

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16819

研究課題名（和文）移植腎の長期予後を左右するMMP-9の役割とその特徴的な動態の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of MMP-9 and its characteristic dynamics in the long-term prognosis of transplanted kidneys

研究代表者

北島 和樹（Kazuki, Kitajima）

北里大学・医学部・助教

研究者番号：90621417

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：線維化の進展による腎実質の枯渇は、慢性腎疾患に共通した終末像である。線維化は、原疾患が何であれ基本的に、近位尿細管上皮の損傷 EMT 線維化の経過をたどる。腎移植後急性拒絶症例では、発症中も改善後も、MMP-9を発現している近位尿細管の周囲に、EMTマーカーであるα-SMAが局所的に発現していることを観察した。このことは、急性拒絶を経験した移植腎には早い段階でEMTが生じ、すでにEMTから線維化への流れが進行し始めていること、およびその過程に一貫してMMP-9が関与していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎線維化関連分子が多数同定され、予防や治療法の開発が進められているが、移植腎の線維化の機序については不明な点が多く、どの段階の反応がその可逆性を支配しているか不明である。本計画により、近位尿細管上皮でのMMP-9発現増大がEMTの指標となることが明らかになれば、MMP-9の免疫染色を腎生検の検査項目に加えることで、腎線維化進行の可能性を、早期の段階で診断できる。またEMTの可逆性を左右するマーカー分子を同定し、臓器不全の進展予防や治療法の開発にも寄与できる。そのマーカー分子やその分解物等が尿中で確認できれば、臓器不全の兆候を早期に検出できる非侵襲性のマーカーとして非常に応用範囲が広い。

研究成果の概要（英文）：Depletion of renal glands due to progress in fibrosis is a common terminal image in chronic renal disease. Fibrosis basically follows the course of damage to the proximal tubular epithelium EMT (epithelial mesenchymal transition) fibrosis, whatever the underlying disease.

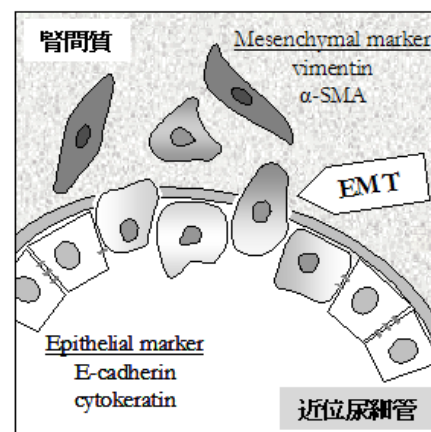
In acute rejection cases after renal transplantation, it was observed that the EMT marker α-SMA was expressed locally around the near tubules expressed MMP-9 during onset and after improvement. This suggests that transplanted kidneys that have experienced acute rejection have EMT at an early stage, and that the flow from EMT to fibrosis has already begun to progress, and that MMP-9 is consistently involved in the process.

研究分野：移植腎病理

キーワード：腎線維化 EMT MMP 移植腎病理 拒絶反応 薬剤性腎障害

## 1. 研究開始当初の背景

線維化の進展による腎実質の枯渇は、慢性腎疾患に共通した終末像である。線維化は、原疾患が何であれ基本的に、**近位尿細管上皮の損傷 EMT 線維化の経過**をたどる。線維化の中間段階である EMT (右図) は、上皮細胞が間葉系細胞に変化する現象で、臓器線維化の機序のほかに、胚発生における器官形成や様々な病態の発症過程にかかわっている。腎では、尿細管上皮細胞の極性喪失と基底膜からの脱落および間質への遊走を特徴とし、その過程で上皮マーカー分子の発現が低下し、間葉系マーカー分子の発現が上昇する。一方、急性腎疾患の多くは病的変化が可逆的で機能の回復が期待できる。急性腎不全では尿細管上皮細胞が壊死に陥るが、生き残った細胞が尿細管の再生に貢献し腎機能の回復をもたらすと考えられている。傷害を受けた尿細管が回復する場合としない場合があるのはなぜか。この問題に対する解答はまだ得られていない。



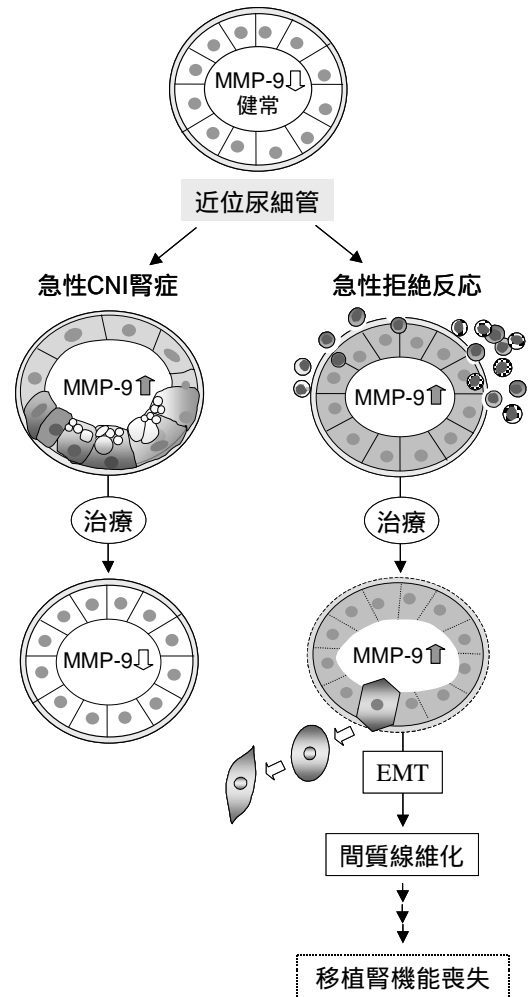
申請者はこれまでに移植腎生検組織の免疫染色により、MMP-9 が、遠位尿細管の上皮細胞では移植腎の状態に関係なく恒常的に発現し、近位尿細管では上皮細胞に損傷があるときに特異的に発現が増大するという特徴的なパターンを報告した (2010 年日本病理学会総会)。さらに、一過性の虚血再灌流障害や免疫抑制剤の急性毒性による腎障害 (急性 CNI 腎症) では、近位尿細管で増大した MMP-9 の発現は、尿細管上皮の傷害が改善すると健常レベルまで低下するのに対し、急性拒絶反応を示した症例では、加療により病態が改善した後も、依然として MMP-9 の高い発現レベルが持続するという現象を見いだした (次ページ右図)。さらに急性拒絶症例では、発症中も改善後も、MMP-9 を発現している近位尿細管の周囲に、EMT マーカーである α-SMA が局所的に発現していることを観察した。このことは、**急性拒絶を経験した移植腎には早い段階で EMT が生じ、すでに EMT から線維化への流れが進行し始めていること、およびその過程に一貫して MMP-9 が関与していることを示唆している。**

EMT を誘導する因子として多数の分子が同定されているが、最も重要とされているのが TGF-β である (Kalluri R, et al. Clin Invest 112: 1176-1184, 2003)。しかし最近、数ある EMT 関連因子のひとつとして扱われていた MMP-9 が、実は、尿細管における EMT から線維化の全過程を誘導できる主役級の因子であることを示唆する結果が、培養近位尿細管上皮細胞を用いた研究から得られた (Tan TK, et al. Am J Pathol 176: 1256-1270, 2010; Guoping Z et al. Am J Pathol 175: 580-590, 2009)。申請者らも、それを支持する予備的結果を得ていることから、MMP-9 と EMT および線維化との関連を重視している。そして、これまでの研究結果より、**近位尿細管上皮細胞で MMP-9 の強い発現が持続しているときには、そこで EMT が起きている指標になるのではないかという仮説をたてている。**

## 2. 研究の目的

現在までに EMT を介した線維化関連分子が多数同定され、これらを標的とした予防や治療法の開発が進められている。しかし、移植腎の線維化の機序については不明な点が多く、どの段階の反応がその可逆性を支配しているかについては明らかになってい

ない。本計画の実施により、近位尿細管上皮での MMP-9 発現増大が EMT の指標となることが明らかになれば、MMP-9 の免疫染色を腎生検の検査項目に加えることで、腎線維化進行の可能性を、明らかな病理的变化が現れる前の早い段階で診断できる。また EMT の可逆性を左右するマーカー分子を同定することができれば、様々な臓器不全の進展予防や治療法の開発にも寄与できる。さらにそのマーカー分子あるいはその分解物等が尿中で確認できれば、臓器不全の兆候を早期に検出できる非侵襲性のマーカーとして非常に応用範囲が広い。



### 3. 研究の方法

#### MMP-9 の EMT マーカーとしての可能性の検討

現在まで約 90 例の腎移植から、baseline 生検(移植手術中採取) 90 検体以上、follow-up 生検 150 検体以上が保管され、パラフィン切片、凍結切片、電顕用試料が使用可能である。それらを用い、異なる状態の移植腎生検(拒絶なし、急性拒絶/境界型変化およびその治療後、CNI 腎症およびその治療後など)で

マーカー分子	
基底膜	collagen IV, laminin, etc.
上皮	E-cadherin, cytokeratin ZO-1, $\beta$ -catenin, etc.
EMT/間葉	$\alpha$ -SMA, vimentin, TGF- $\beta$ MMPs, collagen I/III, etc.
再生・修復	EGF, HGF, IGF, BAM-7 follistatin, etc

MMP-9 とその他の MMPs およびその阻害因子(TIMPs)に対する免疫染色を行ない、近位尿細管での発現の有無を比較する。また、近位尿細管上皮に MMP-9 の持続的発現のある場合とない場合に分けて、尿細管上皮細胞の形態変化や各種マーカー分子(右表)の免疫組織学的発現の違いを検討し、EMT との関連を評価する。

### 4. 研究成果

移植腎生検組織の免疫染色により、MMP-9 が、遠位尿細管の上皮細胞では移植腎の状態に関係なく恒常的に発現し、近位尿細管では上皮細胞に損傷があるときに特異的に発現が増大するという特徴的なパターンを確認することができた。さらに、一過性の虚血再灌流障害や免疫抑制剤の急性毒性による腎障害(急性 CNI 腎症)では、近位尿細管で増大した MMP-9 の発現は、尿細管上皮の傷害が改善すると健常レベルまで低下するのに対し、急性拒絶反応を示した症例では、加療により病態が改善した後も、依然として MMP-9 の高い発現レベルが持続するという現象も確認した。さらに急性拒絶症例では、発症中も改善後も、MMP-9 を発現している近位尿細管の周囲に、EMT マーカーである  $\alpha$ -SMA が局所的に発現していることを観察した。このことは、急性拒絶を経験した移植腎には早い段階で EMT が生じ、すでに EMT から線維化への流れが進行し始めていること、およびその過程に一貫して MMP-9 が関与していることを示唆している。

さらに、拒絶反応によって損傷した尿細管上皮細胞が EMT (epithelial-mesenchymal transition: 上皮 - 間葉移行)を経て間質の線維化に至る過程で、matrix metalloproteinase (MMP)-9 が重要な役割を果たしていることが明らかになった。しかし EMT が非可逆的な変化となり間質線維化に進む。WNT10A の発現が非可逆化に影響することが数多く報告されていることに注目した。

WNT10A 抗体(Wint10A (A-4) sc-376028)による免疫染色を当院腎移植生検検体に行った。急性拒絶反応や軽度の薬剤性腎障害症例では近位尿細管上皮細胞核に WNT10A 発現が低かったが、慢性拒絶反応症例では発現が上昇する傾向があることがわかった。この変化は慢性拒絶反応により障害された近位尿細管が線維化へ進行しているものを見ていると考えている。今後、染色検体数を増やし WNT10A の発現を評価していく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------