

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461637

研究課題名(和文)先天性心疾患に合併するチアノーゼ性腎症の発症機序の解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of cyanotic nephropathy associated with congenital heart disease

研究代表者

伊藤 秀一 (ITO, Shuichi)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20336572

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)：チアノーゼ性心疾患の重篤な合併症であるチアノーゼ性腎症の病態解明を試みた。腎生検組織では、糸球体腫大・血管係蹄拡張・メサンギウム細胞/基質の増加を、免疫染色ではHIF-1 とVEGFの発現を糸球体内皮細胞に認めた。これらは正常対照では認めなかった。患者の血漿中VEGF、VEGF-a、VEGF-cは、前2者は正常対照と差を認めなかった。しかし、血漿VEGF-cは患者で有意に上昇していた。さらに、10種の血漿中サイトカインのうち、TNF- α のみが患者で有意に上昇していた。本研究により本症の発症には、糸球体内皮細胞におけるHIF-1 とVEGFの発現が関与している可能性が判明した。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the pathophysiology of cyanotic nephropathy associated with congenital heart disease (CHD), which is a severe complication of cyanotic CHD. In kidney tissue, glomerular hypertrophy, enlargement of capillary lumen, increase of mesangial cell and the matrix were observed, and positive immunohistochemistry staining with HIF-1 and VEGF in glomerular endothelial cells were also observed in all patients. These findings are negative in normal control. Although plasma level of VEGF and VEGF-a were not elevated in patients as compared to control, but plasma VEGF-c and TNF- α were significantly elevated in patients. Our study revealed HIF-1 and VEGF expressed in glomerular endothelial cells could be involved in etiology of cyanotic nephropathy. Specific therapy targeting VEGF-c and TNF- α may be possible against cyanotic nephropathy.

研究分野：小児腎臓病学、小児リウマチ学

キーワード：チアノーゼ性腎症 先天性心疾患 HIF-1 VEGF TNF- α 蛋白尿

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患 (congenital heart disease : CHD) はもはや小児に限定された疾患ではない。それは、外科的治療やカテーテル治療により救命され成人期に移行するためである。1980年代には先天性心疾患は小児の疾患であったが、1997年には成人患者数が小児患者数を追い抜き、今後はさらに成人が小児患者数を凌駕してゆく。そのため、循環器内科医が成人患者の診療を行う機会が増加している。現在、CHDの手術法と小児集中治療の進歩により、未手術のチアノーゼ性CHDは減少している。しかし、成人を含め未手術あるいは手術困難なチアノーゼ性CHDやそれに伴うEisenmenger症候群の患者が一定数存在する〔1〕。

これらのチアノーゼ性CHDの患者は、長期にわたる低酸素血症により心血管系、血液系、中枢神経系、四肢長管骨、腎臓などの多臓器の合併症を併発する。具体的には、多血症による過粘度症候群(頭痛、めまい、易疲労感)、中枢神経症状(脳膿瘍、脳梗塞)、出血傾向(喀血、肺出血、手術時大出血、月経過多、歯肉出血)、チアノーゼ性腎症(蛋白尿、ネフローゼ、腎機能低下)、尿酸代謝異常(高尿酸血症、痛風関節炎)、ビリルビン代謝異常(胆石、胆道炎)、四肢末端の変化(ばち指、肥厚性骨関節炎)、末梢循環障害(末梢血管増生と拡張)等が問題となり、心臓のみならず全身的な管理を必要とする〔2〕。

なかでもチアノーゼ性腎症は、成人チアノーゼ性CHD患者の多くが発症し、生命予後にも影響するため、小児科医のみならず循環器内科医も知っておくべき疾患概念である。チアノーゼが持続するCHD患者におけるチアノーゼ性腎症の正確な発生頻度は不明であるが、10歳までに根治できなかったチアノーゼ性CHDの患者の70%が腎症を発症するという報告がある〔3〕。チアノーゼ性腎症は、原疾患であるチアノーゼ性心疾患を根治させる

しか治療法がないが、殆どの例で根治術が不可能なためにACE阻害薬等の対症療法による腎保護を行い、腎障害の進行を遅らせる以外に対処法がないのが現実である。さらに、これらのチアノーゼ性腎症の患者は、心不全を合併することも多く、心負荷がかかる血液透析や腎移植手術には大きな困難が伴う点も予後不良の所以である。チアノーゼ性腎症の病因については殆ど明らかにされておらず、そのためその治療法も未確立である。

2. 研究の目的

チアノーゼ性腎症の病態には持続する低酸素血症による多血症と血液の粘稠度の上昇、左右短絡などが関与している。前者には糸球体静水圧の上昇や血管内皮のshear stressの増加に伴うNOやprostaglandinによる血管拡張などが関与し、HIFやVEGFの関与も推定される。HIFは低酸素下で誘導される転写因子であり、発現制御を受ける遺伝子としてエリスロポエチン、VEGF、アドレノメデュリン、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)、エンドセリン(ET-1)、一酸化窒素合成酵素(NOS2)など様々な遺伝子の制御を行っている。なかでも、VEGFは骨髄から放出された巨核球が左右短絡を経て腎皮質に浸潤し、局所で分泌されたPDGF(platelet derived growth factor)、TGF-β(tissue growth factor-beta)等がメサンギウム細胞と基質の増殖、組織の線維化を促進すると推定されている〔4〕。本研究では、チアノーゼ性腎症の発症機序をHIFやVEGFなどの分子を軸に解明を試みる。本研究は新たな治療法の開発につながる可能性がある。また、今後のわが国では、小児から成人への移行期医療の重要性が増すため本研究の意義は大きい。

3. 研究の方法

チアノーゼ性腎症の患者の腎生検組織のHIF-1、HIF-1β、VEGF等の分子の発現の有無、発現部位や程度について、臨床的重症度

のとの相関性について検討を加える。さらに腎組織中における、NF- κ B、AP-1などの炎症に関与する転写因子の発現、アポトーシスのマーカーである TUNEL、酸化マーカーである 4-HNE [4-hydroxy-2-nonenal]、8-OHdG (8-Hydroxydeoxyguanosine)、熱ショック蛋白 (HSP70) 等の発現を調べ、組織障害の機序の一端を解明する。

また、患者血漿の VEGF、VEGF-a、VEGF-c、サイトカイン (GCS-F、IFN-g、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17、MCP-1、TNF-) を測定し本症の発症機序を解明する。

4. 研究成果

(1) 患者の臨床的背景(表1)

合計8名(男5、女3)のチアノーゼ性腎症の患者。腎生検実施時年齢の中央値23.5歳(14-33歳)。原疾患は、単心室4名、肺動脈閉鎖2名、完全大血管転移1名、ファロー四徴症1名であった。腎生検時のeGFRは中央値68.3ml/min/1.73m²(37.4-118)であり、CKDステージ分類ではstage 1 (n=2)、stage 2 (n=3)、Stage 3a (n=1)、3b(n=2)。蛋白尿は7名で認め、尿TP/Cr比中央値は1.79、血尿は4名で1視野あたり10個未満の赤血球を呈する微小血尿を認めた。Hbは中央値19.0g/dL(16.5-24.2)であった。最終的な転帰は4名が死亡した。

表1. 患者プロフィール

症例	年齢/性別	原疾患	尿蛋白/Cr (g/gCr)	尿RBC/視野	Hb (g/dL)	24h-Ccr ml/min/1.73m ²
1	24/F	TOF	1.93	1-4	18.5	37.4
2	17/M	SV	4.4	<1	18.0	114.6
3	23/F	PA/VSD	1.11	1-4	16.5	56.9
4	24/M	SA/SV, PA, TGA	<0.5	<1	24.2	82.9
5	13/M	SV	1.64	1-4	19.4	73.7
6	32/M	TGA	0.79	<1	20.8	118.5
7	33/M	SV, PA	4.7	<1	18.3	39.3
8	14/F	PA/IVS	8.58	5-9	21.6	36.4

TOF; ファロー四徴症, SA; 単心房, SV; 単心室, PA/VSD; 肺動脈閉鎖/心室中隔欠損, TGA; 大血管転位PA/IVS; 肺動脈閉鎖/正常心室中隔

(2) 光学顕微鏡所見の検討(表2)

腎組織の光学顕微鏡的所見は、糸球体腫大・

糸球体血管係蹄の拡張、メサンギウム細胞増殖/基質増生を全例で認めた。また、傍糸球体装置の過形成を6例で、基底膜二重化を3名で、巣状分節性糸球体硬化を4名で認めた。これらは正常コントロール3名では認めなかった。

(3) 免疫組織染色所見の検討(表2)

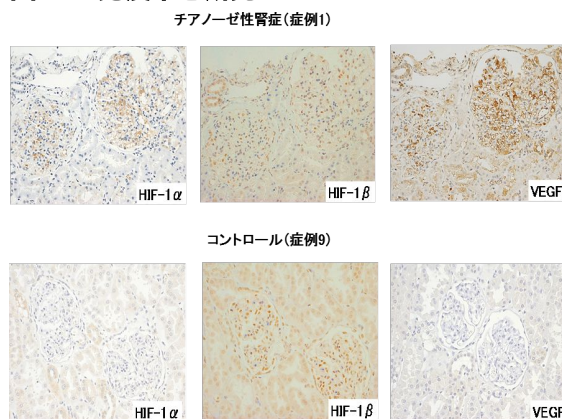
8名全てで HIF-1 が糸球体内皮細胞に認められ、VEGF も8名全てで同部(図1)に認められた。これらは正常コントロール3名では認めなかった。一方、HIF-1 は糸球体および尿細管の細胞の核にチアノーゼ性腎症群と正常コントロールの全員に染色された。また、NF- κ B、NF- κ B、AP-1、TUNEL、HSP70、4-HNE、8-OHdG については、チアノーゼ性腎症、正常コントロールともに染色されなかった。

表2. 腎組織所見と免疫染色

症例	糸球体腫大・血管係蹄拡張・メサンギウム細胞増殖/基質増生	傍糸球体装置の過形成性変化	基底膜二重化	FSGS病変	HIF- α	HIF- β	VEGF
1	+	-	-	-	+	+	+
2	+	-	-	-	+	+	+
3	+	+	-	-	+	+	+
4	+	+	-	-	+	+	+
5	+	+	-	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+
9	-	-	-	-	-	+	-
10	-	-	-	-	-	+	-

症例9・10はコントロール

図1. 免疫染色所見



(4) 血漿中 VEGF とその分画、血漿中炎症性サイトカインの検討

チアノーゼ性腎症患者の腎組織内で VEGF の発現を認めたため、患者 (n=5) 血漿中の

VEGF の測定を試みた。しかしながら、正常コントロール(n=9)との間に有意差を認めなかった (466 ± 385 pg/mL vs 247 ± 65 pg/mL, $P=0.09$)。このことより、患者における VEGF は糸球体内に限局して発現が増加している可能性が示された。しかし、VEGF には種々の分画があり、その検討も行った。VEGF-a は血管内皮細胞の遊走・増殖に関与し、分画中でも主要な位置を占める。一方、VEGF-c は血管の増殖以外に血管透過性の更新、リンパ管の新生やがん転移にも関与する。本研究では、患者 4 名と正常コントロール 9 名について VEGF-a, VEGF-c を調べたところ、前者では差を認めなかったが、VEGF-c は患者において有意に高値であった。(患者 vs コントロール; 892.8 ± 192.9 pg/mL vs 56.4 ± 27.2 pg/mL, $p=0.003$)。また、血漿中のサイトカインの分析では(GCS-F、IFN-g、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17、MCP-1、TNF-)、TNF- のみが患者において有意差を認めた(患者 vs コントロール; 15.6 ± 5.8 pg/mL vs 6.6 ± 2.8 pg/mL, $p=0.04$)。

(5) 考察

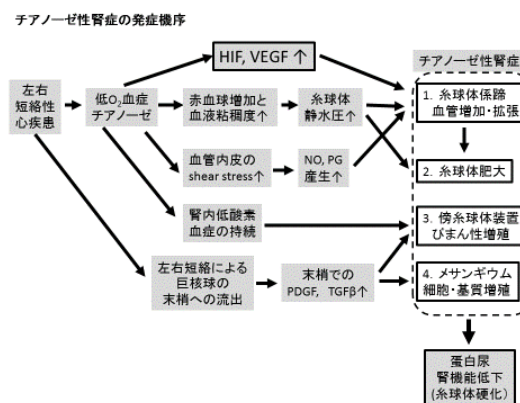
HIF-1 は HIF-1 と HIF-1 から構成されるヘテロ二量体蛋白である。HIF-1 は恒常的な核内蛋白である。HIF-1 は、正常酸素濃度分圧ではプロテアソームの分解を受ける。しかし、低酸素状態では HIF-1 分解が抑制され、核内へ移行することで HIF-1 と結合し、血管新生因子である VEGF、一酸化窒素合成酵素 (NOS)、グルコースの能動輸送トランスポーター (GLUT-1) 等を誘導し、生体の生存のために働く。その一方で、血管新生や炎症にも関係する。

本研究により HIF-1 と VEGF が本症の発症に関与している可能性が示唆された。低酸素と炎症は密接な関係があることが知られており、HIF-1 が誘導する蛋白により腎症が惹起されている可能性がある(図 2) [5]。し

かし、これらのタンパクが腎保護的に働いているのか、それとも害をもたらしているのかを判断することは、本研究結果のみでは難しい。さらに、これらのタンパクの発現が単に低酸素血症に伴う非特異的な所見の可能性もある。チアノーゼ性腎症を認めないチアノーゼ CHD 患者においても、これらのタンパクが腎組織に発現しているかを調べる必要があるが、倫理的な問題、さらに過粘稠症候群への抗凝固療法を行っている患者が多い事もあり、腎機能障害や蛋白尿を認めない患者の腎生検は困難である。

しかしながら、HIF-1 の制御が腎症の進行抑制に働く可能性がある。近年、酸素濃度に依存しない HIF-1 を制御する因子として、mTOR 阻害薬 (rapamycin) が注目されている [6]。このような薬剤が、腎症進行を抑制するかもしれない。また、VEGF-c、TNF- 等をターゲットとした治療法は本症の新規治療薬になる可能性がある。

図 2. チアノーゼ性腎症の発症機序 (仮説)



引用文献

- 1) Perloff JK. Systemic complications of cyanosis in adults with congenital heart disease. Hematologic derangements, renal function, and urate metabolism. *Cardiol Clin.* 11, 1993, pp.689-99.
- 2) Krull F, Ehrich JH, Wurster U, Toel U, et al. Renal involvement in patients with

- congenital cyanotic heart disease. *Acta Paediatr Scand.* 80, 1991, pp.1214-9
- 3) 長嶋正寛、上村 治、他 . チアノーゼ型先天性疾患にみられる腎疾患の頻度 . 成因解析と診断、治療法の策定 . 日本小児循環器学会雑誌 22, 2006, pp.13-133
 - 4) Perloff JK, Latta H, Barsotti P. Pathogenesis of the glomerular abnormality in cyanotic congenital heart disease. *Am J Cardiol.* 86, 2000, pp.1198-20
 - 5) Eltzhig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med.* 364, 2011, pp.656-65.
 - 6) Pore N, Jiang Z, Shu HK, Bernhard E, Kao GD, Maity A. Pore N et al. Akt1 activation can augment hypoxia-inducible factor-1alpha expression by increasing protein translation through a mammalian target of rapamycin-independent pathway. *Mol Cancer Res* 4, 2006, pp.471-9.

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)

Ito N, Hataya H, Saida K, Amano Y, Hidaka Y, Motoyoshi Y, Ohta T, Yoshida Y, Terano C, Iwasa T, Kubota W, Takada H, Hara T, Fujimura Y, Ito S. Efficacy and safety of eculizumab in childhood atypical hemolytic uremic syndrome in Japan. *Clin Exp Nephrol.* 20, 2016, pp.265-72. (査読有)
doi: 10.1007/s10157-015-1142-y.

Kamei K, Ogura M, Sato M, Sako M, Iijima K, Ito S. Risk factors for relapse and long-term outcome in steroid-dependent nephrotic syndrome treated with rituximab. *Pediatr Nephrol.* 31, 2016, pp.89-95. (査読有)
doi: 10.1007/s00467-015-3197-0.

Kamei K, Nakanishi K, Ito S, Ishikura K, Hataya H, Honda M, Nozu K, Iijima K, Shima Y, Yoshikawa N. Risk factors for persistent proteinuria after a 2-year combination therapy for severe childhood IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 30, 2015, pp.961-7, (査読有)
doi: 10.1007/s00467-014-3019-9.

Yoshikawa N, Nakanishi K, Sako M, Oba MS, Mori R, Ota E, Ishikura K, Hataya H, Honda M, Ito S, Shima Y, Kaito H, Nozu K, Nakamura H, Igarashi T, Ohashi Y, Iijima K. A multicenter randomized trial indicates initial prednisolone treatment for childhood nephrotic syndrome for two months is not inferior to six-month treatment. Japanese Study Group of Kidney Disease in Children. *Kidney Int* 87, 2015, pp.225-32 (査読有)
doi: 10.1038/ki.2014.260.

Sato M, Ito S, Ogura M, Kamei K. Impact of rituximab on height and weight in children with refractory steroid-dependent nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 29, 2014, pp.1373-9, (査読有)
doi: 10.1007/s00467-014-2792-9

Iijima K, Sako M, Nozu K, Mori R, Tuchida N, Kamei K, Muira K, Aya K, Nakanishi K, Ohtomo Y, Takahashi S, Tanaka R, Kaito H, Nakamura H, Ishikura K, Ito S, Ohashi Y. Rituximab for the treatment of childhood-onset complicated frequently relapsing nephrotic syndrome /steroid-dependent nephrotic syndrome: A multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.* 384, 2014, pp.1273-81 (査読有)
doi:10.1016/S0140-6736(14)60541-9.

Igarashi T, Ito S, Sako M, Saitoh A, Hataya H, Mizuguchi M, Morishima T, Ohnishi K, Kawamura N, Kitayama H, Ashida A. Guidelines for the management and investigation of hemolytic uremic syndrome.

Clin Exp Nephrol. 18, 2014,
pp.525-57 (査読有)
doi: 10.1007/s10157-014-0995-9.

Tøndel C, Kanai T, Larsen KK, Ito S, Politei JM, Warnock DG, Svarstad E. Foot Process Effacement Is an Early Marker of Nephropathy in Young Classic Fabry Patients without Albuminuria. Nephron Physiol. 129, 2014, pp.16-21 (査読有)
doi: 10.1159/000369309.

Kamei K, Takahashi M, Fuyama M, Saida K, Machida H, Sato M, Ogura M, Ito S. Rituximab-associated agranulocytosis in children with refractory idiopathic nephrotic syndrome: case series and review of literature. Nephrol Dial Transplant. 30, 2014, pp.91-6 (査読有)
doi: 10.1093/ndt/gfu258.

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. 29, 2014, pp.1181-7 (査読有)
doi: 10.1007/s00467-014-2765-z.

【学会発表】(計5件)

伊藤秀一. ネフローゼ症候群の新たな治療 リツキシマブ. 小児腎病変について. 第45 回日本腎臓学会東部学術集会, 東京ミッドタウン ホール&カンファレンス (東京都港区), 2015.10.2

伊藤秀一. 小児SLE とループス腎炎 診断と治療戦略. 第50 回日本小児腎臓病学会, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市), 2015.6.19

Ito S, Ogura K, Kamei K, Matsuoka K. Complete elimination of renal glycosphingolipid deposition by 3 years of treatment with agalsidase beta in a boy with

Fabry disease. The 52th ERA-RDTA congress, One Western Gateway Royal Victoria Dock London, (英国London), 2015.5.30

伊藤秀一. aHUS : 非典型溶血性尿毒症症候群の治療における新たな進歩と挑戦. 第118 回日本小児科学会学術集会 大阪国際会議場 (大阪府大阪市) 2015.4.19

伊藤秀一. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) 診療指針を踏まえて 第57 回日本腎臓学会学術集会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2014. 7.6

【図書】(計0件)

【産業財産権】

出願状況(計件) 0件

取得状況(計件) 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

伊藤秀一 (ITO, Shuichi)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 20336572

(2)研究分担者

賀藤 均 (KATO, Hitoshi)
独立行政法人国立成育医療研究センター・器
官病態系内科部・院長
研究者番号 : 70214393

松岡 健太郎 (MATSUOKA, Kentaro)
独立行政法人国立成育医療研究センター・病
理診断部・医長
研究者番号 : 90286443

阿部 淳 (ABE, Jun)
独立行政法人国立成育医療研究センター・
免疫アレルギー研究部・室長
研究者番号 : 40281688
(H25-26 まで研究分担者)

(3)連携研究者 なし