

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10643

研究課題名(和文)非侵襲的バイオマーカーによる腎移植後再発性腎炎の発症・活動性予測法の確立

研究課題名(英文)A single center prospective observational study for the purpose of non-invasive diagnosis of post-transplant IgA nephropathy in the renal transplant recipients

研究代表者

祖父江 理 (Sofue, Tadashi)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80452671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新規バイオマーカー糖鎖異常IgA1による腎移植後IgA沈着症・腎症の非侵襲的診断・病態解明・予後予測・治療効果判定を目的に前向きコホート研究を行った。血清糖鎖異常IgA1、抗糖鎖異常IgA1-IgG、糖鎖異常IgA1-IgG免疫複合体ともにIgA沈着の有無で有意差は認めなかった。1年目にはIgA沈着症を認めるものの3年後には消失した症例では1年時の免疫複合体濃度は低い傾向にあり、糖鎖異常IgA1-IgG免疫複合体定量はIgA沈着症の予後予測に有用である可能性が示唆された。また、尿細管老化が移植腎機能に与える影響についても検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Non-invasive methods of diagnosis of post-transplant IgA deposition (IgAD) in the allograft using serological and pathological biomarkers are being developed. Possible serum biomarkers include serum galactose-deficient IgA1 (Gd-IgA1), Gd-IgA1-specific IgG and Gd-IgA1-specific IgA, and its immune complexes. Immunofluorescence analysis using Gd-IgA1 monoclonal antibody may provide a pathological biomarker. These serological and pathological biomarkers may be suitable for the characterisation of the stage of IgAD. However, there is insufficient information regarding whether serological and pathological biomarkers can predict the progression of asymptomatic IgAD to symptomatic IgA nephropathy (IgAN). We propose that the pathogenesis of IgAN can be defined through the clinical study of IgAD in the allograft using protocol biopsies conducted by nephrologists involved in clinical kidney transplantation.

研究分野：腎移植・腎臓内科学

キーワード：腎移植 IgA腎症 再発腎炎 糖鎖異常IgA1 細胞老化 移植腎生検

研究 腎移植後 IgA 腎症に関する研究

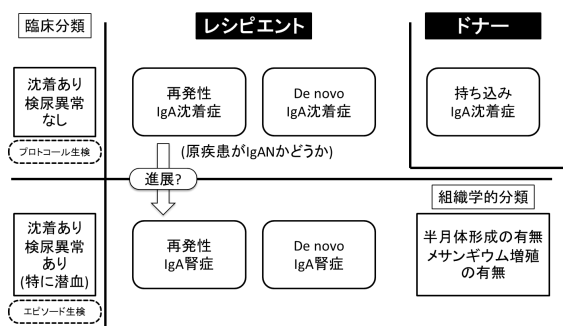
1. 研究開始当初の背景

慢性糸球体腎炎の一つである IgA 腎症は腎糸球体への IgA 沈着と血尿・蛋白尿を特徴とし、末期腎不全へ至る疾患である。IgA 腎症は腎移植患者の末期腎不全原疾患の 20%程度を占めるが、腎移植後の再発が約 50%と高率で、再発は移植腎機能廃絶の原因であることが報告されている。

生体腎移植後は急性拒絶反応をより早い段階で検出するために定期的に移植腎腎生検を施行する。この際、IgA 腎症を原疾患とするレシピエントにおいて、検尿異常を認めない段階の IgA 再沈着症を認めることがある。しかしながら、腎移植後レシピエントは免疫抑制剤の修飾下にあるため、再発性 IgA 沈着症患者の場合、検尿異常と実際の組織が関連しないことが多い。このため、自己腎 IgA 腎症においては活動性評価、検出とも有用である血尿蛋白尿が移植腎の場合有用なバイオマーカーとはならず、侵襲的移植腎生検によってのみ再発性腎炎の診断がなされている。

一方、ドナー腎からレシピエントに持ち込まれた IgA 沈着症はレシピエントに移植されると、自然に消退することを我々は報告してきた(Sofue T, et al. 2013)。このことから、腎臓局所よりも、全身の免疫状態が IgA 腎症の発症・進展に関わっていることが示唆される。再発性 IgA 沈着症は罹患率の高い病態であるにもかかわらず、検尿異常を伴わない IgA 沈着症が検尿異常を伴わない段階でも予後に影響を与えるのか、検尿異常を伴う IgA 腎症再発の時点で初めて予後に影響するのか、あるいはすべての IgA 沈着症が IgA 腎症に進展するのかなど先行研究では解明されていない部分が多い。

図 1

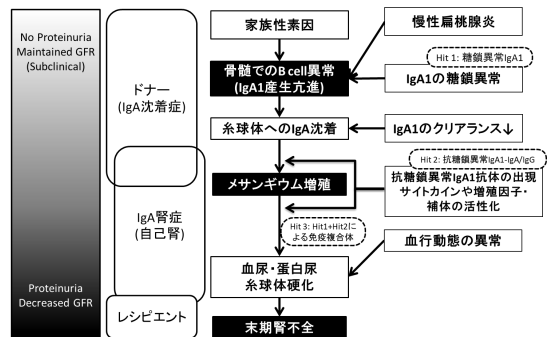


近年、自己腎 IgA 腎症の発症機序解明を目的とした研究がなされており、血中糖鎖異常 IgA1 や抗糖鎖異常 IgA1 抗体が血清学的 IgA 活動性を評価しうる指標であることが報告されている。自己腎 IgA 腎症では、これらの血清学的 IgA 活動性によって IgA 腎症検出が可能であることが示されているが、腎移植領域において、再発 IgA 腎症での血清学的 IgA 活動性は評価されていない。通常自己腎では検尿異常を伴う IgA 腎症の段階で診断され、検尿異常を伴わない IgA 沈着症は移植腎での

み診断されているが、自己腎でもその段階があると我々は推定する。

近年解明されてきた IgA 腎症の病態仮説を図 1 に示す。ドナーでは無症候性でありながら、IgA 沈着・メサンギウム増殖までを認めるが、その後検尿異常の出現や腎機能低下を起す症例は稀である。これはすなわち IgA 沈着症のすべての症例が IgA 腎症を発症するわけではないことを示している。自己腎においても検尿異常出現前の IgA 沈着症と言える病態があることが推測される。糸球体沈着性の糖鎖異常 IgA1 のみで IgA 沈着症は発症しうると考えられるが、IgA 沈着症から IgA 腎症への進展リスクとしては、糖鎖異常 IgA1 に対する IgA・IgG 抗体(抗糖鎖異常 IgA1 特異的 IgA/IgG)が挙げられている。つまり、糖鎖異常 IgA1 の糸球体への沈着(Hit 1)のみでは IgA 腎症は発症せず、その後抗糖鎖異常 IgA1 特異的 IgA や IgG が産生される(Hit 2)ことで、腎炎へと進展していくという仮説である。

図 2



2. 研究の目的

今回我々は血清学的 IgA 活動性という非侵襲的新規バイオマーカーを検査することにより、腎移植後再発性 IgA 腎症の発症と活動性、治療反応性を予測することを目的とし、以下の研究を着想した。

3. 研究の方法

香川大学単施設前向き研究として、2010年から2013年の間に当院で生体腎移植を施行した連続 27 例のレシピエントとそのドナーを対象とした。原疾患は IgA 腎症に限らず全例を対象とし、移植腎生検にて IgA 沈着を認めた 10 例のレシピエントと提供腎に IgA 沈着を認めた 8 例のドナーを対象とし、沈着を認めない症例を比較対照とした前向き観察研究を行った。1年、3年のプロトコール移植腎生検とエピソード生検にて認められる IgA 沈着をアウトカムとし、バイオマーカーによる検出力検定を行った (UMIN000015773)。

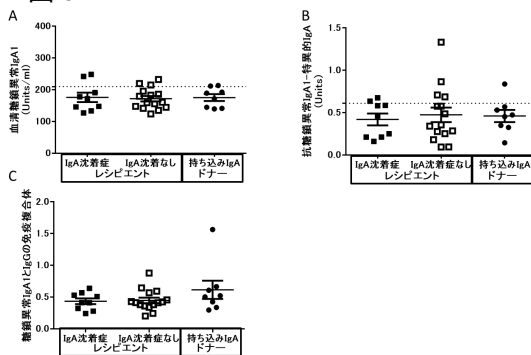
4. 研究成果

単施設前向きコホート研究の結果、移植後 3 年以内の IgA 沈着は 37% の症例で認められた。糖鎖異常 IgA1 染色キット KM-55 を用いた解析では、腎移植後 IgA 沈着症症例におい

ても、沈着している IgA は糖鎖異常を有していることが認められた(雑誌論文 2)。また、IgA 沈着群では移植腎機能が低値で推移する傾向にあった。すべてプロトコル生検での検出で、検尿異常はほとんどない症例であった。

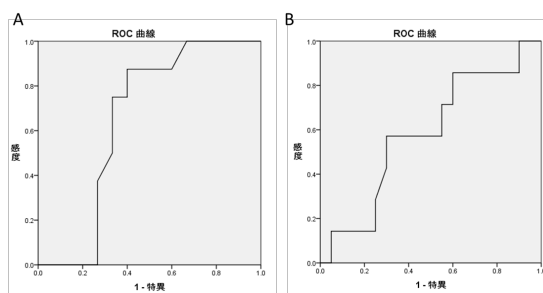
IgA 沈着を認めた際のレシピエント移植腎生検時(n=10)と IgA 沈着症を認めたドナーの提供前(n=8)、IgA 沈着を認めなかったレシピエント(n=17)の 3 群間で比較すると、血清学的 IgA 活動性(糖鎖異常 IgA1、これに特異的な IgA、糖鎖異常 IgA1 を含む免疫複合体の 3 項目のバイオマーカー)は病理学的にほぼ同一の IgA 沈着症という組織像において、ドナー・レシピエント間に血清学的 IgA 活動性の差はなく、多くの症例で健常人の 90 パーセントアイルを下回っていた(図 3)。

図 3



自己腎 IgA 腎症検出に有用であったロジスティックモデルによる IgA 腎症検出式を今回のコホートに当てはめると、レシピエントではある程度の検出力(AUC 0.65, 感度 88%, 特異度 60%, 図 4A)を示したが、それほど実用的とは言えなかった。ドナー IgA 沈着症においては十分な検出力は認めなかった(AUC 0.58, 感度 86%, 特異度 40%, 図 4B)。

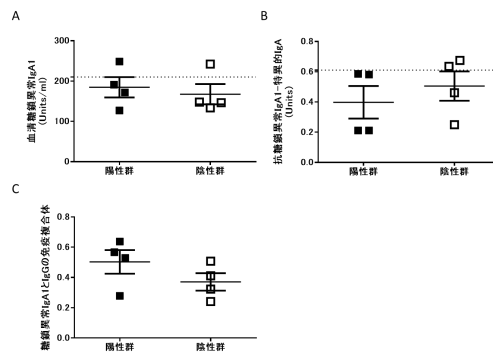
図 4



C3 共沈着の有無別の関連を検討した。C3 共沈着の有無と eGFR 値、検尿異常の程度とは関連を認めなかった。C3 共沈着の有無別のバイオマーカー値の違いを図 5 に示す。血清学的 IgA 活動性(血清糖鎖異常 IgA1、抗糖鎖異常 IgA1-特異的 IgA、糖鎖異常 IgA1 を含む免疫複合体)は C3 沈着の有無と有意な関連を認めなかった。C3 の共沈着を認めない群では血清中の糖鎖異常 IgA1 を含む免疫複合体

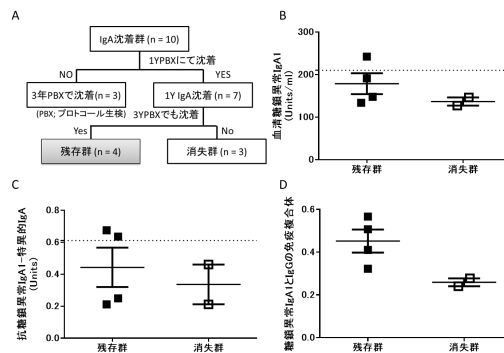
量は、有意差はないものの低値である傾向にあった。

図 5



続いて、血清学的 IgA 活動性による予後予測能を評価した。1 年時のプロトコル生検で IgA 沈着を認めた 7 例を対象に評価した。7 例中、3 年時の移植腎生検の際に IgA 沈着が消失していた症例は 3 例、沈着が残存していた症例は 4 例であった。残存群・消失群の 1 年時プロトコル腎生検の際の背景因子は、群間に有意差を認めないが、消失した群では eGFR 値が低値であった。また、診断後扁桃摘治療を行った症例はむしろ残存群の方で多く、診断後の扁桃摘治療とその 2 年後の IgA 沈着との間に関連は認められなかった。沈着残存/消失別の 1 年移植生検時のバイオマーカー値の違いを図 6 に示す。血清糖鎖異常 IgA1(図 6B)と抗糖鎖異常 IgA1-特異的 IgA(図 6C)は群間に有意差を認めなかったが、糖鎖異常 IgA1 を含む免疫複合体(図 6D)は有意差を認めないものの、消失した群で低い傾向にあった。このことから、1 年時の移植腎生検の際に免疫複合体が低い症例は IgA 沈着が消失しやすい可能性が示唆された。

図 6



これらバイオマーカーは IgA 沈着の検出だけではなく、沈着した IgA の予後、病態の解析に重要であると考えられている。自己腎においては、完成した IgA 腎症の像を観察することしかできないが、移植腎のプロトコル生検においては IgA 腎症の再発の過程を検尿異常のない段階から観察しうる。IgA 腎症における C3 の共沈着の有無は補体系の活性化

を示していると考えられている。糖鎖異常 IgA1 の形成のみでは IgA 腎症は発症せず、糖鎖異常 IgA1 特異的抗体 (IgA もしくは IgG) と免疫複合体を形成し、補体系の活性化を起こすことで、係蹄の血管炎が惹起されると考えられている。今回、検尿異常を伴わない IgA 沈着症の症例においても補体系の活性化を示す C3 の共沈着を認めた。しかしながら、C3 の共沈着のない群では血清中の糖鎖異常 IgA1 を含む免疫複合体量低値である傾向にあり、免疫複合体濃度は補体系の活性化を示すバイオマーカーになりうると考えられた。

加えて、血清学的 IgA 活動性による予後予測の評価では、症例数が少ないものの、糖鎖異常 IgA1 を含む免疫複合体が消失した群で低い傾向にあった。このことから、免疫複合体定量が腎移植後 IgA 沈着症の予後を予測する可能性が示された。同じ無症候性 IgA 沈着症であっても、診断後扁桃摘等の治療を行わなくとも消失する症例もあり、これらバイオマーカーによる予後予測が可能となれば、不要な治療を回付することも可能であると考えられた。

当然、この研究には非常に多くの制約がある。サンプルサイズが非常に小さく、症例集積が必要である。また、全症例の原疾患が確定されておらず、再発なのか、De novo の IgA 沈着症なのかを完全に判断することは不可能であった。このことから、再発 IgA 沈着症と De novo IgA 沈着症間のバイオマーカーの違いを検討することはできなかった。

今回の研究から、血清学的 IgA 活動性を示すバイオマーカーが腎移植後の IgA 沈着症における診断・病態解明・予後予測・治療効果判定の各段階にて有用である可能性が示唆された。これらを検討するために全国の移植施設の協力を得て、多施設共同研究を行っている (UMIN000021922)。

研究 マージナルドナーに関する研究

1. 研究開始当初の背景

献腎移植の不足により、我が国では生体腎移植に頼らざるを得ない状況が続いている。生体腎移植件数を増やすために、高齢・高血圧などのマージナル因子を有するマージナルドナーからの移植が増えている。マージナルドナーの適応はアムステルダムフォーラムにて決められている。しかしながらマージナル因子は程度の差や重複があり、臓器の質を一元的に予測しうるバイオマーカーはない。近年のバイオマーカー研究の進展により、いくつかの AKI・細胞周期 CDK・細胞老化のバイオマーカーが報告されているが、これらのバイオマーカーと実際の臓器の質との関連は明らかではない。

我々は提供腎の臓器の質を摘出腎の動脈硬化病変や提供前のアルブミン尿にて検出できる可能性を報告してきた。一方で、尿細管細胞の老化は虚血再灌流に対する予備能を直接的に示す因子であると考えられる。一

般的に、細胞における Stress-induced senescence は癌化を防ぐための自己防御機構である。尿細管細胞においては高血糖や高血圧により Stress-induced senescence が増加することが示されている。老化を示すマーカーとして p16 は p21 や p53 よりも年齢と相関することが示されている。腎臓における尿細管老化は献腎移植、がんの摘出腎では報告されている。しかしながら、生体腎移植ドナーでの評価はなく、尿細管老化のある生体腎移植ドナーの提供後の腎予後は報告されていない。

2. 研究の目的

今回我々は生体腎移植ドナーにおいて、提供腎の尿細管老化に影響する因子と移植腎機能との関連を解明することを目的に以下の検討を行った。

3. 研究の方法

対象は当院にて生体腎移植を行った連続 38 例のドナー・レシピエントで、摘出腎生検での全尿細管核における p16 陽性尿細管細胞核の割合を尿細管老化度と規定し、前向き観察研究にて移植 1 年後の移植腎機能と比較した。ドナーの提供前の血液・尿検体からドナー腎の老化と関連する因子の検討を行った (UMIN 000004905)。

4. 研究成果

38 例のドナーのうち、21 例は何らかのマージナル因子を認めた。マージナル因子の重複を認めるドナーでは中等度以上の尿細管老化度を認めた (図 7)。

提供前 eGFR、高血圧、BMI、アルブミン尿は尿細管老化度とは相関しなかった。提供腎の尿細管老化度はレシピエントの 1 年後移植腎機能と年齢等の因子で調整した後も有意な負の相関を認めた ($r = -0.281$, $p=0.050$) だが、ドナーの 1 年後腎機能とは相関しなかった (図 8)。提供前のドナー血清可溶性 Klotho 高値は有意に提供腎の尿細管老化度が低いことと関連した (図 9, AUC, 0.78 (95% CI 0.62–0.93))。

これらのことから、マージナルドナーからの生体腎移植において、マージナル因子の程度・重複は尿細管老化度にて一元的に表出され、提供腎の尿細管老化度はレシピエント腎機能を推測する因子であることが示された。血清可溶性 Klotho を用いた尿細管老化度検出は適切なドナー候補者の選定のみならず、急性腎障害や薬剤性腎障害のリスク層別化に有用である可能性が示唆された。

図 7

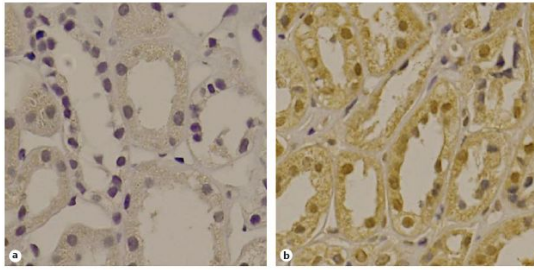


図 8

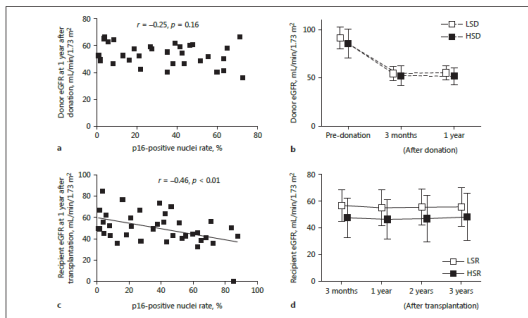


Fig. 2. Effects of the p16-positive nucleus rate on kidney function in donors and recipients. a Association between the p16-positive nucleus rate and donor eGFR at 1 year after donation. b Serial eGFR profiles of donors. c Association between the p16-positive nucleus rate and recipient eGFR at 1 year. d Serial eGFR profiles of recipients. eGFR, estimated glomerular filtration rate; HSD, donors with high senescent kidneys; LSD, donors with low senescent kidneys; HSR, recipients with kidneys from HSD; LSR, recipients with kidneys from LSD.

図 9

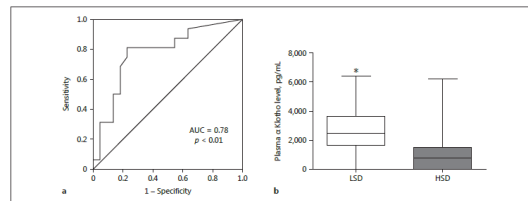


Fig. 4. Association between the plasma α Klotho level and tubular cell senescence. a ROC curve of the plasma α Klotho level for prediction of LSD. b Plasma α Klotho levels in LSD and HSD. LSD, donors with low senescent kidneys; AUC, area under the curve; HSD, donors with high senescent kidneys. * $p < 0.05$.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Sofue T, Kushida Y, Ozaki T, Moritoki M, Nishijima Y, Ohsaki H, Ueda N, Kakehi Y, Nishiyama A, and Minamino T. Tubular cell senescence in the donated kidney predicts allograft functions, but not donor remnant kidney functions, in living donor kidney transplantation. *Am J Nephrol*. 査読あり 2018;47(1):8-17. doi: 10.1159/000485845.
2. Suzuki H, Yasutake J, Makita Y, Tanbo Y, Yamazaki K, Sofue T, Kano T, Suzuki Y. IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis have a shared feature involving galactose-deficient IgA1 oriented pathogenesis. *Kidney Int*. 査読あり 2018; 93(3):700-705. doi: 10.1016/j.kint.2017.10.019
3. Fujita T, Sofue T, Moritoki M, Nishijima Y, Tokuhara Y, Wakisaka H, Matsunaga T, Kushida Y, Haba R, Ohsaki H. Urinary

WT1 Positive Cells as a Non-invasive Biomarker of Crescent Formation. *Cytopathology*. 2017; 28(6): 524-530 doi: 10.1111/cyt.12460.

4. 祖父江理. 腎移植後 IgA 腎症および IgA 沈着症 *BioClinica* 2017;32(5): 58-64 北隆館

5. 祖父江理. ファブリー病と腎移植 *日本臨床腎移植学会雑誌*, 査読有 2015;3(1):23-30

6. 再発腎炎の予防と対策 祖父江理 *今日の移植* 2015;28(6): 650-656

7. Sofue T, Inui M, Hara T, Moritoki M, Nishijima Y, Kushida Y, Nishiyama A, Kakehi Y and Kohno M. Association between post-transplant immunoglobulin A deposition and reduced allograft function. *Transplant Proc*. 査読有 47: 332-336, 2015. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.01.011.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Sofue T, Marginal donor in living-donor kidney transplantation. Symposium11: Transplantation and CVD, ISN Frontiers Meeting 2018 Tokyo 2018 2.24

2. 祖父江理, 谷澤雅彦, 川口武彦, 小口英世, 辻田誠, 上月正博, 伊藤修, 山縣邦弘, 柴垣有吾 腎移植患者に対する腎臓リハビリテーション 特別企画 1 腎臓リハビリテーションのガイドラインをめぐって 第 8 回日本腎臓リハビリテーション学会学術集会 2018 3 17 仙台市

3. 祖父江理, 上田修史, 串田吉生 遺伝性疾患におけるヘテロ接合体女性からの腎提供 スポンサーシップシンポジウム 7 遺伝性疾患における腎移植-治療可能な疾患ファブリー病について- 第 51 回日本臨床腎移植学会 2018 2 16 神戸市

4. Sofue T, Kushida Y, Moritoki M, Nishijima Y, Nishiyama A, Minamino T. Tubular cell senescence in the donated kidney predicts allograft functions, but not donor remnant kidney functions, in living donor kidney transplantation. *American Society of Nephrology, Kidney Week 2017*. 2017:11/2 ~ 5 New Orleans, USA

5. 祖父江理, 串田吉生, 下野愛子, 大西啓右, 藤田拓朗, 尾崎太郎, 守時政宏, 西島陽子, 上田修史, 南野哲男 De novo IgA 腎症治療後に MGN の再発を認めた 1 例 第 47 回日本腎臓学会西部学術大会 2017 10 14 岡山市

6. 祖父江理 再発腎炎 よくわかるシリーズ 腎移植内科研究会 第 3 回学術集会 2017 9 9 東京都中央区

7. 祖父江理 CVD 合併レシピエントの適応と術後管理 シンポジウム 6 第 33 回腎移植・血管外科研究会 2017 7 8 小田原市

8. 祖父江理, 西島陽子, 守時政宏, 大崎博之, 串田吉生, 箕善行, 西山成, 南野哲男 ドナー腎における尿細管老化度がレシピエント移植腎機能を規定する *日本高血圧学会* 第 6

回臨床高血圧フォーラム 2017 5 13 岡山市
9. 祖父江理 "教育セミナー 移植腎後再発
および新規発症 IgA 腎症/沈着症" 移植腎病
理研究会第 20 回学術集会 2016/7/16
10. 祖父江理 移植腎機能に影響する要因:
臨床と病理。腎臓内科医から移植医へ 第 59
回日本腎臓学会 CME 2016/6/19
11. 祖父江理 腎移植後高尿酸血症 第 61
回日本透析医学会学術集会・総会 シンポジ
ウム 1 2016/6/10
12. 祖父江理、鈴木仁、守時政宏、西島陽子、
串田吉生、笈善行 血清学的 IgA 活動性定量
による腎移植後 IgA 沈着症の非侵襲的診断の
検討 第 59 回日本腎臓学会学術集会
2016/6/19
13. 祖父江理 シンポジウム 2 透析患者の
心血管合併症の Up-to-date 透析患者の脳
卒中 第 60 回日本透析医学会総会
2015/6/28

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kagawa-ninai.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

祖父江 理(TADASHI SOFUE)

香川大学・医学部 循環器・腎臓・脳卒中
内科・講師

研究者番号：80452671

(2)連携研究者

鈴木 仁 (HITOSHI SUZUKI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10468572

連携研究者

大崎 博之 (HIROYUKI OHSAKI)

神戸大学・医学部保健学科・准教授

研究者番号：80438291