

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350559

研究課題名(和文) 移植腎傷害早期診断バイオマーカーとしての尿中L-FABPの前臨床研究

研究課題名(英文) Preliminary study of urinary L-FABP as early diagnostic biomarker for renal allograft injury.

研究代表者

片山 泰章 (Katayama, Masaaki)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：70436054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)はヒトのみでなくネコの尿再管細胞質内においても発現が認められた。L-FABPの発現は腎機能とは明らかな関連性は認められなかった。腎組織への虚血再灌流傷害時や腎移植における急性拒絶反応発症時に腎機能低下所見が認められる前に尿中へ分泌されることが示唆された。L-FABPは腎機能の傷害度を示すマーカーというよりはむしろ機能低下予測マーカーとして機能する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Expression of the L-typed fatty acid binding protein (L-FABP) was confirmed in feline kidney tissue, especially within renal tubular cells, as well as human. In feline kidney tissue samples, expression of L-FABP was not significantly related to the kidney function. In kidney ischemia/reperfusion injury and acute kidney rejection models, L-FABP was appeared in tubular cavities before the increase of serum creatinine. L-FABP may play a role as a biomarker for predicting impairment of renal function rather than for expressing kidney damages.

研究分野：獣医外科学

キーワード：腎移植 虚血再灌流傷害 L-FABP

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトにおける腎移植の成績は近年飛躍的に向上している。これは主に免疫抑制治療の進歩によるところが大きい。急性拒絶反応の発症率は10~20%と報告されているが、有効なレスキュー治療の出現により移植腎の喪失を回避することは可能となった。しかしながら、ひとたび急性拒絶反応が発症すると移植腎の尿細管および糸球体へのダメージが大きく、移植腎機能へ悪影響を及ぼすことは避けられないので、移植腎を長期生着させるためには急性拒絶反応による腎傷害の発症を可能な限り早期に発見する必要がある。現在、急性拒絶反応は移植腎の腫脹、尿量の減少、血清クレアチニン値の上昇等の所見から診断されているが、これらの評価項目は事後報告的なものであり腎傷害早期診断マーカーとしての診断感度は非常に低いものと言わざるを得ない。また、ヒトの腎移植では免疫抑制療法の中心的薬剤であるカルシニューリン阻害剤による腎毒性が報告されている。ヒトにおいてはこの種の薬剤の安全閾値が比較的低いため、血中濃度が上昇した場合には輸入細動脈の攣縮による糸球体濾過量(GFR)の低下が起こり、その結果、急性あるいは慢性的腎毒性が認められ、移植腎の機能低下を引き起こす。このため、可能な限り低侵襲で簡便な移植腎の早期傷害診断マーカーの確立が必要課題となっている。

腎移植は、末期慢性腎不全を呈したネコに対する有効な治療オプションとして確立されている。移植手術ではドナーから摘出した移植用腎を生理食塩水で灌流した直後にレシピエントに移植するのが一般的である。しかし、代表者はネコの自家腎移植モデルで生理食塩水は臓器保護・保存効果に乏しいため、術後に移植腎の機能遅延が起こることを確認している。また、ネコの臨床腎移植では、急性拒絶反応の発症率は20%と報告されており、原因のほとんどは飼い主の免疫抑制剤投薬の不備である。急性拒絶反応発症時においても特異的な臨床症状を示すことが少ないため飼い主が気付かない間に腎傷害が進行し、結果として移植腎の喪失、そして死を招くことになる。したがって、急性拒絶反応発症後早期に移植腎の異常を把握できる非侵襲的かつ容易に検査可能な腎傷害診断マーカーの確立がネコにおいても望まれる。L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)はヒトにおいて腎臓の近位尿細管上皮細胞の細胞質に局在する分子量14~15kDaの脂肪酸結合蛋白である。細胞質中のL-FABPは遊離脂肪酸と結合し、脂質をミトコンドリアやリソソームへ輸送する機能を担っており、エネルギー産生・恒常性の維持に重要な役割を果たしている。尿細管周囲に虚血・再灌流傷害が生じた場合、産生された活性酸素が遊離脂肪酸を細胞毒性の強い過酸化脂質へと変化させる。L-FABPはこの過酸化脂質と結合し細胞外(尿細管腔)へ排出することで腎保護作用を

示す。近年、尿中L-FABPは厚生省の認可を経て、ヒトの急性腎傷害における早期診断マーカーとして利用されるようになった。

これらの知見を踏まえ、移植腎の早期傷害診断マーカーとしてL-FABPが利用できると考えた。ネコは約20%の慢性腎臓病罹患率を示し、末期腎不全に対して腎移植を適応する点でヒト医療の現状ととても類似している。そこでネコの腎移植モデルは、L-FABPの有効性を評価するヒトの前臨床モデルとして活用できると考えた。

### 2. 研究の目的

移植腎は虚血再灌流傷害、拒絶反応、薬物毒性等による腎傷害の危険に常にさらされており、腎傷害の発症を予測・モニターすることは移植腎の長期生着に必要な課題である。L-FABPは近位尿細管の虚血や酸化ストレスにより尿中に排泄され、既存の腎機能評価マーカーが異常値を示す前に尿中に出現する。よって新たな腎臓病診断のバイオマーカーとして期待されている。本研究の目的は、人医療へ向けての前臨床試験として、ネコ腎移植における尿中L-FABPの移植腎傷害早期診断バイオマーカーとしての有効性を明らかにすることである。本研究で得られる結果は、腎傷害早期診断マーカーの確立のみならず、約20%の慢性腎臓病罹患率を有する猫を腎臓病自然発症モデル動物として確立するための礎となると考える。

### 3. 研究の方法

#### (1) ネコL-FABPのアミノ酸配列の同定

ネコのL-FABPの遺伝子配列は genome browser 「 ensemble ( <http://asia.ensembl.org/index.html> )」 で調べた。次にヒトとネコのL-FABPのアミノ酸の配列の相同性の比較を行うために、ネコのL-FABPの配列とヒトL-FABPの配列を clustal W ( <http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp> ) で解析した。

#### (2) ネコ腎組織を用いた Western Blotting

ネコ腎臓0.5gを5mlの10mMTris-HCl(pH7.4)でホモジネイト後、15000回転、4で20分間遠心した上清に5×SDSサンプルバッファー(+2ME)を加え終濃度1mg/mlに調整し、100で3分間加熱後、15μlをSDS-PAGE(15%ゲル)に供した。電気泳動されたゲルは、セミドライ方式でPVDF膜(Immobilon; Millipore, Canton, MA, U.S.A.)にWestern Blotし、1%PVP-TBS-T (polyvinyl-pyrrolidone in TBS-T [10 mM Tris}HCl(pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, )で室温1時間ブロッキング後、2000倍希釈したL-FABP抗体を1時間反応、TBS-TでPVDF膜を洗浄後、8000倍希釈したIRDye680標識抗マウスIgG抗体を反応させ odyssey

Infrared Imaging System (LI-COR 社) で検出した。

#### (2) ネコ腎組織試料

ネコの腎臓は、文献 Biochem J. 2003 Feb 15;370(Pt 1):101-10. で用いた試料を一部使用した。ネコの尿と腎臓のペア試料は、ルイジアナ州立大学獣医学部 (USA) で病理組織学的検査のために解剖された時に採取し、以降の分析のために -20 で保存されたものを使用した。

腎組織染色は、精製されたヒト L-FABP をマウスに免疫して取得された抗ヒト L-FABP マウスモノクローナル抗体 (クローン 2) [シミックホールディング株式会社、東京] を用いて行った。

#### (3) ネコ腎虚血モデルの作製

1才齢以上の雄猫 10頭 (腎虚血再灌流群: 9頭、シャムコントロール群: 1頭) (日生研株式会社 SPF 猫) を本研究で使用した。全身麻酔後、腹部正中切開し、両腎の動静脈を任意の時間 (40分、50分、60分のいずれか) クランプした後解除し閉腹した。生検は、クランプ開始直後は右腎から、クランプ解除直前と解除 1時間後には左腎から一部を生検した。生検は直视下で、18G ツールカットバイオプシーニードルを用いて行った。コントロール群のネコでは、腎虚血再灌流群のネコの手術と同様の時間で生検を行ったが、生検に必要な時間以上 (3分以内) のクランプは行っていない。尿は手術前 (当日) 虚血直前、再灌流 1時間後は尿道カテーテルから採取し、手術翌日は代謝ケージを用いて採取した。採血は手術 8日前、1日前、手術当日、術後 1, 2, 3, 4, 5, 7 日に採取した。GFR 測定は、手術 2日前、術後 1, 5, 14 日に行った。

#### (4) ネコ尿を用いた Western Blotting

ネコ尿を 8 $\mu$ l (+2ME) 尿 80 $\mu$ l に 5 $\times$  SDS サンプルバッファ (+2ME) を 20 $\mu$ l 加え、100 で 3分間加熱した後、15 $\mu$ l を SDS-PAGE (15%ゲル) に供した。電気泳動されたゲルは、セミドライ方式で PVDF 膜 (Immobilon; Millipore, Canton, MA, U.S.A.) に Western Blot し、1% PVP-TBS-T (polyvinyl-pyrrolidone in TBS-T [10 mM Tris]HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20,) で室温 1時間ブロッキング後、3000倍希釈した L-FABP 抗体を 1時間反応、TBS-T で PVDF 膜を洗浄後、8000倍希釈した IRDye680 標識抗マウス IgG 抗体を反応させ odyssey Infrared Imaging System (LI-COR 社) で検出した。

#### (5) 尿中 L-FABP の測定および組織染色

酵素免疫測定 (ELISA) 法 [ヒト型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) キット; シミック (株) 東京] を用いて濃度測定を行った。測定方法は添付の文書の通りに行った。また、測定値

は尿中クレアチニン値で補正した。

#### 免疫組織化学的検査

ネコ腎臓試料は、4%パラホルムアルデヒド 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) で一晩 4 で固定した。パラフィン切片作成のために、試料は、50%から無水エタノール溶液の段階的な脱水後、キシレンで透徹しパラフィン中に包埋した。腎臓切片は、ミクロトームで 4 $\mu$ m に薄切し MAS コートスライドガラス [スーパーフロストホワイト MAS; 松浪硝子工業株式会社] にのせ乾燥させ作成した。脱パラフィン後の切片は内在性ペルオキシダーゼを失活させるために 3%過酸化水素水/メタノールで処理後、更に 10%ヤギ血清で 1時間ブロッキング処理された。L-FABP の免疫染色の為、切片は抗体希釈液 [Antibody Diluent, Dako REAL™; Dako] で 200 倍に希釈した抗 L-FABP 抗体を室温で 1時間インキュベート後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 [EnVision+ - Peroxidase - mouse, Dako] を室温で 30 分間反応させ、抗体反応を視覚化するために、ジアミノベンジン [Liquid DAB+Substrate Chromogen System; Dako] を使った。最後に切片はヘマトキシリンで対比染色し、光学顕微鏡下で観察した。

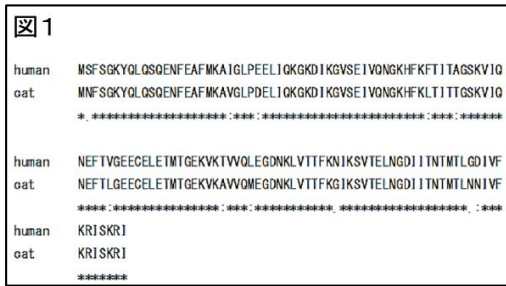
#### (6) ネコ腎移植急性拒絶モデルの作製

1歳齢以上の雌ネコ 2頭を使用した。手術は 2頭をペアとしてそれぞれドナー、レシピエントとすることで同時に実施した。即ち、両側腎臓を摘出後、左腎を別個体へ移植した。移植後、動物は急性拒絶反応防止のためにシクロスポリン (CsA) およびプレドニゾロンの投与により維持された。CsA の全血トラフ濃度 (最低血中濃度) が 500ng/mL 強になるように CsA 投与量は調節された。CsA 血中トラフ濃度が安定した後、免疫抑制剤の投与を中止し、急性拒絶反応を惹起した。一般状態の急激な悪化 (重度の下痢・嘔吐、食欲廃絶、体重減少、沈鬱など) あるいは血清クレアチニン値 8mg/dL をエンドポイントと設定した。生検は、手術時に右腎から、CsA 投与中止時および安楽殺時に移植腎から 18G ツールカットバイオプシーニードルを用いて行った。また、血液、尿は経時的に採取した。採材組織は HE、SMA、シリウスレッド染色により組織検査を実施した。

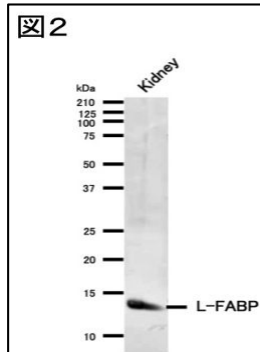
## 4. 研究成果

(1) 抗ヒト L-FABP 抗体のネコ L-FABP に対する交差性

ネコ L-FABP の遺伝子を genome browser 『ensemble』で検索し、その結果明らかになったネコ L-FABP アミノ酸配列を ClustalW でヒト L-FABP のアミノ酸配列と比較した結果、ヒトとネコの L-FABP の一次構造は、どちらも 127 個のアミノ酸から構成されており、アミノ酸配列に 91% の非常に高い相同性が認められた (図 1)。



抗ヒト L-FABP 抗体は、ヒト全長 L-FABP を大腸菌で発現させた組み換えタンパク質をマウスに免疫して作成されたポリクローナル抗体なので、ヒトとネコの L-FABP のアミノ酸配列の非常に高い相同性を考慮すると、抗ヒト L-FABP 抗体は、ネコ L-FABP に交差する可能性が考えられた。そこで次に健康なオスネコ腎臓のホモジナートを調整し、ネコの腎臓で L-FABP が発現しているか、抗ヒト L-FABP 抗体がネコ L-FABP に交差するか、Western Blotting で調べた。その結果、L-FABP の推定分子量とほぼ同じ約 14kDa 付近に単一のバンドが検出された(図2)。よってネコ腎臓で L-FABP が発現していること、抗ヒト L-FABP 抗体がネコ L-FABP に交差することが合わせて明らかになった。



ヒト L-FABP 抗体がネコ L-FABP に交差するか、Western Blotting で調べた。その結果、L-FABP の推定分子量とほぼ同じ約 14kDa 付近に単一のバンドが検出された(図2)。よってネコ腎臓で L-FABP が発現していること、抗ヒト L-FABP 抗体がネコ L-FABP に交差することが合わせて明らかになった。

## (2) 腎臓 L-FABP 組織局在と尿中 L-FABP 値の相関性について

腎臓 L-FABP の組織局在と尿中 L-FABP 値の相関性について調べるためにルイジアナ州立大学から病理解剖されたネコ 31 検体の腎臓と膀胱尿のペア試料を提供してもらい、腎臓の免疫組織化学による L-FABP 組織局在解析と ELISA による尿中 L-FABP 濃度測定を行った。31 検体の尿中 L-FABP 値  $0 \sim 54926.3 \mu\text{g/g Cr}$  (平均  $\pm$  標準誤差) となった。そこで尿中 L-FABP 値を基に 5 つの集団(グループ 1、0-10: グループ 2、10-100: グループ 3、100-1000: グループ 4、1000-10000: グループ 5、10000 <) に分類し、L-FABP の組織局在についてグループ間の比較を行った。尿中 L-FABP 値が次に低い値を示したグループ 1 の 16 例では、L-FABP の組織局在は、近位尿細管上皮細胞の細胞質に局限しており、尿細管管腔内は染色されなかった。尿中 L-FABP 値が次に低い値を示したグループ 2 の 3 例では、L-FABP の組織局在は、近位尿細管上皮細胞の細胞質にほとんど局限しており、尿細管管腔内は稀にしか染色されなかった。尿中 L-FABP 値が中間値を示したグループ 3 の 9 例では、L-FABP の組織局在は、近位尿細管上皮細胞の細胞質のみでなく、尿細管管腔

内もよく染色されている部位と尿細管上皮細胞の細胞質に局限している部位があった。尿中 L-FABP 値が高値を示したグループ 4 の 1 例とグループ 5 の 2 例は近位尿細管上皮細胞の細胞質と尿細管管腔内が多く場所で染色されていた。逆に数値との関連性を詳しく見ると、尿中 L-FABP 値が  $0-10 \mu\text{g/g Cr}$  では尿細管管腔内が染色されているものはほとんど認められなかった。また、 $10-100 \mu\text{g/g Cr}$  でも尿細管管腔内の染色が認められない症例が多かった。 $100-1000 \mu\text{g/g Cr}$  の症例では尿細管管腔内がほぼ染まっている症部位と尿細管上皮細胞質に局限している部位が見られる症例が多かった。また  $1000 \mu\text{g/g Cr}$  以上の症例は多くの尿細管管腔内が染色されていて明確な差は確認しにくかった。よって、ネコで尿中 L-FABP 値と近位尿細管から排泄される L-FABP に関連性があることが示された(図3)。

図3

Group	L-FABP/Cr	Av $\pm$ S.D.	症例数	年齢	性別			腎臓	
					雄	雌	去勢雄		
1	0-10 $\mu\text{g/g cr}$	2.3 $\pm$ 2.7 (0-7.3)	16	4.5 $\pm$ 1.4	4	3	2	5	
2	10-100 $\mu\text{g/g cr}$	34.5 $\pm$ 22.5 (13.8-31.3)	3	1.5 $\pm$ 0.3	0	0	1	2	
3	100-1000 $\mu\text{g/g cr}$	375.8 $\pm$ 206.5 (121.1-703.1)	9	9.4 $\pm$ 2.0	2	1	1	5	
4	1000-10000 $\mu\text{g/g cr}$	1728.5	1		0	0	1	0	
5	10000 $\mu\text{g/g cr}$	49197.4 $\pm$ 8102.3 (43468.2-54926.7)	2	1.5 $\pm$ 0.5	0	0	0	2	

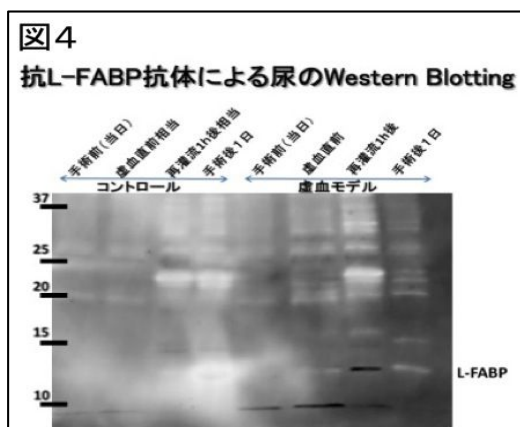
## (3) ネコ虚血再灌流モデルでの尿中 L-FABP 分泌量の変動

虚血再灌流モデルの作出に適切な温虚血時間を検証するために、腎臓の温虚血時間がどの程度腎臓に障害を及ぼすかを評価する実験から開始した。

温虚血時間 40 分・50 分・60 分の 3 群を作成し、臨床症状・血液検査結果の観察を行った。40 分と 50 分虚血では、実験期間である術後 14 日間を臨床的に大きな問題なく経過した。60 分虚血では術後から、元気・食欲の消失がみられ、飲水や排尿も見られなくなり、術後 2 日の時点で設定したエンドポイントを迎えたため、安楽殺した。血液検査では、BUN 値が 40 分虚血では、術前が  $20.3 \text{mg/dl}$  で、術後の最高値が  $59.7 \text{mg/dl}$ 。50 分虚血では、術前が  $17.8 \text{mg/dl}$  で、術後の最高値が  $72.3 \text{mg/dl}$ 。60 分虚血では、術前が  $18.7 \text{mg/dl}$  で、術後の最高値が  $111.1 \text{mg/dl}$  と推移しており、Cre 値も、40 分虚血では術前が  $1.41 \text{mg/dl}$  で、術後の最高値が  $2.96 \text{mg/dl}$ 。50 分虚血で術前が  $1.09 \text{mg/dl}$  で、術後の最高値が  $2.86 \text{mg/dl}$ 。60 分虚血で術前が  $1.45 \text{mg/dl}$  で、術後の最高値が  $9.56 \text{mg/dl}$  と推移した。各群間に有意差は認められなかったが、虚血時間が長くなるに従い数値の上昇も急激になり、臨床症状の悪化も見られたため、腎障害の程度は虚血時

間に相関して悪化していることが確認できたと考える。以上の結果から、以降の実験の虚血再灌流処置は、実験期間を生存し、中等度から重度の腎障害を生じさせることができると考えられる 50 分の虚血で行うこととした。

また、ネコの腎臓に酸化ストレスが生じた際に L-FABP の尿中分泌量が変動するか抗ヒト L-FABP 抗体を用いた Western Blotting で検証した。コントロールネコはシャムオペ前後のどの時間においても L-FABP 特異的な 14kDa のバンドは検出されなかった。一方虚血再灌流ネコの尿では、再灌流 1 時間後の尿でのみ 14kDa の L-FABP 特異的バンドが検出された (図 4)。以上の結果、ネコにおいて虚血酸化ストレスが近位尿細管上皮細胞に生じると L-FABP の尿中分泌量が有意に増加することが示された。

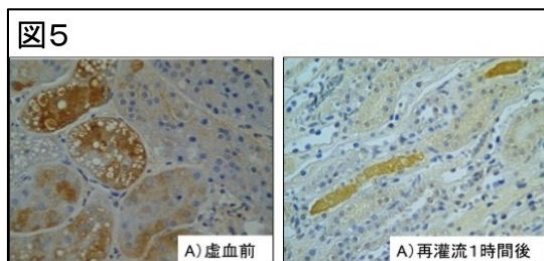


#### (4) 腎臓への障害と腎臓 L-FABP の組織局在

腎臓への障害による腎臓 L-FABP の組織局在の変化について評価を行うために、虚血再灌流処置直前、虚血処置完了時、再灌流 1 時間後の生検材料の免疫組織学的評価を行った。

シャムコントロールでは、L-FABP の組織局在は、どの時点のものでも近位尿細管上皮細胞の細胞質内に限局しており、尿細管管腔内は染色されなかった。虚血処置群では、虚血再灌流処置直前は近位尿細管上皮細胞の細胞質に限局していた染色領域が、虚血処置完了時では尿細管管腔内に移動し、細胞質の色は薄くなっていた。また、再灌流 1 時間後では尿細管管腔内、細胞質内ともに染色されていたものが多く見られた (図 5)。

また、50 分虚血群で、剖検後(術後 14 日時

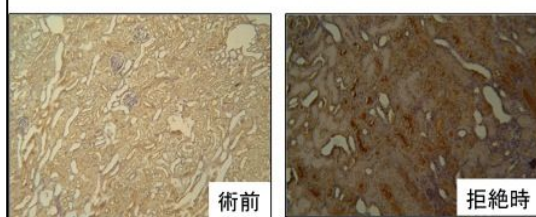


点)の腎組織切片の免疫組織学的評価も行う

た。近位尿細管上皮細胞の細胞質内、尿細管管腔内ともによく染色されているのが確認された。また、BUN や Cre の最高値が高かったものほど、染色の程度がより強くなっていた。

(5) 急性拒絶反応時の L-FABP の組織局在  
移植後 CsA トラフ濃度が安定するまでに約 20 日間を要した。CsA 投与中止後約 7 日目にエンドポイントを迎えたため安楽殺とした。採材した腎組織サンプルでは、術前は L-FABP は尿細管上皮細胞の細胞室内に多く認められた。急性拒絶時には、多くの尿細管に壊死が認められたが、残った尿細管組織では L-FABP は尿再管細胞質内ではなく管腔内にとめられた (図 6)。

図 6



以上の結果より、L-FABP はネコの腎組織内、特に尿再管細胞質内に認められ、腎組織への虚血ストレスや腎移植時の急性拒絶反応発症時に腎機能障害が発現する前に尿再管腔から尿中へ分泌されることが示唆された。腎機能の傷害度を示すマーカーというよりはむしろ機能障害を発症させるストレスの受傷マーカーとして機能する可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等 該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

片山泰章 (KATAYAMA, Masaaki)  
岩手大学・農学部・准教授  
研究者番号: 70436054

##### (2) 研究分担者

宮崎雅雄 (MIYAZAKI, Masao)  
岩手大学・農学部・准教授  
研究者番号: 20392144