

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592452

研究課題名(和文) 移植腎の予後(線維化)を早期に決定づける因子の解明と診断への応用

研究課題名(英文) Investigation and clinical application of early critical factors in determining long-term prognosis (fibrosis) of kidney graft after transplantation

研究代表者

力石 辰也(Chikaraishi, Tatsuya)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80261303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：近位尿細管上皮(PTE)のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-9発現は尿細管泡沫状変性に伴って上昇することから、急性CNI毒性を早期に検出する指標となることが判明した。腎移植患者の血清中MMPsレベルは移植腎の状態を反映し、尿中MMP-9は炎症に伴い上昇する傾向があった。マウス腎障害モデルでは、尿細管障害に伴って発現が低下するMMP-9と増大するMMP-9が共存する結果を示した。回復可能な尿細管障害では潜在型MMP-9の発現が一過性に増強するが、腎線維化につながる急性拒絶では活性型が強発現し、その持続発現と線維化の進行にPTEへの炎症細胞浸潤が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Matrix metalloproteinase (MMP)-9 immunoreactivity in proximal tubule epithelium (PTE) of human renal allografts was increased in biopsies when the PTE was damaged. This expression was consistently observed in vacuolized PTE, which implies the MMP-9 expression as a sensitive marker of acute calcineurin inhibitor toxicity. The levels of serum MMPs fluctuated with the allografts condition, and urine MMP-9 had a tendency to increase with inflammation. In mouse models induced renal damage, both increasing and decreasing MMP-9 expression were concurrently observed in renal tubules. Immunostaining using anti-MMP-9 antibodies with different epitopes showed that the latent pro-MMP-9 participated in the reversible pathogenesis of acute tubular injury; however, the active MMP-9 involved in the persistent irreversible expression in acute rejection that often causes interstitial fibrosis, suggesting the association of MMP-9 in inflammatory cell infiltration into PTE and in progression of fibrosis.

研究分野：腎移植

キーワード：腎移植 マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-9 尿細管上皮 腎線維化 上皮 間葉移行(EMT)

1. 研究開始当初の背景

移植腎機能障害の原因は、拒絶反応をはじめとした移植手術関連の原因、尿路合併症、循環動態、薬剤性障害、原疾患、感染症など多岐にわたり、結果として腎の線維化を引き起こす。腎間質に線維化が生じるとそれを食い止めるのは非常に困難で、慢性腎不全への進行を阻止する治療法は今のところ存在しない。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から上皮間葉移行 (EMT) を経て線維化の経過をたどるとされている。

我々はこれまでに移植腎生検組織の免疫染色により、EMT 関連因子の 1 つである MMP-9 が、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見出した (Kitajima, Chikaraishi et al, Clin Transplant, 2011)。さらに、カルシニューリンインビター (CNI) 毒性や阻血再灌流などによる一過性の障害では、近位尿細管で増強した MMP-9 の発現は、尿細管上皮の傷害が改善すると健康レベルまで低下 (可逆的発現) するのに対し、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 (非可逆的発現) する例が多いことを明らかにした。

これらの研究結果より我々は、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-線維化がおこる指標になると考えている。ごく早期の障害から EMT・線維化まで一貫して MMP-9 が関与していることが示唆されているものの、尿細管障害が治癒した後も MMP-9 の発現が持続している場合と正常レベルに戻る場合があるのはなぜかについては説明がついていない。その解明のためには EMT の可逆性を規定する鍵となるマーカーを検索、同定することが必須で、そのマーカーと MMP-9 を組み合わせて指標とすることが予後を予測する上で有用であると考えられる。

2. 研究の目的

臨床検体 (移植腎生検)、動物モデル (実験的腎線維化モデル)、培養細胞 (尿細管上皮細胞) の 3 種類の実験系を用いて、様々な障害程度

の腎組織における、形態・免疫染色性・EMT 関連遺伝子およびタンパク発現の変化を検討し、以下の目標の達成を目指す。

(1) 腎機能の予後 (線維化) を予測するマーカーとしての MMP-9 の有用性を検証する。

(2) EMT を介した腎線維化過程における可逆的な反応段階と、それを制御できる因子を特定する。

(3) MMP-9 ならびに同定した上記の因子を用いて、腎線維化を鋭敏に検出できる診断法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 移植腎病理標本における CNI 腎毒性の評価

74 症例 155 回の移植腎生検に対して MMP-9 の免疫染色を行い、さらに病理所見より CNI 腎障害に特徴的とされる細動脈硝子様変化 (AH) および尿細管上皮細胞の泡沫状変性 (VAC) の有無を評価した。

(2) 腎移植患者の血清中 MMP ならびに TIMP の測定

生体腎移植手術を受けた患者 16 症例より、術前と術後安定期および腎機能悪化時に血清ならびに尿を採取し、MMP-1, 2, 9 と TIMP-1, 2 をマルチプレックスアッセイ (Luminex 200) により同時に定量し、臨床パラメータとの関連を解析した。

(3) in vivo 腎障害モデルの作製

ラット腎動脈阻血再灌流モデル (一過性腎障害のモデル) と マウスの片側尿管結紮 (UUO) モデル (実験的水腎症・腎線維化モデル) を作製し、血清、尿、腎組織の一部を凍結保存するとともに、腎組織のパラフィン組織切片を作製した。

(4) in vivo 腎障害モデルにおける免疫組織学的検討

MMPs およびその阻害因子 (TIMP-1, 2)、各種組織マーカー (上皮系 / E-cadherin・-catenin、間葉系 / -SMA・vimentin、増殖マーカー / Ki-67、など) の抗体を用いた免疫染色により、腎障害発生後に生じる各種因子の発現を経時的に検討した。

(5) 腎障害組織における MMP-9 の存在様式 (潜在型・活性型・中間型) の識別

免疫原の異なる 4 種類の抗 MMP-9 抗体を用いてマウス UUO モデルの腎および移植腎生検組織を免疫染色した。また各種組織マ-

カー (E-cadherin, Vimentin, -catenin, -SMA 他) 抗体を用いて線維化の進行を免疫組織学的に評価した。

4. 研究成果

(1) 移植腎病理標本における CNI 腎毒性の評価結果

全標本中 AH が 17 例 (10.9%)、VAC が 8 例 (5.1%)、両者の併存が 4 例 (2.6%) あった。VAC を呈した近位尿細管上皮では全例で MMP-9 の発現が最高スコアを示し、有意な関連を認めた ($p=0.0011$) (Table 1)。以上より、移植腎生検の近位尿細管上皮における MMP-9 の発現は VAC に伴い上昇することから、CNI による尿細管障害を早期に検出できる指標の 1 つとなることが判明した。

Table 1. 病理学的 CNI 腎毒性と臨床データ

	生検数	生検時期 (月)	MMP-9 スコア	血清 Cr 値
CNI 腎毒性 (-)	133	5.9±12.5	1.9±0.9	1.7±0.8
CNI 腎毒性 (+)	22	10.3±14.6	2.3±0.9	1.6±0.8
尿細管泡沫状変性 (VAC)	8	4.4±4.6**	3**	1.9±1.0
細動脈硝子様変化 (AH)	17	11.8±15.6	2.1±0.9	1.5±0.6
尿細管間質線維化 (IF/TA)	10	14.9±17.2	2.3±0.8	1.9±0.9

** $p<0.001$

(2) 腎移植患者における血清、尿中 MMP と TIMP の定量結果

血清中においては術後に MMP-1 と 2 は高く、MMP-9 は低くなっていた。一方 TIMP-1 と 2 は術後に高くなる傾向を示した (Fig.1)。また術前 s-Cr に対し MMP-9 は負の相関 ($r=-0.546$, $p=0.0286$) を、TIMP-1 は正の相関 ($r=0.748$, $p=0.0009$) を認めた。さらに術後日数と TIMP-1 には負の相関 ($r=-0.637$, $p=0.0080$) を認めた。s-Cr 上昇を認めたエピソード時には TIMP-1 は著明に上昇し、安定期に低下する傾向であった。以上より、腎移植後の血清中 MMPs と TIMPs は移植腎の状態を反映してそのレベルが変化することが示唆された。

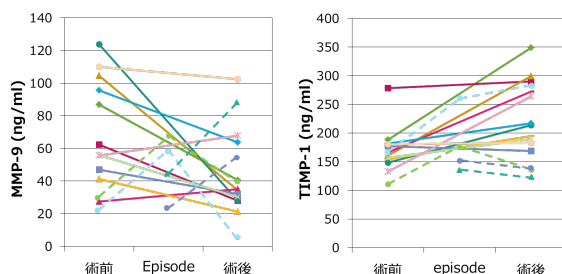


Fig.1 手術前後の MMP-9 および TIMP-1 の個人内変動

また、腎移植患者の尿中 MMP-9 レベルは、移植後の炎症性変化に伴って上昇する傾向が見られた。

(3) in vivo 腎障害モデルにおける免疫組織学的検討結果

尿細管上皮における間葉系マーカーの発現は障害が強くなるにつれて増大し EMT の進行を示す結果となった。一方、腎組織に存在する MMP-9 は、動物実験により正常コントロールとの詳細な比較と腎組織全体の観察が可能になったことにより、尿細管の部位によって発現様式が異なることや、正常性を失うことにより発現が低下するタイプと障害に伴って発現が増大するタイプが共存している可能性などが新たに示唆された。

(4) 腎障害組織における MMP-9 の存在様式の識別

MMP-9 の N 末端配列を免疫原とする抗体 (92 k Da 潜在性 proMMP-9 のみを認識) は、その他の抗体 (proMMP-9 と 84 k Da 活性型 MMP-9 の両方を認識) と異なる免疫染色性を示した (Fig.2)。

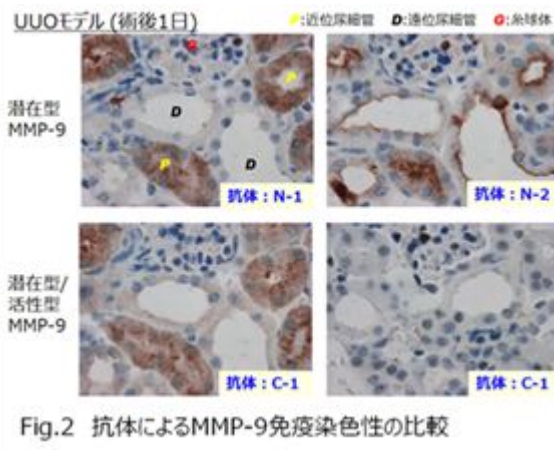


Fig.2 抗体による MMP-9 免疫染色性の比較

proMMP-9 はマウス UUO モデルにおいては健全な近位尿細管上皮 (PT) に発現 (+) し、尿細管障害の進行に伴って発現が低下した ($\pm/-$) (Fig.3)。

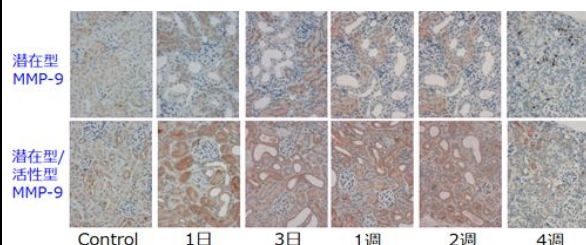


Fig.3 マウス UUO 後の腎における MMP-9 発現の経時的変化

移植腎生検では、proMMP-9 は CNI 腎症において強発現(++)し、急性拒絶では発現が低下(±/-)していた。一方、活性型 MMP-9 の発現は、CNI 腎症で低く、急性拒絶とくに尿細管炎(T細胞浸潤)を伴い、線維化が進行し始めた組織で強く持続的に発現していることが示された。

以上より、回復可能な尿細管障害では定常的な proMMP-9 の発現が一過性に増強するのに対し、急性拒絶では活性型 MMP-9 が強発現し、その持続発現と線維化の進行に炎症細胞の近位尿細管上皮内への浸潤が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計3件)

Kitajima Kazuki, Nozawa Shiari,
Yoshiike Miki, Sasaki Hideo,
Nakazawa Ryuto, Koike Junki, Takagi
Masayuki, Chikaraishi Tatsuya:
Increased matrix metalloproteinase-9
immunoexpression in proximal
tubular epithelium as an early
sensitive marker for subclinical
calcineurin inhibitor nephrotoxicity.
American Urological Association 2013
annual meeting. (SanDiego (USA)),
2013.5.8

中澤龍斗、吉池美紀、野澤資亜利、北島
和樹、佐々木秀郎、宮野佐哲、佐藤雄一、
力石辰也、柴垣有吾、木村健二郎：腎移
植患者における血清中MMPとTIMPの
変動の検討．第46回日本臨床腎移植学
会．東京ベイ舞浜ホテル(千葉県舞浜市)
2013.1.30

北島和樹、小池淳樹、野澤資亜利、吉池
美紀、中澤龍斗、佐々木秀郎、力石辰也：
移植腎尿細管上皮細胞におけるMMP-9
の免疫組織学的検討 - CNI 腎障害 - .第
24回日本移植学会総会．愛知県産業労
働センター(愛知県名古屋市)2012.9.21

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

力石 辰也 (CHIKARAISHI, Tatsuya)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：80261303

(2) 連携研究者

佐々木 秀郎 (SASAKI, Hideo)
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号：30386990

野澤 資亜利 (NOZAWA, Shiari)
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号：40167573

吉池 美紀 (YOSHIIKE, Miki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員
研究者番号：60398964