、患者個別の HIF-PH 阻害薬応答性を調べるために尿中落下細胞が有効であることが示唆された。一方、一部のサンプルでは *EPO* 遺伝子の発現誘導も検出された。*EPO* 遺伝子発現は HIF2 α によって誘導されることが知られているため、HIF-PH 阻害薬は尿中落下細胞の HIF2 α も安定化・活性化することが示された。また、尿中落下細胞には *EPO* 産生能を有する線維芽細胞もしくは筋線維芽細胞が含まれていることが明らかとなった。

以上の結果から、尿中落下細胞は CKD 患者から完全非侵襲的に採取できる生細胞リソースであり、患者個別のバイオマーカー探索および薬剤応答性診断の解析対象としてとして有用であることがわかった。尿中落下細胞は体内からのメッセージを届ける貴重な生細胞であり、尿中落下細胞の解析系を発展させることにより、患者数の多い CKD に対する精密な個別化医療を非侵襲的検査法により実現することにつながると期待される。

2. 発表（研究成果の発表）

- [1] Nakai T, Iwamura Y, Kato K, Hirano I, Matsumoto Y, Tomioka Y, Yamamoto M, Suzuki N. Drugs activating hypoxia-inducible factors correct erythropoiesis and hepcidin levels via renal EPO induction in mice. *Blood Adv* 7: 3793-3805 (2023)
- [2] Nakai T, Saigusa D, Iwamura Y, Matsumoto Y, Umeda K, Kato K, Yamaki H, Tomioka Y, Hirano I, Koshiha S, Yamamoto M, Suzuki N. Esterification promotes the intracellular accumulation of roxadustat, an activator of hypoxia-inducible factors, to extend its effective duration. *Biochem Pharmacol* 197: 114939 (2022)
- [3] 宮内健一郎、山本多恵、鈴木教郎. 腎性貧血の発症機序と診断. *臨床透析* 38: 111-118 (2022)
- [4] Miyauchi K, Nakai T, Saito S, Yamamoto T, Sato K, Kato K, Nezu M, Miyazaki M, Ito S, Yamamoto M, Suzuki N. Renal interstitial fibroblasts coproduce erythropoietin and renin under anaemic conditions. *EBioMedicine* 64: 103209 (2021)
- [5] Nakai T, Iwamura Y, Suzuki N. Efficient isolation of interstitial fibroblasts directly from mouse kidneys or indirectly after ex vivo expansion. *STAR Protoc* 2: 100826 (2021)
- [6] 岩村悠真、内田奈生、熊谷直憲、鈴木教郎. 慢性腎臓病患者の尿中落下細胞を用いた低酸素誘導性因子プロリン水酸化酵素の阻害剤に対する応答性評価. *日本生化学会東北支部例会*. (口頭発表、Web 開催、2021年5月29日)