

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19591874

研究課題名 (和文) 献腎移植におけるグラフトバイオマーカーの開発

研究課題名 (英文) Clinical research for the development of graft biomarkers after kidney transplantation from donors after cardiac death

研究代表者

日下 守 (KUSAKA MAMORU)

藤田保健衛生大学 ・ 医学部 ・ 講師

研究者番号：40309141

研究成果の概要：我が国の献腎移植成績は短期ならびに長期においても世界に誇る良好な成績を報告しているが、移植後早期は、移植腎機能発現遅延に伴い平均約 2 週間の維持透析期間を必要とし、primary non-function とともに臨床上この間のレシピエント管理が極めて重要となる。DCD 腎における移植後変化は、一般的に組織学的特徴として急性尿細管壊死(ATN)に代表される腎機能発現遅延により引き起こされるが、発生機序はさまざまな要因を含み、確立した予防法がなく、移植腎の長期予後にも影響を及ぼし、慢性移植腎症(CAN)のリスクファクターとしても知られている。我々は動物実験と臨床検体の microarray 解析から共通の発現亢進遺伝子として分泌蛋白 NGAL(neutrophil gelatinase-associated lipocalin)、TIMP-1、REG1A、Lactotransferin、SLPI に注目した。移植腎機能回復のバイオマーカーとして尿ならびに血清中の NGAL 濃度を測定し、意義を検討した。NGAL の移植後の血清を用いた ELISA 解析では、移植前の血清 NGAL 値は 963 ± 33 ng/ml であり、生体腎移植例では移植後直ちに減少した。一方献腎移植症例では術後の NGAL 変化は二峰性を示し徐々に減少した。後半のピークを過ぎて数日で利尿が始まり移植腎機能は回復しはじめた。献腎移植における血清 NGAL 値の変化は無尿期における移植腎機能の回復を示すバイオマーカーの一つと考えられた。また、移植腎機能回復のバイオマーカーとして、血清中の TIMP-1 についても意義を検討したところ、生体腎移植症例では移植後も血清 TIMP-1 値は変化しなかった。一方献腎移植症例では、移植後長期に透析期間を要した症例で、移植後の peak TIMP-1 値が高く、immediate function であった症例では血清中の TIMP-1 値は上昇しなかった。移植後の peak TIMP-1 値と移植前の TIMP-1 値の差を検討したところ、移植後透析を要した期間と相関関係を示していた。NGAL(neutrophil gelatinase-associated lipocalin)と同様、移植後の血清 TIMP-1 値は、献腎移植における無尿期の移植腎機能の回復を示すバイオマーカーの一つと考えられ、本研究により、血清 NGAL 値と血清 TIMP-1 値の有効性を報告できた。本研究の成果の一部は、欧州移植学会ならびに国際移植学会で報告を行い、microarray 解析のデータと NGAL、TIMP-1 に関する研究の成果は、ともに Cell Transplantation に投稿し掲載された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成 20 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医師薬学 外科系臨床医学
科研費の分科・細目：泌尿器科学(7307)

キーワード：腎移植、バイオマーカー、心停止下献腎移植、慢性拒絶反応

1. 研究開始当初の背景

全世界的に深刻な臓器提供不足がさげばれる中、本邦における献腎移植は、未だほとんどが心停止ドナーからの腎提供(DCD)であり、移植臓器としては生体腎移植と比較して厳しい状況下で行われている。一般的にDCD腎からの腎提供においては移植後に移植腎機能が発現しない、いわゆるprimary non-functionが約5%存在することが知られている(Weber M, Dindo D, Demartines N, et al: Kidney transplantation from donors without a heart beat. N Engl J Med 347:248, 2006)。一方、本邦ならびに当施設からの報告は、DCD腎からの腎提供にもかかわらず、献腎移植成績は短期ならびに長期においても世界に誇る良好な成績を報告しているが、移植後早期は、移植腎機能発現遅延に伴い平均約2週間の維持透析期間を必要とし、primary non-functionとともに臨床上前述の間のレシピエント管理が極めて重要となる(Hoshinaga K, Shiroki R, Fujita T, et al: The fate of 359 renal allografts harvested from non-heart beating cadaver donors at a single center. Clinical Transplants 213, 1998)。DCD腎における移植後変化は、一般的に組織学的特徴として急性尿細管壊死(ATN)に代表される腎機能発現遅延により引き起こされるが、発生機序はさまざまな要因を含み、確立した予防法がなく、移植腎の長期予後にも影響を及ぼし、慢性移植腎症(CAN)のリスクファクターとしても知られている。

2. 研究の目的

献腎移植の臨床における大きな課題は、移植前にグラフトの活性が判断できる事。すなわち移植前にprimary non-functionに至るグラフトを除外することである。ついで移植後の無尿期におけるグラフトの回復状況の指標を確立することである。従来はグラフトの超音波検査やドップラー、レノシンチにより経過を見ていたが、最終診断は移植腎生検に頼らざるをえない。移植腎生検は移植患者にとって侵襲的な検査であり、判定までに時間を要し、病理医の実力により診断が左右される。本研究により上記の課題を成し遂げる、迅速

で簡便なバイオマーカーの開発が本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究期間に至るまでの準備段階として、マイクロアレイによるラット脳死腎移植モデルと献腎移植、生体腎移植各群を含む臨床検体を用いた遺伝子解析を行った。動物実験、臨床検体両者から得られた共通の変化を及ぼす遺伝子の比較検討により、今後検討を行うべき幾つかの有力な候補遺伝子を選別し絞込みを行う。献腎移植群においては、早期に移植腎機能を回復した群(immediate function)、移植後長期透析を要し回復した群に分類し、この各群間で発現が著しく異なる遺伝子を選別し、いわゆるdelayed graft function (DGF)の原因遺伝子群を探る。また、不幸にしてprimary non-functionであった症例についても、その責任遺伝子を探る。当院で行った献腎移植の臨床検体を蓄積し、マイクロアレイで有力となった遺伝子から、分泌蛋白を選別し、各々に対してELISA等による検査を行う。既知の分泌蛋白については、移植前から移植後、特に透析離脱までの期間で斬減あるいは斬増し、グラフトの回復、透析離脱までの指標となりうるバイオマーカーを検索する。血清中、尿中の経時的濃度変化を主にELISAを用いて解析するが、特に無尿期には血清を用いた検索が必要と考えられ、臨床サンプルを用いて経時変化を観察する。既知でない分泌蛋白については、これに対する特異的抗体作成を行い、生体内、細胞内での局在と生物活性について検討する。本研究期間内で、グラフト摘出時の腎盂尿、グラフトのviabilityとactivityを反映する血清分泌蛋白の検査法を確立し、臨床応用を目指す。

4. 研究成果

我々は動物実験と臨床検体のmicroarray解析から共通の発現亢進遺伝子として分泌蛋白NGAL, TIMP-1, REG1A, Lactotransferin, SLPIに注目した。移植腎機能回復のバイオマーカーとして尿ならびに血清中のNGAL濃度を測定し、意義を検討したところ。NGALの移植後の血清を用いたELISA解析

では、移植前の血清 NGAL 値は 963 ± 33 ng/ml であり、生体腎移植例では移植後直ちに減少した。一方献腎移植症例では術後の NGAL 変化は二峰性を示し徐々に減少した。後半のピークを過ぎて数日で利尿が始まり移植腎機能は回復しはじめた。献腎移植における血清 NGAL 値の変化は無尿期における移植腎機能の回復を示すバイオマーカーの一つと判断された (Kusaka et al. Cell Transplantation 2008)。また、移植腎機能回復のバイオマーカーとして、血清中の TIMP-1 についても意義を検討したところ、生体腎移植症例では移植後も血清 TIMP-1 値は変化しなかった。一方献腎移植症例では、移植後長期に透析期間を要した症例で、移植後の peak TIMP-1 値が高く、immediate function であった症例では血清中の TIMP-1 値は上昇しなかった。移植後の peak TIMP-1 値と移植前の TIMP-1 値の差を検討したところ、移植後透析を要した期間と相関関係を示した。NGAL と同様、移植後の血清 TIMP-1 値は、献腎移植における無尿期の移植腎機能の回復を示すバイオマーカーの一つと考えられ、本研究により、血清 NGAL 値と血清 TIMP-1 値の有効性を報告できた。

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 3 件)

1. Kusaka M., Kuroyanagi Y., Ichino M., Sasaki H., Maruyama T., Hayakawa K., Shiroki R., Kurahashi H., Hoshinaga K. Serum tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) predicts organ recovery from delayed graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. Cell Transplantation (in press)
2. Kusaka M., Kuroyanagi Y., Mori T., Nagaoka K., Sasaki H., Maruyama T., Hayakawa K., Shiroki R., Kurahashi H., Hoshinaga K. Global expression profiles in one hour biopsy specimens of human kidney transplantation from donors after cardiac death. Cell Transplantation 2009 (in press)
3. Kusaka M., Kuroyanagi Y., Mori T., Nagaoka K., Sasaki H., Maruyama T., Hayakawa K., Shiroki R., Kurahashi H., Hoshinaga K. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of organ recovery from delayed graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. Cell Transplantation 17 (129-134): 2008

[学会発表] (計 3 件)

1. Kusaka M., Kuroyanagi Y., Mori T., Nagaoka K., Sasaki H., Maruyama T., Hayakawa K., Shiroki R., Kurahashi H., Hoshinaga K. Global expression profiles in one hour biopsy specimens of human kidney transplantation from donors after cardiac death. XXII International Congress of the Transplantation Society. August 10 -14 2008 Sydney Australia
 2. Kusaka M., Kuroyanagi Y., Ichino M., Sasaki H., Maruyama T., Hayakawa K., Shiroki R., Kurahashi H., Hoshinaga K. Serum tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) as a predictor of organ recovery from delayed graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. XXII International Congress of the Transplantation Society. August 10 -14 2008 Sydney Australia
 3. Kusaka M., Kuroyanagi Y., Mori T., Nagaoka K., Sasaki H., Maruyama T., Hayakawa K., Shiroki R., Kurahashi H., Hoshinaga K. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of organ recovery from delayed graft function after kidney transplantation applying donation after cardiac death. 13th Congress of the European Society for Organ Transplantation. September 29 - October 3 2007 Prague, Czech Republic
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
日下 守 (KUSAKA MAMORU)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号: 40309141
- (2) 研究分担者
星長 清隆 (HOSHONAGA KIYOTAKA)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号: 30229174
白木 良一 (SHIROKI RYUICHI)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号: 70226330
早川 邦弘 (HAYAKAWA KUNIHIRO)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号: 00198821
畔柳 陽子 (KUROYANAGI YUKO)
藤田保健衛生大学・医学部・研究補助員
研究者番号: 60449460
- (3) 連携研究者
なし