

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791653

研究課題名(和文) 生体腎移植における尿細管老化の検出を目的としたバイオマーカー探索研究

研究課題名(英文) An exploratory investigation of the biomarkers for senescence and arteriosclerosis in renal transplant donors and recipients

研究代表者

祖父江 理 (Sofue, Tadashi)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80452671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ドナー提供腎における老化マーカーの染色では、年齢のみならず、高血圧の有無によっても染色程度が異なり、検尿異常を認めず腎機能低下のない腎臓においても、病的尿細管老化を認める腎臓が存在することが明らかになった。このことから、アムステルダムフォーラムに合致したドナーであっても決して均一な臓器の状態ではないことが示された。これらの尿細管老化と尿中アルブミン排泄量との関連が一部で認められた。

研究成果の概要(英文)：The level of senescence markers P16INK4A and SA-β-GAL in the donated kidney differed between living-kidney donors without proteinuria and kidney dysfunction when patients were classified by the age and presence of hypertension. Therefore, the quality of kidneys from donors based on the criteria of the Amsterdam forum was not uniform. The level of urinary albumin excretion was partially associated with that of senescence markers in the donated kidney.

研究分野：腎移植

キーワード：生体腎移植 マージナルドナー 高血圧 老化

1. 研究開始当初の背景

腎移植は他の腎代替療法と比較して生存率や生活の質で優れているが、我が国では献腎移植が少ないため、生体腎移植が中心である。しかし、ドナー不足のため、高齢あるいは高血圧を合併したマージナルドナーを生体ドナー候補とせざるを得ない。マージナルドナーからの腎提供基準は2005年のアムステルダムフォーラムにて定められているが、これらマージナルドナーからの腎提供が提供後の腎機能、移植腎機能ともに安全であるかどうかの検討が必要とされてきた。

一方、『腎臓の老化』は正常腎においても、加齢に伴う動脈硬化や硬化系球体の増加として出現する。なかでも、尿細管細胞の病的老化は個体老化とは異なり、核分裂能の低下であると考えられている。しかし、『腎臓の老化』の虚血再灌流障害に対する役割は解明されていない。我々は『尿細管細胞の老化』が起こっている腎臓では虚血再灌流障害に対して尿細管再生が起こりにくいという仮説を立てた。生体腎移植手術は予定された虚血再灌流障害であり、『尿細管の老化』度を腎提供前に検出することができれば、移植に適した腎臓を見分けることが可能である。これらの潜在的な腎臓の老化をドナー選定の段階で検出するバイオマーカーの構築が必要であると考えた。

尿細管老化の指標としては、腎生検組織における老化関連ガラクトシダーゼ(SA-β-GAL)とCyclin Dependent Kinase Inhibitor (CDKI)であるP16^{INK4a}の染色度合いが年齢との相関がすでに報告されている。これらのことから、ドナー腎におけるSA-β-GALとp16^{INK4A}が『尿細管の老化度』として検討しようと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、摘出腎腎生検における尿細管細胞老化を非侵襲的バイオマーカーで検出することで、将来移植腎機能の低下しやすい(すでに提供時老化の起こっている)腎臓を見分けることができるのかという点を明らかにする。ドナー腎という、限りなく正常に近い腎臓における『尿細管老化』を直接的に評価し、新規バイオマーカーと比較することで老化病変を腎提供前に検出することが可能となる。結果、ドナーの腎提供後の安全性、レシピエントの移植腎生着率を向上させることを目的とする。また、動物実験を介して、『尿細管細胞老化』のメカニズムとその臨床的意義についても明らかにする。

本研究では最終的に生体腎移植ドナーの安全性の確保と移植腎生着率の向上、ひいては、我が国の生体腎移植成績の向上を目的としている。

3. 研究の方法

(1) 腎臓における尿細管老化の腎移植での臨床的意義について詳細にするために39症例の生体腎移植症例の協力を得て前向きコホート研究を行った。摘出腎腎生検における尿細管老化を定量化し、新規バイオマーカーとの関連を検討した。老化の指標はSA-β-GAL、P16^{INK4a}の尿細管における染色性と規定した。バイオマーカーとしては尿中アルブミン、血清可溶性Klotho、血清FGF23、尿中tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2)、尿中アンギオテンシノーゲン、心臓足首血管指数(CAVI)とした。

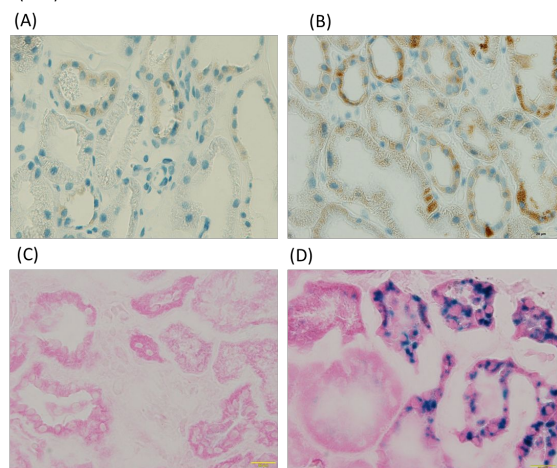
(2) 過去起点コホート研究では当院で行われた104例の症例に対して同意を得、提供された腎臓の質(マージナル因子、正常高値アルブミン尿)と移植腎の予後に関して検討を行った。また、移植腎機能と再発腎炎に関する検討を行った。

(3) また、CDKIが虚血再灌流障害に与える影響のメカニズムに関しては動物実験にて検討した。CDKIであるp21をノックアウトしたマウスにおける尿細管再生能と虚血再灌流障害時の尿細管障害度を検討した。

4. 研究成果

(1) 前向きコホート研究では提供腎におけるp16^{INK4A}、SA-β-GALの染色を行った。年齢のみならず、高血圧の有無などによってもp16^{INK4A}(図1A,B)、SA-β-GAL(図1C,D)ともに染色度が異なり、検尿異常のない健康な腎臓であっても、老化のない腎臓(A、C)、老化のある腎臓(B、D)に分かれることが明らかになった。このことから、生体腎移植基準であるアムステルダムフォーラムに合致したドナーであっても決して均一な臓器の状態ではないことが示された。

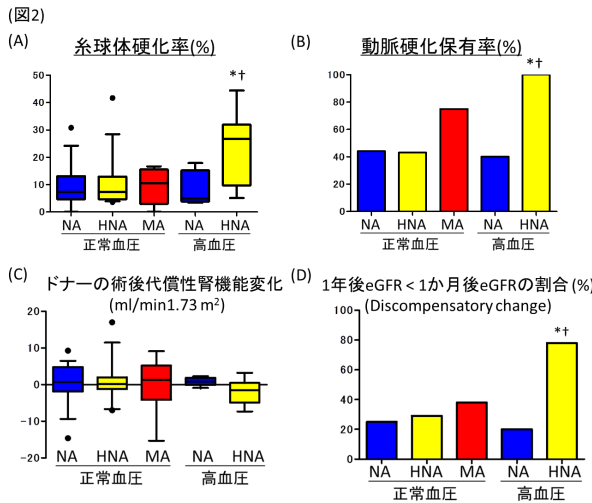
(図1)



また、こういった尿細管老化は尿中アルブミン排泄量と一部関連を認めた。特に高血圧がある場合は、尿中アルブミン排泄量をドナー提供前に測定することは提供腎の予後を判別するために有用であると考えられた。

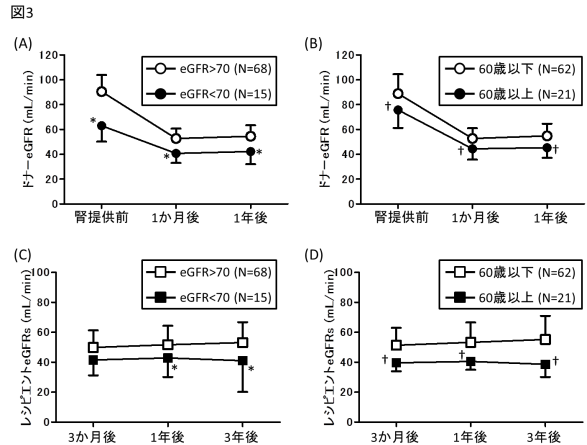
(2) 後ろ向きコホート研究

正常高値アルブミン尿(HNA)と提供腎組織の関連(図2): HNAと高血圧性腎硬化症との関連を解明するために、生体腎移植ドナーの摘出腎腎病理組織と腎機能の推移を検討した。対象は当院における連続52例の生体腎移植症例とした。随時尿での15~30 mg/gCrをHNAと定義した。腎病理組織は腎提供時の硬化系球体率、動脈硬化病変保有率を検討した。結果、正常血圧ドナー(n=38)の37%にHNAを、21%に微量アルブミン尿を認めた。高血圧合併ドナー(n=14)の64%にHNAを認めた。ドナーのアルブミン尿の程度は移植腎生着率やドナーの心血管病発生率に影響を与えなかった。正常血圧ドナーにおいてはアルブミン尿の程度は腎臓の組織学的変化や提供後の腎機能と関連を認めなかった。一方、HNAを呈する高血圧ドナーは糸球体硬化率(23%)、動脈硬化保有率(100%)ともに、アルブミン尿陰性高血圧ドナーと比較して高く(すべて $p < 0.05$)、レシピエントの移植腎機能も低値で推移した。また、HNAを呈する高血圧ドナーは提供後の腎機能増加を認めないリスクが正常血圧アルブミン尿陰性ドナーと比較して有意に高率であり(オッズ比(OR) 10.5, 95%CI=1.51-72.9, $p=0.02$)、代償性腎肥大が起きにくいと考えられた。このことから、高血圧患者では腎機能低下を呈さない正常高値アルブミン尿の時点から高血圧性腎硬化症を呈していることが示された。一方で正常血圧患者にみられるアルブミン尿は腎硬化症との関連を認めなかった。



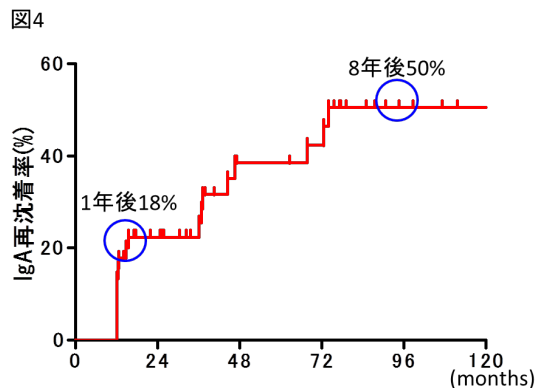
マージナルドナーからの腎提供(図3): 当院でのマージナルドナー(MD)からの腎移植成績を検討することで、当院の適応基準が適正かどうかを検証した。当院にて生体腎移植後の83例の生体腎移植症例のうち、年齢、eGFR、高血圧、肥満の各因子について、当院における適応内で提供を行ったMD群とマージナル因子を持たない非MD群の群間で移植成績を比較した。結果、83例中48例のドナーが何らかのマージナル因子を有し

ていた。60歳以上のドナー、eGFR < 70 ml/minのドナーからの移植ではドナー、レシピエントともに腎機能は低値で推移したが、生着率やドナーの腎機能回復率は対照群と同等であった。ドナーの高血圧、肥満は拡大適応内では移植成績に影響を与えなかった。当院の基準での生体腎移植において、移植成績は短期的には確保されていた。継続的な観察が必要であるが、当院の適応基準はおおむね適正であると考えられた。



再発腎炎と『腎臓の老化』

IgA腎症は腎移植後の再発が高率であるが、検尿異常を認めない段階の再発性IgA沈着症もしばしば認める。我々は再発性IgA沈着症の原因と予後を明らかにすることを目的とした検討も行った。当院にて生体腎移植を施行した41例のレシピエントのうち、IgAの再沈着を認めた再沈着群(n=16)を対象とし、非再沈着群(n=25)と後ろ向きに比較検討を行った。結果、再発性IgA沈着症は39%の症例に平均2.6年後に確認され、うち44%は検尿異常を伴う再発性IgA腎症であった。再沈着群では3年後までの移植腎機能は低値で推移した。メサンギウム増殖を伴う群では観察期間が長期であった。再発性IgA沈着症は1年後の移植腎機能が40 ml/min/1.73 m²以下であることと関連し(調整OR 10.2, 95%CI = 1.97 - 52.8, $P < 0.01$)、持込みIgA沈着症やMMF血中濃度とは関連しなかった。結論として、原疾患がIgA腎症である場合、移植腎機能低値のレシピエントでは再発性IgA沈着症が認められやすいことが考えられた。



(3) 動物実験では、p21-KO マウスによる検討を行った。

p21 は細胞周期停止(主に G1 期)に重要な役割を果たしている CDKI である。p21 が虚血刺激後早期から誘導されることに着目し、虚血性障害における CDKI の役割と AKI に対する耐性との関連性を検討した。虚血再灌流障害による腎障害は、野生型マウスと比べて、p21-KO マウスにおいて更に増強された。虚血プレコンディショニングとして5分間の虚血及び虚血解除を4サイクル施行した。虚血プレコンディショニングは野生型マウスにおいて虚血再灌流障害を改善したが、p21-KO マウスでは無効であった。虚血プレコンディショニング直後の細胞周期を flow cytometry および2光子レーザー顕微鏡による in vivo imaging により観測したところ、G1 期細胞の明らかな増加を認めた。腎間質の細胞を免疫染色及び in vivo imaging により評価したところ p21 発現の亢進及び G1 期細胞と Autophagy の亢進の関連が示唆された。このことから、p21 は虚血性急性腎障害における虚血プレコンディショニングによる保護効果発現に必須であり、虚血プレコンディショニングによる AKI から CKD への進展予防への可能性が示唆されたが、その作用は細胞老化とは独立した一時的な細胞周期停止とそれに続く回復性細胞増殖の活性化を介したものであると考えられた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文](計 23 件)

1. Sofue T, Inui M, Hara T, Moritoki M, Nishijima Y, Kushida Y, Nishiyama A, Kakehi Y and Kohno M. Association between post-transplant immunoglobulin A deposition and reduced allograft function. *Transplant Proc.* 査読有 47: 332-336, 2015. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.01.011.
2. Ohsaki H, Sofue T, Kawakami K, Nishijima Y, Hara T, Matsunaga T, Kushida Y, Haba R, Shigematsu Y, Irino S and Norimatsu Y. WT1 immunoenzyme staining using SurePathTM processed urine cytology helps detect kidney disease. *Cytopathology.* 査読有 In press, 2015 Feb 14. doi:10.1111/cyt.12227.
3. 西岡 里香, 祖父江 理, 守時政宏, 西島陽子, 西岡聡, 原大雅, 串田吉生, 上田修史, 筧善行, 河野雅和. 腎移植を契機に診断されたファブリー病へテロ接合体からヘミ接合体への生体腎移植症例 *日本内科学会雑誌* 2015;105(4): 775-780. 査読有
4. Sofue T, Hayashida Y, Hara T, Kawakami K, Ueda N, Kushida Y, Inui M, Dobashi H, Kakehi Y, and Kohno M. Plasmapheresis in a patient with antiphospholipid syndrome before living-donor kidney transplantation: a case

report. *BMC Nephrology* 167: 7, 2014.

doi: 10.1186/1471-2369-15-167. 査読有

5. Kamiyama M, Garner MK, Farragut KM, Sofue T, Hara T, Morikawa T, Konishi Y, Imanishi M, Nishiyama A, Kobori H. Detailed localization of augmented angiotensinogen mRNA and protein in proximal tubule segments of diabetic kidneys in rats and humans. *Int J Biol Sci.* 査読有 10: 530-42, 2014.

doi: 10.7150/ijbs.8450.

6. Nishioka S, Sofue T, Inui M, Nishijima Y, Moriwaki K, Hara T, Mashiba T, Kakehi Y, Kohno M. Mineral and Bone Disorder is Temporary in Patients Treated with Early Rapid Corticosteroid Reduction after Kidney Transplantation: A Single-Center Experience. *Transplant Proc.* 査読有 46: 514-20, 2014.

doi:10.1016/j.transproceed.2013.11.153.

7. Sofue T, Inui M, Hara T, Nishijima Y, Moriwaki K, Hayashida Y, Ueda N, Nishiyama A, Kakehi Y, Kohno M. The efficacy and safety of febuxostat in the treatment of hyperuricemia in stable kidney transplant recipients. *Drug Des Devel Ther.* 査読有 8: 245-253, 2014. doi:10.2147/DDDT.S56597.

8. Nishioka S, Nakano D, Kitada K, Sofue T, Ohsaki H, Moriwaki K, Hara T, Ohmori K, Kohno M, Nishiyama A. p21 is essential for the beneficial effects of renal ischemic preconditioning on renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Kidney Int* 85: 871-879, 2014.

doi: 10.1038/ki.2013.496. 査読有

9. Sofue T, Inui M, Hara T, Moriwaki K, Kushida Y, Nishiyama A, Kakehi Y, Kohno M. Short-term prognosis of living-donor kidney transplantation from hypertensive donors with high-normal albuminuria. *Transplantation* 97: 104-110, 2014.

doi: 10.1097/TP.0b013e3182a7d5b2. 査読有
10. 林田有史、山口佳津騎、西島陽子、祖父江理、北村悠樹、佐倉雄馬、加藤琢磨、平間裕美、常森寛行、上田修史、小坂信二、乾政志、杉元幹史、筧善行 腎移植維持期タクロリムス併用下における、ミコフェノール酸の血中濃度時間曲線下面積簡易推定法の検討 *日本臨床腎移植学会雑誌* 査読有 2: 169-173, 2014.

11. Hara T, Sofue T, Kohno M. Hemodialysis Arteriovenous Fistula Created From the Posterior Tibial Artery and a Saphenous Vein Branch. *Am J Kid Dis* 62: 1222-3, 2013.

doi: 10.1053/j.ajkd.2013.08.020. 査読有

12. Sofue T, Inui M, Hara T, Moritoki M, Nishioka S, Nishijima Y, Moriwaki K, Hayashida Y, Ueda N, Kushida Y, Haba R,

Nishiyama A, Kakehi Y, Kohno M. Latent IgA deposition from donor kidneys does not affect transplant prognosis, irrespective of mesangial expansion. *Clin Transplant* 27 (Suppl. 26): 14–21, 2013. doi: 10.1111/ctr.12158. 査読有

13. Sofue T, Inui M, Kiyomoto H, Moriwaki K, Hara T, Yamaguchi K, Fukuoka N, Banno K, Nishiyama A, Kakehi Y, Kohno M. Excess fluid distribution affects tacrolimus absorption in peritoneal dialysis patients. *Clin Exp Nephrol*. 査読有 17: 743-749, 2013. doi: 10.1007/s10157-012-0764-6.

14. Yamaguchi K, Fukuoka N, Kimura S, Watanabe M, Tani K, Tanaka H, Sofue T, Kosaka S, Inui M, Kakehi Y, Houchi H. Limited Sampling Strategy for the Estimation of Mycophenolic Acid Area Under the Concentration-Time Curve Treated in Japanese Living-Related Renal Transplant Recipients with Concomitant Extended-Release Tacrolimus. *Biol Pharm Bull*. 査読有 36: 1036-9, 2013. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b12-01095>.

15. 祖父江理、乾政志、原大雅、藤田拓郎、野上浩子、河上和代、守時政宏、西岡聡、西島陽子、森脇久美子、林田有史、上田修史、笈善行、河野雅和 当院におけるマージナルドナーからの腎移植成績. *日本臨床腎移植学会雑誌*. 1: 74-77, 2013. 査読有

16. Nishijima Y, Kobori H, Sofue T, Kaifu K, Moriwaki K, Hara T, Hitomi H, Kohno M, Nishiyama A. Important aspects of urine sampling for angiotensinogen measurement: time and preservation conditions in healthy individuals. *Tohoku J Exp Med*. 査読有 228: 333-9, 2012. <http://dx.doi.org/10.1620/tjem.228.333>.

17. Sofue T, Inui M, Kiyomoto H, Moritoki M, Nishioka S, Nishijima Y, Moriwaki K, Hara T, Kushida Y, Haba R, Yoda T, Hirao T, Kakehi Y, Nishiyama A, Kohno M. Pre-existing arteriosclerotic intimal thickening in living-donor kidneys reflects allograft function. *Am J Nephrol*. 査読有 36: 127-35, 2012. doi: 10.1159/000340035.

18. Sofue T, Kiyomoto H, Kobori H, Urushihara M, Nishijima Y, Kaifu K, Hara T, Matsumoto S, Ichimura A, Ohsaki H, Hitomi H, Kawachi H, Hayden MR, Whaley-Connell A, Sowers JR, Ito S, Kohno M, Nishiyama A. Early Treatment With Olmesartan Prevents Juxtamedullary Glomerular Podocyte Injury and the Onset of Microalbuminuria in Type 2 Diabetic Rats. *Am J Hypertens*. 25: 604-11, 2012. doi: 10.1038/ajh.2012.1. 査読有 [学会発表](計 80 件)

1. 祖父江理 再発腎炎の予防と対応 腎移

植認定医第 8 回集中教育セミナー(招待講演) 2014/2/6 ウエスティンナゴヤキャスル(愛知県)

2. 祖父江理 腎臓内科医の視点による腎移植医療(招待講演) 愛媛県臓器移植勉強会 2014/12/6 愛媛県立衛生環境研究所(愛媛県)

3. Hiroyuki Ohsaki, Tadashi Sofue, Kazuyo Kawakami, Toru Matsunaga, Yoshio Kushida, Reiji Haba, Yumie Shigematsu, Yoshiaki Norimatsu. URINARY WT1-POSITIVE CELLS CAN DETECT SOME KINDS OF KIDNEY DISEASE 38th European Congress of Cytology 2014.9.27 Geneva (Italy)

4. 祖父江理、河野雅和 シンポジスト 血液透析患者の脳卒中 第 59 回日本透析医学会総会(招待講演) 2014.6.14 パシフィコ横浜(神奈川県)

5. Sofue Tadashi, Inui Masashi, Hara Taiga, Nishijima Yoko, Moriwaki Kumiko, Hayashida Yushi, Ueda Nobufumi, Nishiyama Akira, Kakehi Yoshiyuki, Kohno Masakazu. The efficacy and safety of Febuxostat in the treatment of post-transplant hyperuricemia in stable kidney transplant recipients. The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology 2014.5.17 品川プリンスホテル(東京都)

6. 祖父江理、乾政志、林田有史、上田修史、笈善行、河野雅和 腎移植後の IgA 再沈着と移植腎機能との関連に関する検討(会長要望演題) 第 49 回日本移植学会総会 2013.9.7 国立京都国際会館(京都府)

7. Tadashi Sofue, Masashi Inui, Taiga Hara, Yoshio Kushida, Akira Nishiyama, Yoshiyuki Kakehi and Masakazu Kohno. Acceptable prognosis of living-donor kidney transplantation from hypertensive donors with high normal albuminuria. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation. 2013.9.3 国立京都国際会館(京都府)

8. 戸井田 達典、祖父江理、高安 真美子、雛元 紀和、岩崎 昌樹、野村 篤史、原 由紀子、内藤 省太郎 ドライウエイト(DW)設定についての透析医に対する自記式調査票による実態調査 第 58 回日本透析医学会学術集会 2013.6.22 福岡国際会議場(福岡県)

9. 祖父江理、乾 政志、原 大雅、守時政宏、西岡 聡、西島 陽子、森脇 久美子、串田 吉生、笈 善行、西山 成、河野 雅和高血圧性腎硬化症は正常高値アルブミン尿の時点から出現する～高血圧合併生体腎移植ドナーの病理組織解析からの検討～ 第 2 回臨床高血圧フォーラム 2013.5.26 JP タワーホール & カンファレンス(東京都)

10. 祖父江理 摘出時のドナー腎生検における軽微な動脈硬化病変は移植腎機能予測

因子である 第 8 回中国・四国 Vascular フォーラム 2012.12.14 岡山コンベンションセンター (岡山県)

11. 祖父江理 内科医における移植腎病理研究の方向性 第 11 回包括的腎不全医療研究会(招待講演) 2012.11.16 ウノサワ東急ビル (東京都)

12. 祖父江理、乾 政志、守時政宏、西岡 聡、西島陽子、森脇久美子、原 大雅、河野雅和 当院におけるマージナルドナーからの腎移植成績に関する検討 第 46 回四国透析療法研究会 2012.10.7 サンポート高松 (香川県)

13. 祖父江理、乾 政志、守時政宏、西岡 聡、西島陽子、海部久美子、原 大雅、串田吉生、河野雅和、西山 成 当院における糖尿病性腎症に対する生体腎移植成績 第 48 回日本移植学会総会 2012.9.20 愛知県産業労働センター (愛知県)

14. Satoshi Nishioka, Daisuke Nakano, Kento Kitada, Hiroyuki Ohsaki, Tadashi Sofue, Akira Nishiyama, Masakazu Kohno, P21 plays a protective role against renal ischemia reperfusion injury and is an essential factor for ischemic preconditioning, 66th High Blood Pressure Research Conference 2012, 2012.9, Washington DC (USA)

15. 祖父江理 持ち込み IgA 沈着症の成因と消失に關与する因子の検討 移植腎病理研究会・第 16 回学術集会 2012.7.21 都市センターホテル (東京都)

〔図書〕(計 6 件)

1. 祖父江理 腎移植における敗血症の予防、ニーズ 敗血症の診断/治療の実状と病態・メカニズムをふまえた開発戦略・治療薬、診断薬・試薬、医療機器・装置、技術情報協会. 2013. 614-617.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

香川大学医学部附属病院 腎臓内科ホームページ

<http://www.kms.ac.jp/~ninai/kidneygroup/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

祖父江 理(TADASHI SOFUE)

香川大学医学部 循環器・腎臓・脳卒中内科 助教

研究者番号：80452671