

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791061

研究課題名(和文)鉄が誘導するアポトーシスに着目した肉眼的血尿を伴う急性腎傷害の病態解明

研究課題名(英文) Pathophysiology and mechanism of macrohematuria-related acute kidney injury in IgA nephropathy

研究代表者

貝藤 裕史(Kaito, Hiroshi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60457067

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)：本研究は、IgA腎症患者における肉眼的血尿に伴う急性腎障害(AKI)の原因究明を目的としたものである。AKIの主原因が血尿に含まれる鉄であるとの仮説をたて検討を開始した。まず肉眼的血尿を伴うAKI症例の腎生検組織を用いて、その変化を光学顕微鏡で精査した。糸球体病変はいずれも軽度で、病変の中心は尿細管領域であった。次にAKI発症前後の組織を用いて鉄染色を行った。発症前には鉄陽性組織がほぼなかったのに対し、発症後には尿細管細胞内に有意に陽性像を確認できた。さらに尿細管培養細胞を用い、鉄の主要成分が実際に細胞死をもたらすことを確認した。

研究成果の概要(英文)：My purpose of this project was to clarify the pathophysiology and mechanism of macrohematuria-related acute kidney injury. I first hypothesized that it would be the iron, which was the main source of red blood cells and hematuria, that directly resulted in acute kidney injury. Kidney biopsy samples from patients with hematuria-related acute kidney injury showed that the main site of involvement was the renal tubular epithelial cells, which was consistent with the previous reports. In iron staining, kidney tissues with acute kidney injury had significantly more positive cells than that before kidney injury. I could confirm with the human renal tubular epithelial cell line that hemin, the chief component of hemoglobin, could induce apoptosis of renal epithelial cells.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：急性腎不全 IgA腎症 鉄 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は最も頻度の高い慢性糸球体腎炎であり、成人 IgA 腎症の 20-50%が、また小児 IgA 腎症のおよそ 10%が末期腎不全に至る予後不良な疾患である。肉眼的血尿は小児 IgA 腎症においてしばしば経験される合併症で、肉眼的血尿時に急性腎障害(MH-AKI)を発症することが報告されてきた。これに加え、AKI を発症したうちのおよそ 4 分の 1 の症例では慢性腎臓病へと進行し、さらにそのうちの一定の症例は末期腎不全へ移行することが近年明らかとなった。

MH-AKI の主病態は急性尿細管障害であると考えられている。腎組織学的所見で、赤血球円柱による尿細管閉塞の関与が推察されることがその根拠のひとつとされるものの、全尿細管の完全閉塞が認められるわけではない。組織所見から腎障害機序のすべてを説明できる事象とは言えず、病態の系統的な説明にはいたっていない。

我々は MH-AKI の主要因は赤血球内に含まれる鉄であるとの仮説をたてた。鉄の過剰な沈着が細胞障害をきたすことは肝臓などを用いた研究からすでによく知られている。肝臓では細胞内の鉄イオンが過剰に上昇すると、アポトーシスやネクローシスを招くというものである。アポトーシスは他の病態に伴う AKI の原因となりうることもすでに報告されていることもあわせ、MH-AKI における鉄の動態あるいはアポトーシスの関与について検討を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下に示すとおりである。

- (1) IgA 腎症における MH-AKI と鉄との関連性を明らかにする。
- (2) IgA 腎症における MH-AKI とアポトーシスとの関連性を明らかにする。
- (3) IgA 腎症における MH-AKI の発症機序に鉄および鉄により誘導されるアポトーシスの関与があるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MH-AKI 症例の解析

MH-AKI 発症時に腎組織学的検査を行った IgA 腎症症例とし、その臨床的背景および病理組織所見について後方視的検討を行う。

(2) 腎組織学的解析

急性腎障害の既往を有さない IgA 腎症患者の腎生検組織を対照とし、MH-AKI 症例の腎組織

を用いて鉄染色を行う。

(3) 培養細胞による解析

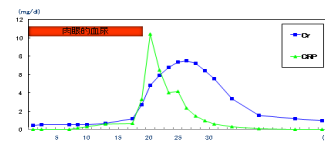
ヒト近位尿細管上皮培養細胞(HK-2 細胞)に Hemin を添加した培養液を使用し、アポトーシスの有無について解析する。

4. 研究成果

(1) MH-AKI 症例の解析

MH-AKI を呈した IgA 腎症患者の臨床経過の一例を以下に示す。肉眼的血尿と浮腫を主訴に受診し入院となった。肉眼的血尿から 20 日後から血清クレアチニン値が急激に上昇した。腎生検後ステロイドパルス療法による治療を速やかに開始したところ、血清クレアチニンは頂値 7.2mg/dl から徐々に低下し、MH-AKI 発症前と同レベルにまで改善した。以後もステロイドの内服を中心とした多剤併用療法を継続したところ、腎機能の再増悪は認められなかった。

経過



本症例をはじめ、本研究では MH-AKI の小児例 5 例につき病理組織所見の解析を行った。いずれの症例も光学顕微鏡所見はメサンギウム増殖性腎炎であり、また免疫染色ではメサンギウム領域に IgA の有意な沈着が認められたことから典型的な IgA 腎症であった。糸球体は他の IgA 腎症に比して特筆すべき所見はなく、いずれの症例も軽度のメサンギウム細胞増殖を認める程度であった。赤血球による糸球体係蹄の閉塞や管内増殖性病変などはないか、あってもごく軽度でこれらの所見も IgA 腎症の典型例から逸脱するものではなかった。

尿細管および間質領域では、近位尿細管上皮細胞の脱落・変性や間質浮腫を認めた。これらの所見は IgA 腎症に必須のものとはいえず、一方で他の病因による AKI でも認められる所見であることから、MH-AKI の主要因は糸球体ではなく尿細管間質病変であると考えられた。

小児 MH-AKI 症例の臨床経過あるいは腎病理学的解析の報告は世界的にみてもまだ少数である。MH-AKI の主要因が尿細管間質病変であるとの結果は過去の報告と一致するもので、小児 MH-AKI 症例でもその原因は成人と同様である可能性が高い。

(2) 腎組織学的解析

保存検体を入手できた MH-AKI の 3 症例について腎組織学的解析を行った。鉄染色の結果を以下に示す。対照は急性腎障害の既往を有さない小児 IgA 腎症(対照 1・10 症例)と、血尿を有さない小児ネフローゼ症候群(対照 2・10 症例)である。対照 1 では 3 症例に鉄染色陽性像が確認できたが、いずれも尿細管腔内であった。一方 MH-AKI の 3 症例はいずれも近位尿細管上皮細胞内に陽性像が確認された。対照 2 には鉄染色陽性像を呈するものはなかった。MH-AKI 症例 3 症例中 2 症例では MH-AKI 発症前にも腎生検がなされていたことから、それらの検体についても同様に鉄染色を施行したところ、やはり対照 1 と同様、尿細管腔のみに陽性像が確認された。つまり、尿細管上皮細胞内の鉄染色陽性所見は MH-AKI にのみ認められたことから、MH-AKI の発症には細胞内の鉄が何らかの影響を与えている可能性が示唆される。しかしながらその一方で、MH-AKI 症例においても鉄陽性像は決して多いものではなく、陽性像が確認されない尿細管上皮細胞にも変性あるいは脱落所見がみられたことから、細胞内の鉄そのものが MH-AKI の発症に直接関与しているかどうかは組織学的に明らかにすることはできなかった。これは臨床検体を用いた研究の限界であると考えられる。

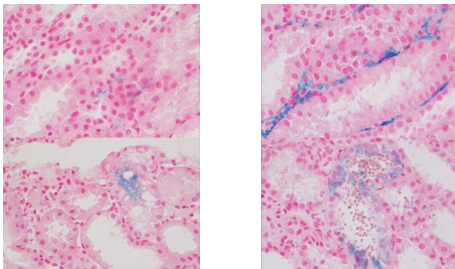


図 鉄染色(左・MH-AKI 発症前、右・MH-AKI 発症後)

MH-AKI とマクロファージの関連を示唆する報告があることから、次にマクロファージ染色を行った。結果の一部を下に示す。MH-AKI 症例では抗 CD163 抗体陽性を呈する近位尿細管上皮細胞が認められるとの過去の報告であったが、今回の検討では近位尿細管上皮細胞の変性・脱落あるいは鉄染色陽性と、CD163 陽性との間に明らかな相関は認められなかった。

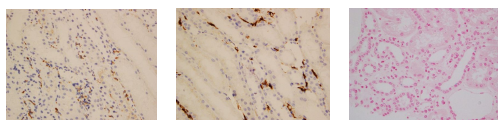


図 マクロファージと鉄染色(左から CD68、CD163、鉄染色)

(3) MH-AKI におけるアポトーシスの関与次にヒト近位尿細管培養細胞(HK-2 細胞)を用いて、実際に鉄が尿細管細胞に対しアポトーシスを誘導するかどうかを検討した。赤血球ヘモグロビンに多く含有される Hemin を種々の濃度で培養液に添加した後、Annexin V 染色を用いてアポトーシスの有無につき評価を行った。Hemin の添加量および培養時間は他の培養細胞における過去の実験を参考に計画した。しかしながら近位尿細管細胞に対する Hemin の毒性は予想以上に強く、ごくわずかな添加量でも速やかに(添加後 1 時間)Annexin V 陽性細胞が多数出現した。Hemin が近位尿細管培養細胞に対しアポトーシスを誘導することが明らかとなったため、次に予定していたアポトーシス経路の同定実験を試みるべく Hemin の添加量および実験時間の検討を続けた。しかし検討した範囲においてはアポトーシス誘導までの時間はきわめて短時間で、アポトーシス関連蛋白 mRNA の発現に関して安定した結果を得るにいたらなかった。

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 11 件)

- 1: Shima Y, Nakanishi K, Hama T, Sato M, Mukaiyama H, Togawa H, Tanaka R, Kaito H, Nozu K, Iijima K, Yoshikawa N. Biopsy timing and Oxford classification variables in Childhood/Adolescent IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 2014 Jun 7. [Epub ahead of print], 査読あり
- 2: Oka M, Nozu K, Kaito H, Fu XJ, Nakanishi K, Hashimura Y, Morisada N, Yan K, Matsuo M, Yoshikawa N, Vorechovsky I, Iijima K. Natural history of genetically proven autosomal recessive Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2014 Mar 15. 査読あり
- 3: Kamei K, Okada M, Sato M, Fujimaru T, Ogura M, Nakayama M, Kaito H, Iijima K, Ito S. Rituximab treatment combined with methylprednisolone pulse therapy and immunosuppressants for childhood steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2014 Jul;29(7):1181-7. 査読あり
- 4: Hashimura Y, Nozu K, Kaito H, Nakanishi K, Fu XJ, Ohtsubo H, Hashimoto F, Oka M, Ninchoji T, Ishimori S, Morisada N, Matsunoshita N, Kamiyoshi N, Yoshikawa N, Iijima K. Milder clinical aspects of X-linked Alport syndrome in men positive for the collagen IV 5 chain. *Kidney Int*.

- 2014 May;85(5):1208-13. 査読あり
- 5: Kaito H, Ishimori S, Nozu K, Shima Y, Nakanishi K, Yoshikawa N, Iijima K. Molecular background of urate transporter genes in patients with exercise-induced acute kidney injury. *Am J Nephrol.* 2013;38(4):316-20 査読あり
- 6: Ishimori S, Kaito H, Matsunoshita N, Otsubo H, Hashimoto F, Ninchoji T, Nozu K, Morisada N, Iijima K. SLC26A3 gene analysis in patients with Bartter and Gitelman syndromes and the clinical characteristics of patients with unidentified mutations. *Kobe J Med Sci.* 2013 Apr 18;59(2):E36-43. 査読あり
- 7: Kamei K, Ogura M, Ishimori S, Kaito H, Iijima K, Ito S. Acute kidney injury after acute gastroenteritis in an infant with hereditary hypouricemia. *Eur J Pediatr.* 2013 May 8. [Epub ahead of print] 査読あり
- 8: Shima Y, Nakanishi K, Hama T, Mukaiyama H, Togawa H, Sako M, Kaito H, Nozu K, Tanaka R, Iijima K, Yoshikawa N. Spontaneous remission in children with IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 2013; 28:71-6. 査読あり
- 9: Hashimoto F, Nishiumi S, Miyake O, Takeichi H, Chitose M, Ohtsubo H, Ishimori S, Ninchoji T, Hashimura Y, Kaito H, Morisada N, Morioka I, Fukuoka H, Yoshida M, Iijima K. Metabolomics analysis of umbilical cord blood clarifies changes in saccharides associated with delivery method. *Early Hum Dev.* 2012 Nov 21. doi:pii: S0378-3782(12)00268-X. 10.1016/j.earlhumdev.2012.10.010. [Epub ahead of print] 査読あり
- 10: Hama T, Nakanishi K, Shima Y, Mukaiyama H, Togawa H, Tanaka R, Hamahira K, Kaito H, Iijima K, Yoshikawa N. Renal biopsy criterion in children with asymptomatic constant isolated proteinuria. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27:3186-90. 査読あり
- 11: Shima Y, Nakanishi K, Hama T, Mukaiyama H, Togawa H, Hashimura Y, Kaito H, Sako M, Iijima K, Yoshikawa N. Validity of the Oxford classification of IgA nephropathy in children. *Pediatr Nephrol.* 2012 May;27:783-92. 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

1:石森真吾、貝藤裕史、他 肉眼的血尿に伴う急性腎障害を発症したIgA腎症の1例、日本小児腎不全学会、2013年9月13日、磐梯熱海温泉 ホテル華の湯(福島県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

貝藤裕史 (KAITO, Hiroshi)