

研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2007 ～ 2009  
 課題番号： 19590967

研究課題名 (和文) 進行性腎疾患コホートにおける機能分子に関するプロテオーム解析

研究課題名 (英文) Molecular analyses in progressive renal diseases

研究代表者

横山 仁 (YOKOYAMA HITOSHI)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号： 50191531

研究成果の概要 (和文)：

腎炎・ネフローゼ症候群と移植腎疾患コホート (ネフローゼ症候群, ループス腎炎, 急速進行性腎炎症候群ならびに移植腎症) の経時的な臨床病理学的所見プロファイルを作成した. それぞれの疾患コホート症例の腎機能予後に関して, 前向き調査を実施し, 多変量解析により pauci-immune 型腎炎における組織適合抗原 HLA-DRB1 遺伝子型と発症との関連ならびに移植腎におけるアデポサイトカイン (高・中・低) 分子量ならびに HLA-G の慢性移植腎症への関与が確認された. また, 腎生検組織を用いた免疫組織学的検討により移植腎における組織線維化に先行した急性期に fibrocytes の浸潤と慢性期の線維化過程における血管周皮細胞 (pericytes) の関与を認めた.

研究成果の概要 (英文)：

We constructed prospectively the renal disease cohort including nephrotic syndrome (18 cases), lupus nephritis (33 cases), pauci-immune type rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN, 25 cases) and renal transplanted subjects (154 cases) since 2007. We found the correlation between the genetic background (HLA-DRB1\*090102) and the onset of pauci-immune type RPGN. We also revealed that the affects of lipids and total and high-molecular weight adiponectins, the non-classical HLA-G and the role of fibrocytes and pericytes in chronic allograft injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000円
2008年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
2009年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
総計	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円

研究分野：医歯薬学・内科系臨床医学・腎臓内科学 (腎臓学)

科研費の分科・細目：

キーワード：(1)腎臓病 (2)腎移植 (3)疾患コホート (4)サイトカイン (5)ケモカイン (6)組織適合抗原 (7)機能分子

1. 研究開始当初の背景  
腎糸球体ならびに間質障害におけるサイト

カイン・ケモカイン発現とこれらの発現と密接に関連するシグナル伝達分子(マップキナ

ーゼ (MAPK) ことに p38MAPK) に対する動物実験を用いた抗サイトカイン・ケモカイン療法の基礎的検討により、これら機能分子が腎障害進展予防の重要な治療標的分子であることを示した。さらに腎炎・ネフローゼ症候群の臨床病理学的検討により、ヒトにおいても臨床的な予後不良例において、かかる分子が発現していることを報告してきた。くわえて、腎疾患共通の進行因子として間質細胞診潤と線維化に関して特化した血管内皮細胞を有する High endothelial venule (HEV) 様血管が皮髄境界部分に存在することを指摘した。

今回、難治性ネフローゼ症候群・急速進行性腎炎症候群ならびに慢性移植腎症の疾患コホートを新たに作成し、発症ならびに進行時におけるケモカインとその受容体/細胞内シグナル伝達系とくに MCP-1/CCR2/p38MAPK, IP-10/CXCR3 ならびに HEV 様血管と関連する炎症・血管新生・線維化過程をヒト腎炎・腎症について解析する。これら因子の腎機能あるいは生命予後に対する影響について後向きならびに前向き調査により意義付けする。これと同時に、免疫抑制療法ならびに臨床的にステロイド抵抗性あるいは依存性ネフローゼ症候群における血漿交換あるいは活性化リンパ球の除去による免疫修飾治療を試み、ケモカイン/ケモカイン受容体のシグナル伝達機構を含めた一連の機能分子を新たな治療標的とした腎障害進展予防における分子制御の臨床応用の可能性を検討する。

## 2. 研究の目的

本研究においてはこれまで各種腎炎やネフローゼ症候群の進行性腎障害の病態ならびに移植腎症における免疫担当細胞の関与において推測されてきた各種の分子をプロテオミクスの技術を用いて網羅的に判別し、治療による予後改善と結びつく機能分子を臨床経過に基づき検出する。

## 3. 研究の方法

(1) 難治性ネフローゼ症候群・急速進行性腎炎症候群ならびに移植腎症の疾患コホート作成と解析：

①北陸地区において金沢医科大学ならびに関連施設において腎生検が実施された難治性ネフローゼ症候群、急速進行性腎炎症候群（半月体形成性腎炎）とくに pauci-immune 型腎炎ならびに移植腎症を対象とする疾患コホートに関して腎生検時の臨床病理所見を中心にプロファイルを作成する。

②作成したコホート症例のこれまでの臨床所見に関して、後向き調査を実施する。予後調査成績ならびに測定指標を用いた多変量解析を実施し、各因子の腎機能ならびに生命予後に関する解析を実施する。

③さらにコホート作成例と新たに追加された症例を含めて、登録時点からの前向き調査の対象とする。

(2) 臨床病理学的診断における細胞内シグナル伝達分子・免疫担当細胞ならびに病変部血管の意義：

①ヒト腎生検組織の病理ならびに免疫組織学的検討

作成したコホート症例における生検組織の糸球体ならびに間質病変に関して画像解析装置を用いたスコア化を実施する。さらに同一標本において特異的抗体を用いた免疫組織化学法により免疫担当細胞の浸潤を糸球体ならびに間質病変を中心に検討と同時に最近注目されている間質線維化と関連する circulating fibrocytes の浸潤とこの浸潤部位と考えられている L-selectin および High endothelial venule (HEV) 様血管の経時的変化を明らかとする。

②ヒト腎症における血清・尿中機能分子の経

## 時的測定

ヒト腎組織内における機能分子として non-classical HLA class I (HLA-G), アディポサイトカインを指標とした測定・解析とともにプロテオーム解析に関して以下の手法により, その経時的変化を臨床経過と対比して解析する.

プロテインチップシステム (サイファーゼン社) での血清測定スクリーニングに際しては, 陽イオン交換チップ (WCX), 陰イオン交換チップ (SAX), 金属イオンチップ (IMAC) を用いて塩濃度50mM, pH4, 6, 8の条件下で検索する.

等電点, 結合塩濃度: 蛋白質の等電点の決定にはWCXとSAMを用いてpH4-8 (0.2間隔) で検討する.

陰イオン交換チップと蛋白の結合性は塩濃度0-1000mMで検討する.

## 4. 研究成果

### (1) pauci-immune 型 (MPO-ANCA 関連) 腎炎と HLA-DR 分子の検討

コホートより抽出した MPO-ANCA 関連腎炎 (MPO-GN) 18 例 (男 9 例, 女 9 例; 年齢 48~87 歳; 観察期間 29~4790 日) において, 血清 MPO-ANCA 関連因子と遺伝的背景および臨床病理学的特徴について, 発症~治療開始までの期間・初診時の血清クレアチニン (sCr) 値・臨床学的重症度・HLA-DRB1 と腎予後について検討した (表 1).

表 1: RPGN 症例の背景因子

RPGN患者背景	全体	MPO-ANCA関連腎炎	抗GBM抗体型腎炎
症例	24例	18例	6例*
男:女	11:13	9:9	2:4
年齢(歳)	48-87(67.6)	56-87(71.8)	48-71(56.2)
全観察期間(日)	29-4790(1087.7)	29-4790(1061.3)	56-4060(1158.0)
発症~治療開始までの期間(日)	6-631(86.1)	14-631(104.0)	6-69(28.6)
MPO-ANCA(EU/ml)		297.8±350.0	
抗GBM抗体(EU/ml)			155.3±90.6
臨床所見スコア	3.1±1.9	3.4±1.9	2.0±1.7
治療開始時sCr(mg/dl)	4.84±3.73	4.50±3.48	5.88±4.62
治療法			
OCSのみ	1例	1例	0例
MP+OCS	14例	13例	1例
MP+OCS+IS	4例	4例	0例
MP+OCS+PE	1例	0例	1例
MP+OCS+IS+PE	4例	0例	4例

OCS: oral corticosteroid, MP: methylprednisolone pulse therapy, IS: immunosuppressive drugs, PE: plasma exchange. \*抗GBM抗体+MPO-ANCAの両者陽性2例を含む. mean±SD

MPO-GN の腎死例は 8 例であり, 治療開始時 sCr 値が高値であった. 本邦の顕微鏡的多発血管炎で報告されている HLA-DRB1\*090102 は, 今回検討した MPO-GN16 例中 10 例 (62.5%) で陽性であり, 特異度 0.86・陽性尤度比 4.54 であった (表 2).

表 2: HLA-DR の検出頻度

### MPO-ANCA関連腎炎のHLA-DRパターン

MPO-ANCA陽性例16例にHLA-DRB1

HLA-DRB1\*090102 陽性 10例 (62.5%)

#### ① 健常日本人との比較=Normal control

日本人のDRB1\*0901 頻度 13.6%

特異度 0.86

陽性尤度 4.54 (95%CI 2.93-7.03)

#### ② 石川県・福井県の透析患者との比較=Disease control

2004~2008年の石川県・福井県の新規腎移植希望登録者 67人

HLA-DRB1\*0901 陽性 15例 (22.1%)

特異度 0.78

陽性尤度 2.79 (95%CI 1.55-5.01)

HLA-DRB1\*090102 陽性例では, 発症から治療開始までの期間が短く, 最終観察時の sCr 値が低い傾向であった (表 3, 図 1).

表 3: HLA-DR と臨床背景

	HLA-DRB1*090102 陽性	陰性	p値*
症例	10例	6例	
男:女	5:5	3:3	
腎死	2例(20.0%)	4例(66.7%)	ns
個体死	1例(10.0%)	1例(16.7%)	ns
発症~治療開始までの期間(日)	14-161(58.8)	40-631(179.3)	0.073
全観察期間(日)	29-1599(737.1)	196-4790(1601.7)	ns
MPO-ANCA(EU/ml)	240.2±180.3	440.0±560.0	ns
臨床所見スコア	3.3±1.7	3.3±2.3	ns
治療開始時sCr(mg/dl)	3.74±3.96	4.81±2.91	ns
最終観察時sCr(mg/dl)	2.07±2.14	4.34±2.64	0.056
治療法			ns
OCS	1例		
MP+OCS	6例	5例	
MP+OCS+IS	3例	1例	
腎生検施行例	7例	4例	
半月体形成率(%)	30.9±19.1	45.5±29.4	ns
半月体+硬化糸球体率(%)	47.0±22.2	63.8±23.1	ns
尿細管萎縮率(%)	15.0±17.1	36.3±11.1	ns
間質線維化率(%)	10.0±7.6	40.0±18.3	0.012

OCS: oral corticosteroid, MP: methylprednisolone pulse therapy, IS: immunosuppressive drugs, PE: plasma exchange. \*: Statistics were analyzed by Mann-Whitney U test

MPO-ANCA陽性例のHLA-DRと腎予後

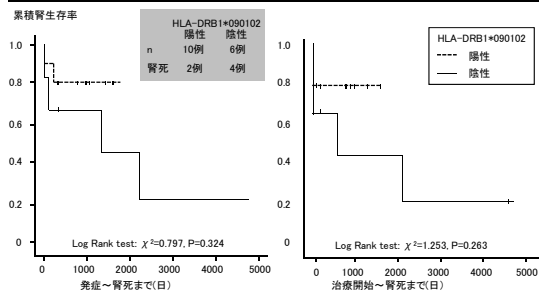


図 1: HLA-DR と RPGN の予後

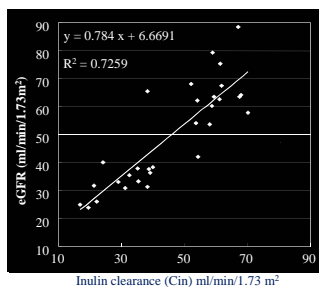
以上より MPO-GN において早期発見ならびに治療開始が腎予後を改善に重要であり、HLA-DRB1\*090102 が発症と臨床経過に関与する可能性が示唆された。

(2) 慢性移植腎障害におけるアデポネクチンの関与

慢性移植腎障害 (CAI) に対する脂質およびアデポネクチン (ADPN) の影響を検討する目的で、今回作成した cohort より金沢医科大学病院で腎移植し、その後3年以上生着するとともに sCr が 6mg/dl 以下の 99 例 (男性 65 例, 女性 34 例; 生体 80 例, 献腎 19 例) を抽出した。日本腎臓学会の糸球体濾過率の推算式 (194 式) を用いて 2004 年から 2008 年における推定 GFR (eGFR) の変化率に対する年齢, 性別などの移植時背景因子, Body mass index (BMI), 高血圧, 総 Cholesterol, LDL-C, HDL-C, 糖尿病および治療薬 (核酸合成阻害薬, カルシニューリン阻害薬, スタチン, 降圧薬, インスリンを含む血糖降下薬) と ADPN (総, 高・中・低分子) の関与について解析した。

なお, イヌリンクリアランスと eGFR (194 式) との対応を検討したところ正相関が認められた (図 2)。

Correlation between Cin and eGFR in renal transplanted patients  
eGFR for Japanese =  $194 \times Cr^{-1.994} \times Age^{0.287} \times 0.739$  (if female)



Cin was significantly correlated with eGFR calculated by the new 3-variable equation in randomly selected 30 transplant recipients ( $r = 0.852, p < 0.001$ ).  
eGFR is acceptable for discrimination of patients with CAI.

図2: 腎移植例におけるイヌリンクリアランスと eGFR (194 式) との相関

Renal survival rate (2004-2008)

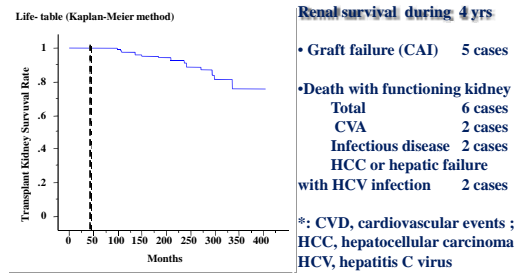


図3: 作成 cohort における移植腎生着率 (2004-2008)

観察開始時 eGFR は平均 47.1 ml/分/1.73m<sup>2</sup> であり, 4 年間の平均 eGFR 変化率は -1.7 ml/分/1.73m<sup>2</sup>/年であった。その移植腎予後に関して, Kaplan-Meier 法による腎生存率を図 3 に示す。血圧はほぼ全例で 140/90 mmHg 未満であり, 女性で LDL-C/HDL-C 比の低値と総 (高・中分子) ADPN の高値を認めた。総 (高分子) ADPN と LDL-C/HDL-C 比, BMI および eGFR は逆相関を示した。また, eGFR 変化率に対して献腎移植が改善因子, 観察開始時 eGFR と総 (高分子) ADPN が低下促進因子として抽出された。

表 4: 移植腎機能の予後推算モデル

Table: Construction of the estimated equation for the decline in eGFR

Model 1	B	SE	beta	t	p
(Constant)	-3.748	2.936	-	-1.276	0.205
Donor cadaver/living	2.138	0.774	0.236	2.763	0.007
Statins (yes: 1)	1.423	0.632	0.191	2.250	0.027
LDL-C/HDL-C ratio >2.0 (yes: 1)	-2.543	0.673	-0.342	-3.779	<0.001
BMI	0.273	0.112	0.208	2.446	0.016
eGFR at initial	-0.047	0.018	-0.226	-2.632	0.010
ADPN	-0.108	0.054	-0.184	-1.997	0.048

$$\Delta eGFR \text{ (ml/min/1.73m}^2 \text{ per year)} = -3.748 + 2.138 \times [\text{donor type}] \text{ (if cadaveric donor, 2; if living donor, 1)} + 1.423 \text{ (if treated by statin)} - 2.543 \text{ (if LDL/HDL ratio over 2.0)} + 0.273 \times [\text{BMI}] - 0.047 \times [\text{eGFR}] - 0.108 \times [\text{ADPN}] \text{ (} r=0.570, p<0.001 \text{)}$$

Model 2	B	SE	beta	t	p
(Constant)	-0.905	0.921	-	-0.983	0.328
Donor cadaver/living	1.481	0.774	0.286	3.106	0.002
eGFR at 2004	-0.039	0.011	-0.333	-3.565	0.001
High molecular weight ADPN	-0.124	0.057	-0.204	-2.187	0.031

$$\Delta eGFR \text{ (ml/min/1.73m}^2 \text{ per year)} = -0.905 + 1.481 \times [\text{donor type}] \text{ (if cadaveric donor, 2; if living donor, 1)} - 0.039 \times [\text{eGFR}] - 0.124 \times [\text{High molecular weight ADPN}]$$

BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; ADPN, adiponectin

これに基づき6項目（移植別，スタチン使用，LDL-C/HDL-C比2.0以上，BMI，観察開始時eGFR，総ADPN）および3項目（移植別，観察開始時eGFR，高分子ADPN）のeGFRの変化率に関する推測式を作成した（表4）。

以上より，CAIの進展においても，慢性腎臓病コホート研究で報告された総（もしくは高分子）ADPNの腎機能保護に対する逆説的な関連が認められた。

### （3）腎移植における非古典的 HLA クラス 1 分子・HLA-G の検討

HLA-G は非古典的 HLA クラス 1 分子であり，その発現は移植片の寛容と関連し，拒絶反応のエピソードが少ないとされている．日本人の腎移植における血清 HLA-G5 と予後との関連について今回作成した cohort の腎移植 154 例（生体腎移植 124 例，死体腎移植 30 例）を対象に検討した．血清 HLA-G5 値と臨床的急性拒絶反応および eGFR（194 式）を用いた変化率とを比較し，年齢，性別，虚血時間，HLA mismatch 数などの移植時背景因子，血圧，脂質および治療薬（核酸合成阻害薬，カルシニューリン阻害薬，スタチン）で補正した．血清 HLA-G5 値は 1.1-650.5U/mL であり，移植前より 3 ヶ月以上経時的測定しえた 15 例では，移植後 1-8 週で前値より低下し，12 週以後は前値に復した（図4）。

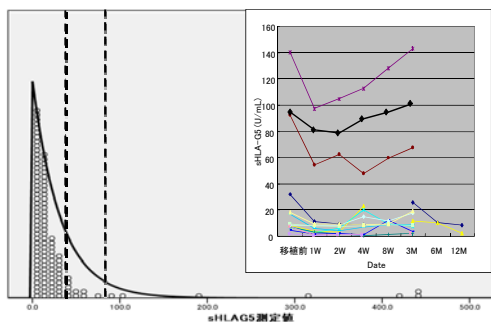


図4：血清 HLA-G 値と腎移植時の変動

血清 HLA-G5 高値群（55U/m 以上）では，臨床的急性拒絶反応が少ない傾向を示すとともに，測定時の sCr が低く，eGFR の変化率が軽度であった（図5）．また，eGFR 変化率に対して HLA-G5 は独立した腎保護因子（regression analysis, 標準化係数  $\beta$  0.168,  $p=0.038$ ）として抽出された。

さらに，移植腎生検において生着時に尿細管上皮細胞における HLA-G 発現の亢進が確認された。

以上より，日本人においても HLA-G5 の移植腎保護作用が示唆された。

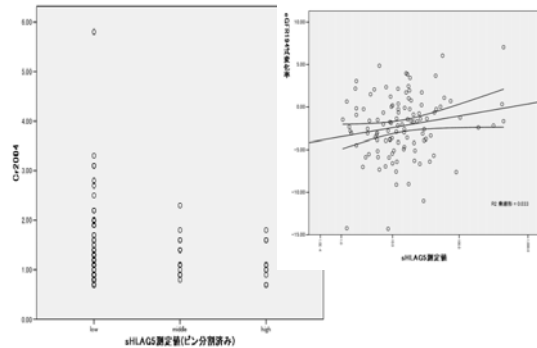


図5：血清 HLA-G レベルと腎移植時の血清クレアチニンおよび eGFR の変動

### （4）慢性移植腎障害における間質線維化の検討

今回作成した cohort より腎移植 36 例/71 検体（生体腎移植 24 例/51 検体，献腎移植 12 例/20 検体）を抽出し，移植腎間質線維化と fibrocytes の意義を検討した．さらに，今回の cohort 以外より同期間に腎生検を実施した 29 例/29 検体および手術時摘出腎 5 例/5 検体をそれぞれ病腎および正常の対照とした．なお，腎生検例では，糸球体病変 26 例であり，その内訳は IgA 腎症 9 例，ループス腎炎 3 例，巣状分節性糸球体硬化症 1 例，微小変化型ネフローゼ症候群(MCNS)2 例，膜性腎症 1 例，クリオグロブリン血症 2 例，メサングウム増殖性糸球体腎炎 1 例，糖尿病性腎

症 1 例, MPO-抗好中球細胞質抗体陽性血管炎 2 例, 膜性増殖性糸球体腎炎 2 例, 原発性アミロイドーシス 1 例, コレステロール塞栓症 1 例であった. 一方, 間質病変 3 例は, いずれも尿細管間質性腎炎(TIN)であった. これら 98 検体に関して間質内 fibrocyte 数(/200 倍視野), Masson Trichrome (MT) 染色平均面積(%), CD45 染色陽性面積(%), I 型膠原線維(Collagen type 1, COL1) 染色陽性面積(%) について臨床病理学的に検討した. また, 腎移植 11 例(献腎移植後無機能腎 1 例を含む)において経時的な推移(血管吻合前 0hr, 血流再開後 1hr, 移植後 2-4 週目, 4-8 週目, 1 年目以後)を解析した.

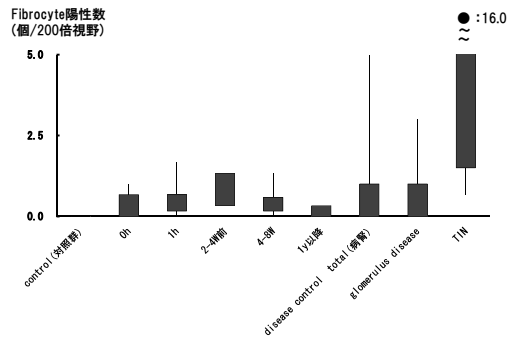


図6: 各種腎疾患におけるfibrocytes

間質内 fibrocyte 細胞数は 0-16 (平均 0.62) /200 倍視野であり, 慢性肉芽腫性間質性腎炎例 (16/200 倍視野) で著明であった (図 6) .

さらに, 間質内 fibrocyte 細胞数は CD45 染色 ( $r=0.453, p<0.01$ ) ならびに MT 染色 ( $r=0.199, p<0.05$ ) と正の相関を認めた. なお, MT 染色は COL1 染色 ( $r=0.468, p<0.01$ ) ならびに CD45 染色 ( $r=0.262, p<0.01$ ) と正の相関を認めた. 移植腎生着 10 例における間質内 fibrocyte は 0hr 平均 0.33, 1hr 平均 0.54 より 2-4 週目にピーク (平均 0.75) となり, その後 4-8 週目平均 0.42, 1 年目以後平均

0.41 へと低下した. 一方, 献腎移植後無機能腎では fibrocyte 陽性率は低く腎摘出時には検出されなかった.

さらに, 移植腎 11 例の尿細管周囲毛細血管部における線維化を電子顕微鏡にて Grade 0 から 3 に評価し, 各因子との相関を検討した. 全体の電顕スコアは  $1.32 \pm 0.78$  であり, COL1 染色 ( $r=0.79, P<0.01$ ) と正の相関 (図 7-A) を示した. さらに  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) 陽性とも正の相関傾向 ( $r=0.39, P=0.24$ ) (図 7-B). 一方, fibrocytes とは負の相関が認められた ( $r=0.51, P<0.05$ ) (図 7-C).

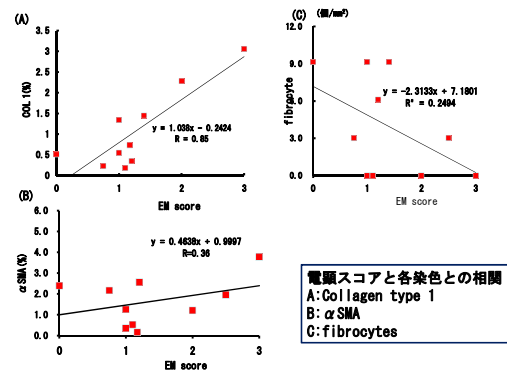


図7: 尿細管周囲線維化の電顕スコアとCOL1, fibrocytesおよび $\alpha$  SMA陽性との関連

これより移植腎生着例において虚血再還流障害によると考えられる一過性の fibrocytes の移植腎内への誘導が生じ, これによる腎間質線維化への一部関与が示唆された.

## 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 4 件)

- ① S.Matsuo, E.Imai, M.Horio, Y.Yasuda, K.Tomita, K.Nitta, K.Yamagata, Y.Tomino, H.Yokoyama, A. Hishida: Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan. Am. J. Kidney Dis. 53982-992, 2009. 査読有
- ② H.Yokoyama, et al: Biocompatibility and permeability of dialyzer membranes do not affect anemia,

erythropoietin dosage or mortality in Japanese patients on chronic non-reuse hemodialysis: a prospective cohort study from the J-DOPPS II study. *Nephron Clin. Pract.* 109: c100- c 108, 2008. 査読有

- ③ M.Asaka, H. Yokoyama et al: Ischemia-reperfusion injury as the leading cause of primary non-function in renal transplantation using donors with prolonged warm ischemic time. *Clin Transplant* 22(Suppl 19): 19-24, 2008. 査読有
- ④ Ishikawa I, Chikazawa Y, Saton K, Nakagawa M, Imamura H, Hayama S, Yamaya H, Asaka M, Tomosugi N, Yokoyama H, Matsumoto K: Proteomic Analysis of Serum, Outflow Dialysate and Adsorbed Protein onto Dialysis Membranes (Polysulfone and PMMA) during Hemodialysis Treatment Using SELDI-TOF-MS. *Am J Nephrol* 26:372-380, 2006. 査読有

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① H.Yokoyama: Statins preserved the function of transplanted kidneys under controlled blood pressure. Renal Week 2008 ASN's 41st Annual Meeting & Scientific Exposition. 2008.11.8 (Philadelphia)
- ② H.Yokoyama: Chronic allograft injury (CAI) as the aspect of chronic kidney disease (CKD). The 38<sup>th</sup> Annual Congress of the Korean Society for Transplantation & The 7<sup>th</sup> Korea-Japan Transplantation Forum. 2008.10.11 (Soul).

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 横山 仁, 他、中外医学社、Annual review 2010 : ヒト膜性腎症の原因抗原 : neutral endopeptidase と M-type phospholopase A2 receptor. 2010, 84-89 頁
- ② 横山 仁, 他、医学書院、専門医のための腎臓病学 第 2 版:膜性腎症. 2009, 333-343 頁

〔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 なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 仁 (YOKOYAMA HITOSHI)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 50191531

- (2) 研究分担者 なし  
(3) 連携研究者 なし