

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16010

研究課題名(和文)慢性抗体関連型拒絶反応の傍尿管毛細血管内皮障害における小胞体ストレスの関与

研究課題名(英文)The significance of ER-stress in antibody-mediated rejection after kidney transplantation

研究代表者

小林 賛光 (Kobayashi, Akimitsu)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：90439779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円

研究成果の概要(和文)：腎移植後の慢性抗体関連型拒絶反応(chronic AMR)における内皮障害と小胞体ストレス(endoplasmic reticulum stress: ER stress)の関与につき、そのマーカーであるC/EBP-homologous protein(CHOP)およびBipの免疫染色を凍結切片を用いて行った。内皮での発現はみられなかったが各症例により尿管上皮の核で発現の違いがあることが判明した。これらの陽性率と移植腎機能や病理学的な組織障害の程度と相関性はみられなかった。しかしながら間質の線維化が高度に進行し、尿管が萎縮傾向となった上皮細胞では逆に陽性度が低い傾向があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初、ER-stressマーカーの発現は、組織障害の原因となりうる因子と考えていた。しかしながら上記染色結果より、ER-stressによる各シャペロンの発現は、障害に対する反応性または適応性変化であり、障害が進行し細胞死、ひいては組織荒廃にいたってしまうとその反応性は逆に低下してしまうのかもしれないと考えられた。このことより、ER-stressそのものを治療のターゲットとするべきではない可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relation between Antibody-mediated rejection after kidney transplantation and ER-stress. Immunostaining of C / EBP-homologous protein (CHOP) and Bip as ER-stress markers was performed using frozen sections. No expression was observed in the endothelium of peritubular or glomerular capillaries, but it was found that there was a difference in expression in the nucleus of the tubular epithelium in each case. No correlation was found between these positive rates and the degree of kidney graft function or pathological tissue damage. However, it was found that epithelial cells in which the tubules tended to atrophy and highly advanced interstitial fibrosis tended to have a lower positive degree.

研究分野：腎移植

キーワード：ER-stress 腎移植 CHOP Bip

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、腎移植後の短期生着率は、免疫抑制剤の発展により著しく改善した。一方で長期成績についてはいまだ十分とは言えず、移植腎機能の原因を正確に診断し、治療することが重要である。移植腎廃絶の重要な原因の一つは、抗体関連型拒絶反応 (antibody-mediated rejection: AMR) であることが明らかとなっている(1)。抗体関連型拒絶反応は、抗ドナー抗体と、糸球体内皮や傍尿細管毛細血管 (peritubular capillary: ptc) 内皮細胞上の HLA 抗原との抗原抗体反応を基盤とする。その病態についてこれまで様々な研究がなされてきているが、詳細な機序は未だ明らかとなっていない。これまで我々は、その一因子として、急性および慢性抗体関連型拒絶反応における transcription factor c-Jun の関与について、免疫組織学的に示してきた(2,3)。c-Jun は MAPK の一つである JNK により活性化される核内の transcription factor である。JNK/c-Jun 経路の活性化は炎症、アポトーシスなどに関与するが、我々は、抗体関連型拒絶反応の組織学的特徴である傍尿細管毛細血管炎や傍尿細管毛細血管壁の多層化のみられる ptc 内皮において、リン酸化 c-Jun が強発現し、さらにその発現率が ptc 数の減少と強く相関することを明らかにした(3)。つまり、AMR の ptc 内皮における JNK/c-Jun 経路活性から、ptc 内皮のアポトーシスが誘導され、ptc 内皮細胞数低下、ひいては間質の線維化につながる可能性を考えた。

しかしながら、こういった機序でこの JNK/c-Jun 経路が AMR において活性化されるかは不明であった。

一方、JNK 経路を介した細胞のアポトーシス誘導の機序として、近年、小胞体ストレス (endoplasmic reticulum stress: ER stress) の関与が報告されている。

ER はタンパクの合成、成熟および分解をつかさどる細胞内小器官の一つである。ER では新規に合成されたタンパクの折り畳み (folding) が行われているが、様々なストレス環境下においては、十分に折り畳みができなかつた蛋白 (unfolded protein) が ER 内に蓄積する現象がおり、この状況は ER stress と呼ばれている。この unfolded protein を処理する機構が unfolded protein response (UPR) である。この反応により ER stress を回避しようとするが、その能力を上回る過剰な ER stress が発生するとアポトーシスが誘導される。その際に JNK/c-Jun 経路が活性化されることも明らかとなっている。

AMR における血管内皮障害は補体経路の活性を介するが、同様にその結果生ずる C5b9 活性による膜性腎症モデル (Heymann 腎炎) では、補体活性を介した ER stress と糸球体上皮細胞障害との関連性が報告されている(4)。ゆえに、上皮細胞と同様に、ptc 等の毛細血管内皮においても、AMR による補体活性により ER stress が誘導され内皮障害につながる可能性が考えられた。

以上から、chronic AMR の ptc 内皮において、補体活性を介し過剰な ER stress が慢性的に続くことで、これまで我々が示したような ptc 内皮における JNK/c-Jun 経路を活性化し、アポトーシスが惹起され、ptc loss や線維化につながるのではないだろうかという仮説をたてた。

2. 研究の目的

移植腎における ER-stress の発現と移植腎機能との関連について調べることにした。

3. 研究の方法

対照：東京慈恵会医科大学 腎臓・高血圧内科にて行われた生体腎移植の症例で、プロトコール生検およびエピソード生検を行った約 30 症例。

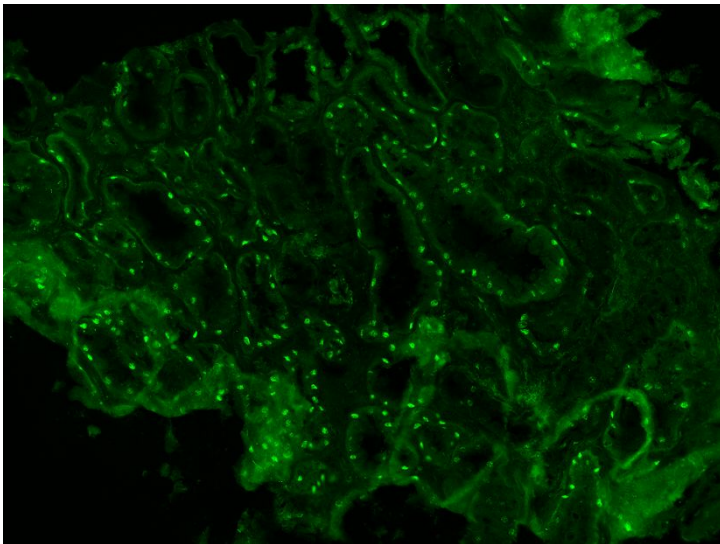
免疫染色：ER stress マーカーとして C/EBP-homologous protein (CHOP) および BiP の免疫染色を凍結切片で行う。

4. 研究成果

対象症例をランダムに選び、凍結切片が十分に残っている症例において IF を行った。

当初、抗体関連型拒絶反応症例では、傍尿細管毛細血管炎の内皮に陽性になることを予想していたが、予想とは異なり発現はみられなかった。一方で、ER-stress は移植腎において免疫抑制剤であるカルシニューリン阻害剤の影響で尿細管上皮で活性化し、尿細管間質障害に関与することが報告されているが、今回の IF による染色では、各症例により尿細管上皮の核における明らかな発現の違いがあることが判明した。そこで、ターゲットを ptc 内皮ではなく尿細管上皮に変更し、腎移植後の尿細管上皮における ER stress の意義につき調べることにした。

拒絶反応の有無にかかわらず、下図のように Bip、CHOP とともに様々な程度で尿細管上皮細胞の核に陽性になることが明らかになった。



各症例により、その陽性の程度は軽微なものから強く発現するものなど様々であった。これらの陽性所見と各種臨床データとの関連性をみたが、移植腎機能や病理学的な組織障害と明らかな関連性はみられなかった。

しかしながら、間質の線維化が進行し、尿細管が萎縮傾向となった上皮細胞では陽性度が低い傾向があることが分かった。

当初、ER-stress マーカーの発現は、組織障害の原因となりうる因子と考えていた。しかしながら上記染色結果より、ER-stress による各シャペロンの発現は、障害に対する反応性または適応性変化であり、障害が進行し細胞死、ひいては組織荒廃にいたってしまうとその反応性は逆に低下してしまうのかもしれないと考えられた。このことより、ER-stress そのものを治療のターゲットとするべきではない可能性がある。

一方で、腎組織障害の進行過程において、障害を受け萎縮傾向となった尿細管上皮が、不可逆性にそのまま間質線維化にいたってしまうのか、それとも再生してくるかの判断は組織学的な所見からは判断できない。

障害を受けた尿細管上皮でもこれらの ER-stress マーカーの発現がある際には、まだ再生の余地がある可能性があり、治療介入の是非を判断するうえで新たな所見となるかもしれない。

今後は rat の腎移植拒絶モデルにおいて、拒絶反応によって尿細管間質が障害を受け、線維化が進行していく過程において、各マーカーの発現を染色だけでなく real time PCR や Simple Western を用いて定量化を行うことで、経時的な変化を確認することを検討している。

引用文献

- 1: Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant*. 2012 Feb;12(2):388-99.
- 2: Kobayashi A, Takahashi T, Horita S, Yamamoto I et al. Activation of the transcription factor c-Jun in acute cellular and antibody-mediated rejection after kidney transplantation. *Hum Pathol*. 2010 Dec;41(12):1682-93.
- 3: Kobayashi A, Takahashi T, Horita S, Yamamoto I et al. Clinicopathological impacts of activated transcription factor c-Jun in peritubular capillary endothelial cells in chronic antibody-mediated rejection after kidney transplantation. *Clin Nephrol*. 2012 Jan;77(1):32-9.
- 4: Cybulsky AV, Takano T, Papillon J, Khadir A, Liu J, Peng H. Complement C5b-9 membrane attack complex increases expression of endoplasmic reticulum stress proteins in glomerular epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002 Nov1;277(44):41342-51.

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
---------	---------