

主論文

Urine Trefoil Factors as Prognostic Biomarkers in Chronic Kidney Disease (慢性腎臓病の予後予測バイオマーカーとしての尿中 Trefoil Factor)

【緒言】

慢性腎臓病 (CKD) は多数の疾患を病因にもち、末期腎不全 (ESRD) への進行のみならず、心血管疾患や死亡率にも関連している。世界的に ESRD 患者数が増加しており、社会的、医療経済的な懸念が提唱されている。以前より、推算糸球体濾過量 (eGFR) 低値 や多量のアルブミン尿が、CKD 患者の ESRD への進行や死亡の独立した予測因子になることが知られている。さらに、より正確に腎障害のリスクを予測できる可能性のあるバイオマーカーの研究が複数報告されている。

Trefoil factor family (TFF) は、3つのループ構造を有する trefoil domain から成る、分子量約 7 kDa のペプチドである。消化管での発現部位やペプチド構造などにより TFF1, TFF2, TFF3 に分類され、いずれも粘膜維持や修復に関与している。

また、ヒトの尿細管や集合管に TFF3 が豊富に発現していることが知られているが、尿中 TFF3 (uTFF3) と CKD 発症との関連については、未だ一定の見解が得られていない。このような背景から、我々は uTFF と CKD 進行との関連性を解析することで、uTFF の CKD の予後予測マーカーとしての有用性を検討することにした。

【材料 (対象) 方法】

対象患者

2009年2月から2011年1月にかけて岡山大学病院腎臓内科を受診し、CKDと診断された外来患者を対象とした。動脈硬化性疾患、ネフローゼ症候群、急性腎障害、急性感染症、悪性腫瘍、および胃腸疾患の合併例は除外し、対象患者は216名(平均年齢53.7歳、慢性糸球体腎炎56.9%)となった。

研究検体

尿検体は早朝随時尿であり、採取後に2,000g、5分間で4℃の冷却遠心を行い、上清をチューブに分注した後、-80℃で凍結した。検体は凍結・融解を繰り返さずに使用した。

尿中バイオマーカーの測定

検体採取から測定までの期間の中央値は29ヶ月で、TFFはELISA法で測定した。臨床パラメーターは通常の検査方法で測定した。

評価項目と追跡期間・方法

主要評価項目はCKDの進行とし、ESRDの発症(腎代替療法、すなわち透析療法または腎移植の導入)、あるいは血清クレアチニン濃度の二倍化をエンドポイントに設定した。尿検体採取日を起点に患者は前向きに追跡し(追跡期間中央値1097日)、患者死亡、追跡不能あるいは研究完了の時点で打ち切りとした。

統計解析

統計ソフトはJMP ver.11を使用した。線形回帰分析は最小二乗法で行い、グループ間の差はStudent's *t*-test, Mann-Whitney U-testを使用した。Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線から、曲線下面積 (AUC) を算出し、uTFF, 尿中アルブミン, α 1-MG (α 1-microglobulin), β 2-MG (β 2-microglobulin), NAG (N-acetyl- β -D-glucosaminidase)の感度・特異度を検討した。また、予後予測因子を検討するため、多変量ロジスティック回帰分析を施行した。Kaplan-Meier 分析, ログランク検定は、尿中バイオマーカーの腎生存に対する関連を解析するために行った。

いずれの解析も、 p 値 < 0.05 を統計学的に有意とした。

[結果]

CKD stage 間の uTFF レベル

uTFF1, uTFF3 濃度は stage の進行とともに有意な上昇を認めたが、uTFF2 では認められなかった。その他の尿細管障害マーカーも CKD 進行により上昇した。

また uTFF3 は、尿細管障害マーカーである $\alpha 1$ -MG, $\beta 2$ -MG, NAG との相関が強く、uTFF1 も $\alpha 1$ -MG, $\beta 2$ -MG と相関性を有していた。uTFF 間では、uTFF2 と uTFF3 以外で有意な相関関係がみられた。

CKD stage 3b 以上の進行を予測するバイオマーカー

ROC 解析の結果、尿中バイオマーカーでは uTFF3 の AUC が 0.879 と最も大きく、 $\alpha 1$ -MG がそれに続いた。血清マーカーでは、既報のようにヘモグロビン値や尿酸値が CKD 進行を予測する有意な因子となった。多変量ロジスティック回帰分析では、uTFF3, $\alpha 1$ -MG 高値群で、CKD 進行と有意な関連性があった。

uTFF による腎生存予測

Kaplan- Meier 分析では、uTFF1, uTFF3 高値群で 3 年後の腎生存率が有意に低かった。uTFF2 では相違はみられなかった。また、尿中アルブミンと併用して同様の解析を行うと、uTFF1, uTFF3 高値群かつ顕性アルブミン尿群で腎生存率が有意に低値となった。

36 ヶ月の追跡で、22 名がエンドポイントに到達した。この到達群は、未到達群よりも uTFF1, uTFF3 レベルが有意に高値となっており、uTFF2 レベルは有意に低値となった。

[考察]

この研究では以下の点が明らかとなった。1) CKD 進行に伴い uTFF1, uTFF3 レベルが有意に上昇した。2) uTFF3 が、uTFF1 よりも eGFR 低下やその他の尿細管障害マーカーと強い相関関係があった。3) ROC 解析にて、uTFF1, uTFF3 は CKD 3b 以上の進行を予測できるマーカーであり、多変量ロジスティック回帰分析では、uTFF3 のみが有意な腎予後予測因子となった。4) 生存分析において、uTFF1, uTFF3 は単独で、あるいは尿中アルブミンとの併用で、CKD 患者の腎予後を予測する有意な因子となった。

1) で述べた uTFF3 の結果に関しては、Du らが報告した結果と合致したが、uTFF1 について、Leberherz-Eichinger らは、stage 1 の早期 CKD では uTFF1 が上昇しその後 CKD 進行に伴い低下すると報告しており、我々の結果と矛盾した。また、uTFF2 が stage 1, 2, 3 の早期・中期 CKD で有意に上昇し、ROC 解析で早期 CKD の予測因子となる報告があり、これも我々の結果と合致しなかった。

uTFF の由来について詳細は不明だが、培養ヒト近位尿細管上皮細胞に免疫グロブリン λ 軽鎖を曝露させると、TFF3 が合成・産生されることが報告されている。また、ヒト TFF3 のプロモーター領域が、STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) や NF- κ B (nuclear factor- κ B) の結合部位を有することが報告されており、これらの転写因子が CKD 進行の主要な制御因子となっている可能性があることから、炎症などの誘因でこれらの転写因子を介した TFF3 の発現上昇機序が存在するのかもしれない。

ラットでは、腎髄質外層の外帯にある尿細管に多くの *tff3* mRNA が発現しているが、加齢や薬剤性の急性腎障害に伴い発現量が低下することが報告されている。ヒトの正常腎では、TFF3 は集合管同様、近位尿細管や遠位尿細管細胞に発現しているが、TFF1 は少量のみ分泌される。Western blot では、TFF3 のみが腎髄質で確認され、集合管では TFF1, TFF3 が粘膜層を構成していることが報告されている。これらより、尿中の TFF1, TFF3 の増加は血清からの漏出のみならず、尿路からの排泄を示唆していると考えられる。

また、Framingham Heart Study で行われた研究では、LRP2 の多様な変異により、uTFF3 レベルが有意に変化することが明らかとなっている。*Lrp2* は近位尿細管細胞に存在する、マルチ

リガンド受容体であるメガリンをコードしていることから、TFF3も α 1-MG, β 2-MGのようにメガリンのリガンドである可能性があり、*Lrp2*の変異によってTFF3の尿細管への作用が変化する可能性がある。

腎におけるTFFの役割について詳細は分かっていない。TFF3は結腸を始めとする消化管の杯細胞にも発現しており、粘膜維持や修復に大きく関わっている。TFF3を全身性にノックアウトしたマウスは、個体発生は正常であり明らかな腎形態異常もみられないものの、消化管障害後の粘膜上皮が再生されにくいことが報告されている。消化管と同様、TFF3は腎尿細管上皮において組織修復に関わっているのかもしれない。腎尿細管上皮細胞のTFF3を特異的にノックアウトすることで、腎におけるTFF3の役割が明らかになる可能性がある。

本研究の生存分析では、uTFF1, uTFF3がそれぞれ単独で、あるいは尿中アルブミンとの併用でCKD進行の有意な予測因子となることが明らかとなった。前述のFramingham Heart Studyでは、uTFF3は総死亡や腎疾患併存での死亡を予測したものの、CKD発症やアルブミン尿との関連は認められなかった。

また今回のROC解析では、uTFF3がCKD stage 3b以上の進行を予測する有用なバイオマーカーとなった。他のパラメーターでも有意な結果が得られたが、uTFF3のAUCが最大であった。尿採取は採血よりも侵襲性が低いことを考慮すると、uTFF3レベル測定の意義は大きいと考える。

最後に、本研究の限界について述べる。一つ目に対象CKD患者の原疾患において、わが国の透析導入の最多疾患である糖尿病性腎症の割合が低いことが挙げられる。糖尿病症例を含むことで、TFFレベルが影響される可能性がある。二つ目に、TFF測定に際して複数のELISA法の報告が存在する（測定法の標準化がなされていない）。今後、迅速かつ安価な測定系の確立が重要になると思われる。三つ目に、アウトカムに到達した患者数が比較的少数であり、今回の解析結果に影響している可能性がある。四つ目に、今回CKD患者の腎臓におけるTFF発現部位の検討はされていない、ことが挙げられる。

[結論]

今回、uTFFがCKD患者の既存の尿細管障害マーカーと相関し、腎機能予後の予測に関連していることが明らかとなった。TFFのヒト腎臓内における局在部位やその機能、CKD進行に果たす役割の解明など、今後さらなる研究の進展が期待される。