

令和元年6月6日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11066

研究課題名(和文)細胞周期を考慮したBKウイルス腎症診断法の確立

研究課題名(英文)Viral life cycle and the diagnosis of BK polyomavirus-associated nephropathy.

研究代表者

升谷 耕介(Masutani, Kosuke)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：30419593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：BKウイルス(BKV)腎症の病理標本を用い、連続切片を作成しSV40 large-T抗原(TAg)とBKV VP1の免疫染色を行った。TAg染色では尿細管細胞核に陽性像を呈したが、VP1は核、細胞質、尿細管内の脱落細胞など多彩な陽性像を呈した。全標本を目視で観察し、陽性尿細管数を計数したところ、TAg陽性尿細管2.8%に対しVP1陽性尿細管は1.4%( $P=0.2$ )であった。2検体においてVP1染色は偽陰性を呈した。初回生検を用いて血清Cr上昇と染色陽性尿細管との相関を検討したところ、VP1陽性尿細管数とCr上昇は有意な正の相関を示したが、TAg陽性尿値アキとの相関は有意ではなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VP1染色は多彩な陽性所見を呈し、視認性も良好であったが、陽性尿細管数で見ると古典的なSV40 TAg染色の半数の尿細管を検出し、感染尿細管が非常に少ない検体では偽陰性の可能性もある。従って腎症の診断の感度としてはSV40 TAg染色を超えることはないと考えられる。ただし、VP1陽性尿細管が多い症例ほど血清Cr値の上昇が大きいことから、治療経過や予後をより反映する可能性がある。Banff Working GroupがTAg染色をベースとした新しいBKウイルス腎症のステージ分類を発表しているが、予後予測能力については染色法も含め更なる検討が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed immunohistochemical staining for SV40 TAg and VP1 in 28 biopsies of BKPyVAN, and compared the patterns of positivity and the percentage of positive tubules. We investigated the correlation between Cr increase and the percentage of positive tubules for both markers. In VP1 staining, positive findings were observed not only in the nuclei of tubular epithelial cells, but also in the cytoplasm, cells shedding into the lumen, intratubular casts. Two of 28 biopsies (7.1%) showed TAg-positive and VP1-negative results. The median percentage of positive tubules was 2.8% for TAg, and 1.4% for VP1 staining ( $P=0.2$ ). Cr increases significantly correlated with the percentage of VP1-positive tubules ( $r=0.49$ ,  $P=0.02$ ), while this correlation revealed borderline significance in TAg staining. VP1 expression showed various patterns, but was detected in half as many tubules as TAg staining, which might lead to false negatives in the samples with minimal viral replication.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：BK polyomavirus 腎移植 病理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

現在、臓器移植時の免疫抑制療法はT細胞特異的かつ強力であり、細菌感染症の頻度は低下したが、いまだウイルス感染の問題が残っている。サイトメガロウイルスに次いで腎移植後感染として頻度の高いBKウイルス(BKV)は幼少期に初感染し、尿路に潜伏感染、健常成人の抗体陽性率は90%以上とされる。BKVはドナー腎経路でレシピエントに持ち込まれ、免疫抑制療法下で再活性化し、尿管狭窄や間質性腎炎を起こす。1995年に移植腎のBKV腎症が報告され、BKVに関する研究が始まり20年以上が経過したが、腎症に罹患すると移植腎喪失の頻度が3年30%、5年50%と予後不良であり、Kidney Disease Improving Global Outcome(KDIGO)と米国移植学会(AST)は2009年にガイドラインを発表、全症例でBKV感染のスクリーニングと血症・腎症を認めた場合の免疫抑制薬減量を推奨した。

BKVが再活性化し、移植腎機能低下を認めた場合は移植腎生検を行いSV40 large-T抗原染色により腎症の診断を確定させることが主流である。しかし、その病理診断にも落とし穴があり、熟練した腎病理医でも決して容易ではない。BKV感染が進行して核内にウイルス粒子が増加してくる時期には従来から用いられてきたSV40 large-T抗原の発現が減弱し、病変が見落とされる可能性がかねてより指摘されている。そこでBKVの感染サイクルに注目した。BKVが感染細胞核内に入ると早期蛋白 large T 抗原をコードする遺伝子が転写され、large T 抗原は細胞周期抑制蛋白 p53 と結合し機能を抑制、DNA 合成へ細胞を誘導し、viral DNA 複製やVP1-3(構造蛋白)の合成を促す。構造蛋白の主成分であるVP1が発現する時期は感染周期の後半=ウイルス粒子が完成する頃である。尿細管細胞がBKVにより壊死に至り、尿中に脱落する時期には、周期から考えると large T 抗原よりVP1が強く発現していると予想される。従来は市販されていなかった酵素抗体法で染色が可能なVP1抗体も近年登場している。

## 2. 研究の目的

SV40染色により診断が確定している腎病理標本、再生検標本を用いてVP1染色によるBKV陽性尿細管の同定、感染進展度の評価、臨床像および予後との関連を検討することを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

九州大学病態機能内科学において2006年~2013年にBKV腎症と診断した症例のうち、今回の免疫組織染色に用いるのに十分な残余検体であると考えられた16症例(BKV腎症初回診断標本16検体+治療後の再生検標本12検体)を対象とした。陽性コントロール標本(前記16症例以前のBKV腎症による移植腎廃絶症例)を用いて、まずBKV VP-1抗体(Abnova社、6E10)による免疫組織染色法を確立する。染色法が確立した後、上記の16症例28生検で連続切片を作成し、BKV VP-1抗体と従来のSV40 large-T抗原に対する抗体(Calbiochem社、PAb416)で染色した場合のBKV感染尿細管数を評価し、現在のSV40 large-T抗原単独で診断した場合と比較して、陽性と判定できる細胞の部位と携帯、および陽性尿細管数(全尿細管を目視で計数、およびBanff pviスコア)の多寡を評価する。治療(免疫抑制薬減量)を加えた後の再生検では、尿細管間質炎が増悪しており、BKV感染細胞の同定が初回生検よりも困難な場合が多い。よって陽性尿細管数と臨床像の関連については初回診断を行った16生検のみを用いて行い、ベースラインからの血清クレアチニン上昇度と染色陽性尿細管数との関連を単相関で検討した。

## 4. 研究成果

今回確立した移植腎におけるBKV-VP1染色は既存のSV40-TAg染色と同様、極めて良好な染

色性を示した。SV40 large-T 抗原では腫大が軽度で核内封入体を有さない尿細管上皮細胞を中心に陽性所見を認めた一方、BKV-VP1 染色ではそれらの細胞では発現が弱く、むしろ腫大した尿細管細胞核、細胞質、間質の一部、尿細管腔の脱落細胞や細胞性円柱に強い陽性所見を呈した。SV40 large-T 抗原陽性細胞と VP1 陽性細胞の分布は同じ尿細管内でも異なっており、また生検標本内での分布も異なっていた。全標本、全視野を目視で計数して算出した SV40-TAg 陽性尿細管数(%)と BKV-VP1 陽性尿細管数(%)を中央値(四分位範囲)で示すとそれぞれ 2.8%(0.7-9.8) 1.4%(0.5-3.9)であり、両群間に有意差を認めなかった(P=0.2)が、後者が前者の 1/2 程度であった。28 生検標本のうち、SV40 large-T 抗原染色で pv11(陽性尿細管 1%未満)であった 2 生検で SV40 large-T 抗原陽性、VP1 陰性の所見であった。BKV-VP1 陽性尿細管数はベースラインからの Cr 上昇と有意な正の相関を示したが(r=0.59, P=0.02) SV40-TAg と Cr 上昇の相関は有意ではなかった。

以上をまとめると、BKV-VP1 染色は明瞭かつ多彩な陽性所見を呈するが、BKV 感染尿細管が標本のごく一部にしかない症例で偽陰性の結果を呈する可能性があり、腎症の診断(感度)において SV40-TAg を上回ることはない。ただし、BKV-VP1 は尿細管上皮細胞の変性、壊死、脱落、すなわち尿細管細胞障害の程度をよく反映し、移植腎機能障害とより強く相関する可能性がある。

#### 4. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

**Masutani K**, Tsuchimoto A, Yamada T, Hirakawa M, Mitsuiki K, Katafuchi R, Hirakata H, Kitazono T, Tsuruya K and West Japan Study Group for Therapy of IgA Nephropathy Investigators. Comparison of steroid-pulse therapy and combined with mizoribine in IgA nephropathy: a randomized controlled trial. Clin Exp Nephrol 20 (6): 896-903, 2016 査読有

Matsukuma Y, **Masutani K**, Tanaka S, Tsuchimoto A, Fujisaki K, Torisu K, Katafuchi R, Hirakata H, Tsuruya K, Kitazono T. A J-shaped association of serum uric acid level with poor renal survival in female patients with IgA nephropathy. Hypertens Res 40 (3): 291-297, 2017 査読有

**Masutani K**, Tsuchimoto A, Kurihara K, Okabe Y, Kitada H, Okumi M, Tanabe K, Nakamura M, Kitazono T, Tsuruya K and the Japan Academic Consortium of Kidney Transplantation (JACK) investigators. Histological analysis in ABO-compatible and -incompatible kidney transplantation by performance of 3- and 12-month protocol biopsies. Transplantation 101 (6): 1416-1422, 2017 査読有

Tsuchimoto A, Nakano T, Hasegawa S, **Masutani K**, Eriguchi M, Nagata M, Nishiki T, Kitada M, Tanaka M, Kitazono T, Tsuruya K. The potential role of perivascular lymphatic vessels in preservation of kidney allograft function. Clin Exp Nephrol 21 (4): 721-731, 2017 査読有

Matsukuma Y, **Masutani K**, Tanaka S, Tsuchimoto A, Haruyama N, Okabe Y, Nakamura M, Kitazono T, Tsuruya K. Association between serum uric acid level and renal arteriolar hyalinization in individuals without chronic kidney disease. Atherosclerosis 266: 121-127, 2017 査読有

**Masutani K**, Omoto K, Okumi M, Okabe Y, Shimizu T, Tsuruya K, Kitazono T, Ishida H, Tanabe K. Incidence of hepatitis B viral reactivation after kidney

transplantation with low-dose rituximab administration. *Transplantation* 102 (1): 140-145, 2018 査読有

Kawai Y, Masutani K, Torisu K, Katafuchi R, Tanaka S, Tsuchimoto A, Mitsuiki K, Tsuruya K, Kitazono T. Association between serum albumin level and incidence of end-stage renal disease in patients with immunoglobulin A nephropathy: A possible role of albumin as an antioxidant agent. *PLoS One* 13 (5): e0196655, 2018 査読有

Matsukuma Y, Masutani K, Tsuchimoto A, Okabe Y, Nakamura M, Tsuruya K, Kitazono T. The effect of steroid pulse therapy on post-transplant immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology* 23 (Suppl 2): 10-16, 2018 査読有

Katafuchi R, Nagae H, Masutani K, Tsuruya K, Mitsuiki K. Comprehensive evaluation of the significance of immunofluorescent findings on clinicopathological features in IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 23 (2): 169-181, 2019 査読有

Tsuchimoto A, Masutani K, Omoto K, Okumi M, Okabe Y, Nishiki T, Ota M, Nakano T, Tsuruya K, Kitazono T, Nakamura M, Ishida H, Tanabe K and the Japan Academic Consortium of Kidney Transplantation (JACK) Investigators. Kidney transplantation for treatment of end-stage kidney disease after hematopoietic stem cell transplantation: Case series and literature review. *Clin Exp Nephrol* 23 (4): 561-568, 2019 査読有

Masutani K, Tsuchimoto A, Matsukuma Y, Tanaka S, Kaku K, Noguchi H, Kurihara K, Okabe Y, Nakano T, Tsuruya K, Nakashima H, Nakamura M, Kitazono T. Predictive value of the combination of peripheral blood lymphocyte count and urinary cytology in BK polyomavirus-associated nephropathy. *Transplant Proc* 51: 1410-1414, 2019 査読有

Tsuchimoto A, Matsukuma Y, Ueki K, Tanaka S, Masutani K, Nakagawa K, Mitsuiki K, Uesugi N, Katafuchi R, Tsuruya K, Nakano T, Kitazono T. Utility of Columbia classification in focal segmental glomerulosclerosis: renal prognosis and treatment-response among the pathological variants. *Nephrol Dial Transplant*, in press. 査読有

Tsuchimoto A, Masutani K, Nishiki T, Matsukuma Y, Ueki K, Doi A, Okabe Y, Nakamura M, Kitazono T, Tsuruya K. Thrombotic microangiopathy associated with anticardiolipin antibody in a kidney transplant recipient with polycythemia. *CEN Case Rep* 8 (1): 1-7, 2019 査読有

Masutani K. Viral infections directly involved in kidney allograft function. *Nephrology* 23 (Suppl 2): 31-37, 2018 査読有

[学会発表](計13件)

Masutani K, Tsuchimoto A, Matsukuma Y, Kurihara K, Okabe Y, Kitada, Tanaka M, Tsuruya K, Kitazono T. Histological analysis in ABO-compatible and incompatible kidney transplantation by performing 3-month and 1-year protocol biopsies. *Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting 2016, Tokyo, Japan.* (2016年4月)

Masutani K, Tsuchimoto A, Matsukuma Y, Kaku K, Kurihara K, Okabe Y, Tsuruya K,

Nakamura M, Kitazono T. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of Polyomavirus BK nephropathy in kidney transplant patients. American Transplant Congress 2016, Boston MA, United States. (2016年6月)

**升谷耕介**, 尾本和也, 奥見雅由, 岡部安博, 北田秀久, 清水朋一, 石田英樹, 田邊一成, 鶴屋和彦, 北園孝成. B型肝炎ウイルス既感染腎移植レシピエントに対するリツキシマブ投与とウイルス再活性化の検討. 第59回日本腎臓学会学術総会, 横浜市 (2016年6月)

**升谷耕介**, 土本晃裕, 栗原啓, 岡部安博, 北田秀久, 中村雅史, 鶴屋和彦, 北園孝成. ABO血液型不適合腎移植における定期生検所見. 第59回日本腎臓学会学術総会, 横浜市 (2016年6月)

Masutani K. Viral infection after kidney transplantation: Current strategy for screening, diagnosis and treatment. Kidney Transplant Asian Summit 2016, Osaka, Japan (2016年6月)

**升谷耕介**, 土本晃裕, 松隈祐太, 加来啓三, 野口浩司, 栗原啓, 岡部安博, 中村雅史, 鶴屋和彦, 北園孝成. 腎移植後BKウイルス腎症における末梢血リンパ球数の検討. 第52回日本移植学会総会, 東京 (2016年9月)

**升谷耕介**, 尾本和也, 奥見雅由, 岡部安博, 北田秀久, 清水朋一, 石田英樹, 田邊一成, 鶴屋和彦, 北園孝成. B型肝炎ウイルス既感染腎移植レシピエントに対するリツキシマブ投与とウイルス再活性化の検討. 第50回日本臨床腎移植学会, 神戸市 (2017年2月)

**升谷耕介**, 土本晃裕, 松隈祐太, 野口浩司, 加来啓三, 栗原啓, 岡部安博, 中村雅史, 鶴屋和彦, 北園孝成. 腎移植後BKウイルス腎症における末梢血リンパ球数の検討. 第60回日本腎臓学会学術総会, 仙台市, (2017年5月)

**升谷耕介**. シンポジウム「高齢者腎移植を考える」: 高齢腎移植患者における免疫抑制療法と合併症対策. 第51回日本臨床腎移植学会, 神戸市 (2018年2月)

**升谷耕介**. 行列のできるスキルアップセミナー, 腎移植後のBKウイルス腎症~臨床医の悩みと検査部門への期待~. 第67回日本医学検査学会 in 浜松, 浜松市 (2018年5月)

**升谷耕介**. シンポジウム「腎代替療法における腎臓内科医の立場」: わが国における成人先行的腎移植の特徴 ~糖尿病と夫婦間移植を中心に~. 第63回日本透析医学会学術集会, 神戸市 (2018年6月)

**升谷耕介**. シンポジウム「腎移植後の長期生存をめざすには(DWFG)」: 腎移植前後の脂質異常症. 第54回日本移植学会総会, 東京 (2018年10月)

**升谷耕介**. 教育セミナー, 移植後再発腎炎 up to date. 第52回日本臨床腎移植学会, 大阪市 (2019年2月)

〔図書〕(計1件)

**升谷耕介**. 移植前サイトメガロウイルス抗体価の測定はなぜ必要か. 腎移植コンサルタント, pp232-235, 2016

**升谷耕介**. 移植後ウイルス腎症にはどのようなものがあるか. 腎移植コンサルタント, pp236-240, 2016

**升谷耕介**. 移植腎病理診断. 腎生検診断 Navi 改訂第2版, pp85-100, 2017

**升谷耕介**. 腎移植前に必要な検査の進め方. 透析患者の検査値の読み方(第4版),

pp81-86, 日本メディカルセンター、東京、2018

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 鶴屋和彦

ローマ字氏名: Tsuruya Kazuhiko

所属研究機関名: 奈良県立医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 20372740

研究分担者氏名: 土本晃裕

ローマ字氏名: Tsuchimoto Akihiro

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 大学病院

職名: 助教

研究者番号(8桁): 50572103

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。