

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月27日現在

機関番号： 33303
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22590902
 研究課題名（和文）
 腎移植コホートにおける機能分子発現と治療効果に関するプロテオーム解析
 研究課題名（英文）
 Molecular analyses related therapeutic outcomes in renal allograft recipients
 研究代表者
 横山 仁（YOKOYAMA HITOSHI）
 金沢医科大学・医学部・教授
 研究者番号： 50191531

研究成果の概要（和文）：

腎移植コホート（移植腎症）120例の経時的な臨床病理学的所見プロファイルと臨床資料を作成し、前向き調査を実施した。多変量解析によりアディポサイトカイン（高・中・低）の分子量変化ならびにHLA-Gの慢性移植腎症への関与とアンジオテンシン受容体遮断薬による移植腎保護効果が確認された。また、腎生検組織を用いた免疫組織学的検討により移植腎における組織線維化に先行した急性期のfibrocytes浸潤を認めると同時に慢性期の線維化過程における血管周皮細胞(pericytes)の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We constructed prospectively the renal allograft recipient cohort including 120 subjects since 2007. We revealed the correlation between renal allograft function and the alteration of low-molecular weight adiponectin, the expression of non-classical HLA-G and clinical use of angiotensin-receptor blockers. We also found fibrocytes infiltration in acute ischemia-reperfusion injury of allografts and the activation of pericytes in interstitial fibrosis of chronic allograft injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000円
2011年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
2012年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
総計	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学（腎臓学）

キーワード：

- (1) 腎移植 (2) 疾患コホート (3) アディポサイトカイン (4) HLA-G (5) ケモカイン
(6) アンジオテンシン受容体遮断薬

1. 研究開始当初の背景

腎糸球体ならびに間質障害におけるサイトカイン・ケモカイン発現とこれらの発現と密接に関連するシグナル伝達分子(マップキナーゼ(MAPK)ことに p38MAPK)に対する動物実験を用いた抗サイトカイン・ケモカイン療法の基礎的検討により、これら機能分子が腎障害進展予防の重要な治療標的分子で

あることを示した(AJKD2001, JASN2003/2004)。さらに腎炎・ネフローゼ症候群の臨床病理学的検討により、ヒトにおいても臨床的な予後不良例において、かかる分子が発現していることを報告してきた(NDT2002, Nephron2004, AJKD2005)。くわえて、腎疾患共通の進行因子として間質細胞浸潤と線維化に関して特化した血管内皮

細胞を有する High endothelial venule (HEV) 様血管が皮髄境界部分に存在することを指摘した(AJN2002, PNAS2006). これと関連して IP-10/CXCR3 が間質線維化過程においても重要であることを報告した(AJN2007). さらに, 各種腎疾患におけるプロテオーム解析を進め, 治療薬におけるプロファイル変化を確認してきた(AJN2006).

これまで腎移植では, 急性拒絶としての細胞性免疫および抗体による液性免疫反応が注目されその病態解析が進められ, 臨床的にも移植医療の進歩につながっている(AJN2006, CT2008). 一方, 慢性移植腎障害の解析では免疫性因子(特に抗 HLA 抗体)および非免疫性因子のいずれもが重要であると推測されてきた. これまで動物モデルにおいて基礎実験を続けてきたが, ヒト慢性移植腎障害の治療と結びつく研究はいまだ不十分である.

2. 研究の目的

2007-2009 年度に作成した難治性ネフローゼ症候群・急速進行性腎炎症候群ならびに慢性移植腎症の疾患コホートから腎移植 120 症例を抽出した新たな前向きコホートを作成し, 経時的な血清のプロテオーム解析とともに移植前後の免疫モニタリングと経時的腎生検による機能分子を解析する. これと同時に, 慢性移植腎障害の進展予防における脂質とアディポネクチン(ADPN)を総合的に検討する. 以上より, これまで移植腎症への関与が推測されてきた各種分子を含めてプロテオミクス技術を用いて網羅的に判別し, 遺伝的背景因子と免疫抑制薬などの治療因子から予後改善と結びつく機能分子を臨床経過に基づき特定し, 新たな治療法開発の可能性を探索する.

3. 研究の方法

(1) 移植腎症の疾患コホート作成と解析:

① 金沢医科大学において腎移植および腎生検が実施された移植腎症(124 例)を対象とする疾患コホートに関して腎生検時の臨床病理所見を中心にプロファイルを作成する.

② 作成したコホート症例のこれまでの臨床所見に関して, 後向き調査を実施する. 予後調査成績ならびに測定指標を用いた多変量解析を実施し, 各因子の腎機能ならびに生命予後に関する解析を実施する.

③ コホート作成例と新たに追加された症例を含めて, 登録時点からの前向き調査の対象とする.

(2) 臨床病理学的診断における免疫担当細胞ならびに病変部血管の意義:

ヒト移植腎生検組織の病理ならびに免疫組織学的検討について, 作成したコホート症例における生検組織の糸球体ならびに間質病変に関して画像解析装置を用いたスコア化を実施する. さらに同一標本において特異的抗体を用いた免疫組織化学法により免疫担当細胞(マクロファージ, 樹状細胞ならびにTリンパ球)の浸潤を糸球体ならびに間質病変を中心に検討する. さらにケモカインとその受容体発現も検出する.

同時に最近注目されている間質線維化と関連する circulating fibrocytes の浸潤とこの浸潤部位と考えられている High endothelial venule(HEV)様血管におけるケモカイン(SLC)発現の経時的变化に関して腎生検組織を用いて明らかとする.

(3) ヒト移植腎症における血清・尿中機能分子の経時的測定:

ヒト腎組織内における細胞内シグナル伝達分子と対応する機能分子として, サイトカイン・ケモカインを指標とした高感度免疫蛍光抗体測定・解析システム(R&D system, Proteome Profiler)で解析する.

(4) 腎移植時の免疫モニタリングとその評価:

前向き疾患コホートとして作成した腎移植症例における末梢血細胞を用いた免疫モニタリングを行い, 臨床経過と比較を行う(臨床に関しては担当主治医チームが実施する.)

① 末梢血リンパ球/NK/マクロファージにおいて Th1, Th2, Th17, Treg(Foxp3+) サブセットの変化をフローサイトメトリー法により評価する.

② *In vitro* 刺激下の末梢血リンパ球サイトカイン(TNF- α , γ -IFN, IL-17)産生能を評価する.

③ non classical HLA 分子を中心に, 血清・尿中分子のプロテオームを解析する.

4. 研究成果

(1) 腎移植コホートの作成と影響因子の検討

腎移植を実施した 120 例を抽出して新たな前向きコホートとして基礎プロファイルを作成し, これまでの予後調査成績ならびに測定指標を用いた多変量解析を実施した(表 1). なお, 日本人における推算糸球体濾過率は, $eGFR=194 \times SCr^{-1.094} \times Age^{-0.287} \times 0.739$, if female を用いて算出した.

表 1 : 移植腎コホート 120 例の臨床データ

Variable	Total	Living	Cadaveric	P
N	120	97	23	
Gender male : female	77:43	65:32	12:11	NS
Age mean, year	46±10	46±10	50±9	NS
HLA mismatches, median (range)				
HLA-A/B	2(0-4)	2(0-4)	2(0-4)	NS
HLA-DR	1(0-2)	1(0-2)	0(0-2)	0.05
Time after Tx, month	176±87	193±85	104±47	0.01
eGFR, ml/min/1.73m ²				
Total	50.3±18.5	50.6±19.2	49.0±15.7	NS
Male	53.5±19.1	53.8±19.7	51.5±16.3	NS
Female	44.6±16.1	44.1±16.6	46.3±15.2	NS
Body mass index (BMI)	21.0±2.8	21.0±2.7	21.5±3.1	
Blood pressure, mmHg				
Systolic	125±13	125±13	123±13	NS
Diastolic	77±10	78±10	72±9	NS
Blood chemistry				
Glucose, mg/dL	110±25	109±26	112±21	NS
HbA1c, %, n:28	6.4±0.9	6.4±1.0	6.5±0.3	NS
Total Cholesterol mg/dL	205±34	204±36	205±22	NS
LDL-C mg/dL, n:117	118±29	120±30	108±24	NS
HDL-C mg/dL, n:117	66±18	64±17	73±21	0.05
LDL-C/HDL-C ratio	1.95±0.78	2.04±0.80	1.61±0.59	0.05
Adiponectin mg/mL	13.1±6.3	12.5±6.0	15.7±6.6	0.01
Male, n:75	11.9±5.7	11.6±5.8	13.7±5.1	NS
Female, n: 42	15.2±6.7**	14.2±6.2*	17.8±7.6	NS
Urinalysis				
Proteinuria	—	88 (73.3%)	70 (72.2%)	17 (73.9%)
±	13 (10.8%)	11 (11.3%)	2 (8.7%)	NS
1+	7(5.8%)	6(6.2%)	1(4.3%)	NS
> 2+	13 (10.8%)	10 (10.3%)	3 (13.0%)	NS
Hematuria > 1+	28 (23.3%)	20(20.6%)	8(34.8%)	NS
Therapeutic agents (Drug use, %)				
Immunosuppressive drugs				
Steroids	120(100%)	97(100%)	23(100%)	NS
Antimetabolites	115(96%)	94(97%)	21(91%)	NS
Calcineurin inhibitors	80(67%)	57(59%)	23(100%)	0.01
Antihypertensive drugs	103(86%)	83(86%)	20(87%)	NS
ACEi/ARB	52(43%)	42(43%)	10(44%)	NS
Antidiabetic drugs	10(8%)	6(6%)	4(17%)	NS
Insulin	5(4%)	3(3%)	2(9%)	NS
Oral antidiabetic drugs	5(4%)	3(3%)	2(9%)	NS
Statins	49(41%)	38(39%)	11(48%)	0.05

(Tx, transplantation; Mean ± SD, * p<0.05, ** p<0.01; NS, not significant)

移植腎機能に影響する因子として、献腎移植、スタチン使用が腎保護的に作用する一方、観察開始時の腎機能 (eGFR) と総 ADPN (model1) もしくは高分子 ADPN (model2) が低下促進因子として抽出され、腎機能と ADPN 濃度との間に「逆説的關係」を認めた (表 2)。

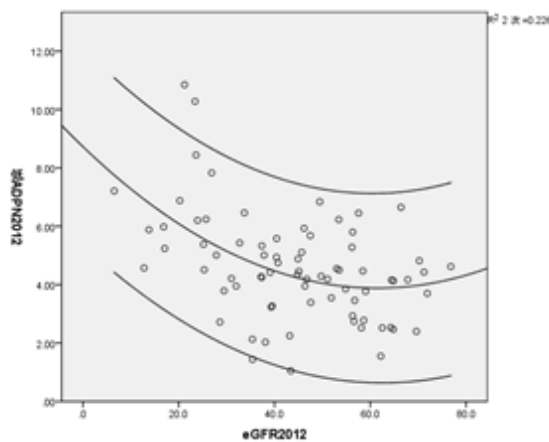


図 1 : eGFR と低分子 ADPN との関係

表 2 : 移植腎機能に影響する因子の多変量解析結果

Table : Construction of the estimated equation for the decline in eGFR					
Model 1	B	SE	beta	t	p
(Constant)	-3.748	2.936	-	-1.276	0.205
Donor cadaver/living (2:1)	2.138	0.774	0.236	2.763	0.007
Statins (yes: 1)	1.423	0.632	0.191	2.250	0.027
LDL-C/HDL-C ratio >2.0 (yes: 1)	-2.543	0.673	-0.342	-3.779	<0.001
BMI	0.273	0.112	0.208	2.446	0.016
eGFR at initial	-0.047	0.018	-0.226	-2.632	0.010
ADPN	-0.108	0.054	-0.184	-1.997	0.048
ΔeGFR (ml/min/1.73m ² per year) =					
-3.748					
+ 2.138 x [donor type] (if cadaveric donor, 2; if living donor, 1)					
+ 1.423 (if treated by statin)					
- 2.543 (if LDL/HDL ratio over 2.0)					
+ 0.273 x [BMI]					
- 0.047 x [eGFR]					
- 0.108 x [ADPN] (r=-0.570, p<0.001)					
Model 2	B	SE	beta	t	p
(Constant)	-0.905	0.921	-	-0.983	0.328
Donor cadaver/living (2:1)	1.481	0.774	0.286	3.106	0.002
eGFR at 2004	-0.039	0.011	-0.333	-3.565	0.001
High molecular weight ADPN	-0.124	0.057	-0.204	-2.187	0.031
ΔeGFR (ml/min/1.73m ² per year) =					
-0.905					
+ 1.481 x [donor type] (if cadaveric donor, 2; if living donor, 1)					
- 0.039 x [eGFR]					
- 0.124 x [High molecular weight ADPN]					
BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; ADPN, adiponectin					

一方、このコホート症例の中で 2004 年より 8 年の経過を確認できた 85 例の最近 4 年間の比較では、eGFR は、49.1 から 44.7 (-4.28 ml/min/1.73 m², p<0.001) へと低下するとともに、総・高・低分子 ADPN のいずれもが増加した。特に低分子 ADPN とその比率が腎機能低下とともに増加しており、血管・臓器保護的に働く高分子の相対的変化を認めないことを特徴とした (図 1)。この現象は移植腎組織における間質線維化と関連した。

(2) 腎移植前後の免疫モニタリング
腎移植時の免疫モニタリングでは、観察可能であった 6 例について Th1, Th2, Th17, Treg (Foxp3+) サブセットの変化をフローサイトメトリー法により評価するとともに non classical HLA (HLA-G5) 分子と比較した。移植後、末梢血リンパ球/NK/マクロファージにおいて NK 細胞の移植 3 カ月後までの有意な低下とこれと比例した血清 HLA-G5 分子の低下が観察された。なお、*In vitro* 刺激下の末梢血リンパ球サイトカイン (TNF-α, γ-IFN, IL-17) 産生能には、一定の傾向を認めなかった。

(3) 移植腎における HLA-G の保護効果
HLA-G は非古典的 HLA クラス 1 分子であり、その発現は移植片の寛容と関連し、拒絶反応

のエピソードが少ないとされている。日本人の腎移植における血清 HLA-G5 と予後との関連について、血清 HLA-G5 値と臨床的急性拒絶反応および eGFR 変化率とを比較し、年齢、性別、虚血時間、HLA mismatch 数などの移植時背景因子、血圧、脂質および治療薬（核酸合成阻害薬、カルシニューリン阻害薬、スタチン）で補正した。

血清 HLA-G5 値は 1.1-650.5U/mL であり、移植前より 3 ヶ月以上経時的に測定した 15 例では、移植後 1-8 週で前値より低下し、12 週以後は前値に復した（図 2）。血清 HLA-G5 高値群（55U/m 以上）では、臨床的急性拒絶反応が少ない傾向を示し、eGFR 変化率に対して HLA-G5 は独立した腎保護因子（標準化係数 β 0.168, $p=0.038$ ）であった。

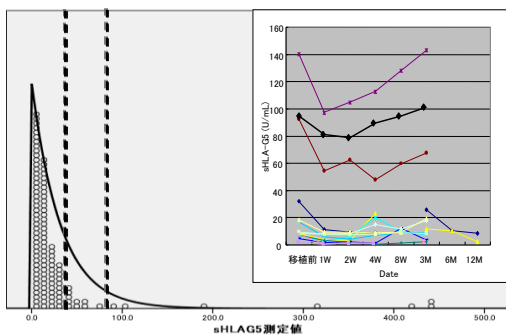


図 2：血清 HLA-G 値と腎移植時の変動

（4）降圧薬による移植腎保護効果の検討
観察中に脱落した 2 例と血清クレアチニン値 2.5 mg/dL 以上の 9 例を除外した 109 例（90.8%）を対象とした。治療薬として ARB（イルベサルタンもしくはロサルタン）が投与されていた 79 例について、移植腎機能および尿中アルブミン (Alb)・MCP-1 を測定した。48 週間の観察期間における eGFR 変化に対して投与前の尿中アルブミン量、eGFR、尿中 MCP-1 が有意な因子であり、移植腎においても糸球体および尿細管における障害と投与開始時の腎機能が重要であることが確認された。さらに、尿中 Alb 量変化に対しては、投与前尿中 Alb 量、非 HDL コレステロール、血圧降圧度、試験前スタチン使用と BMI が有意因子であった。また、尿中 MCP-1 の変化率は、尿中 Alb 変化とのみ正相関 ($R=0.251$) を示した。

治療薬として ARB が投与された 74 例と非投与対照群 15 例（I 群）について比較すると、新規 ARB 投与 40 例（II 群）で尿中 Alb が有意に低下し、多変量回帰分析で尿 Alb は Δ eGFR と相関していた（標準化係数 β 1.016, $p=0.01$ ）。さらに、ARB 継続投与 34 例（III 群）では、eGFR の低下が抑制された（図 3）。この観察コホートにおいて、ARB 長期投与による移植腎機能保護効果が示された。

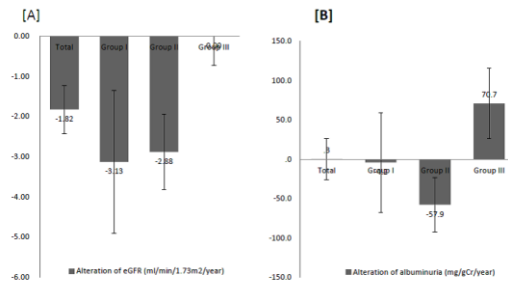


図 3：ARB による eGFR[A]と尿アルブミン値[B]の変化（I 群：ARB 非投与例，II 群：ARB 新規追加投与例，III 群：ARB 継続投与群）

（5）急性虚血再灌流障害と慢性移植腎障害における間質線維化の検討

今回作成した cohort における経時的移植腎生検 36 例・71 検体（生体腎移植 24 例・51 検体、献腎移植 12 例・20 検体）について移植腎間質線維化と fibrocytes を解析した。生検組織の間質病変に関しては、画像解析装置を用いたスコア化を実施し、circulating fibrocytes 浸潤および傍尿細管毛細血管周囲 (ptc) の線維化を比較した。腎移植生着例では、虚血再灌流障害によると考えられる fibrocytes が一過性に誘導されたが、それに伴う間質線維化の進行は軽度であった（図 4）。一方、慢性移植腎障害時の間質線維化では ptc における α SMA 陽性細胞 (pericytes) の関与が示唆された。

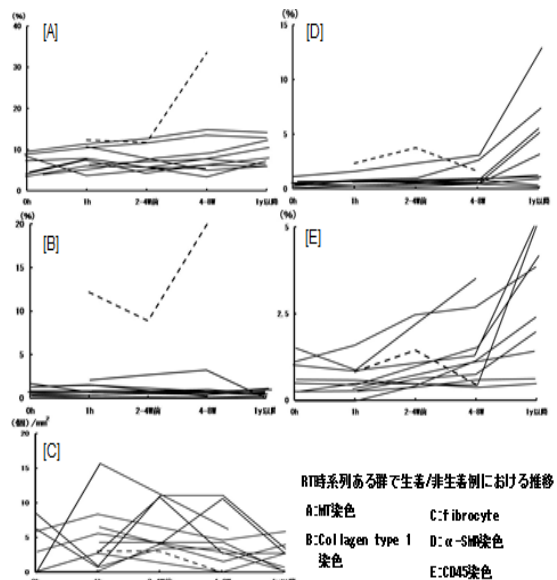


図 4：経時的移植腎生検における組織学的指標の経時変化（A：MT 染色線維化スコア，B：I 型膠原繊維スコア，C：fibrocytes スコア，D： α SMA 陽性スコア，E：CD45 陽性細胞スコア）

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 Y. Noborisaka, M. Ishizaki, Y. Yamada, R. Honda, Yokoyama H., M. Miyao, M. Tabata : The effects of continuing and discontinuing smoking on the development of chronic, Environ. Health Prevent. Med., 査読有, 18(1): 24-32, 2013.
- ② Yokoyama H., T. Taguchi, H. Sugiyama, H. Sato : Membranous nephropathy in Japan: analysis of the Japan Renal Biopsy Registry (J-RBR), Clin. Exp. Nephrol., 査読有, 16(4):557-563, 2012.
- ③ Yokoyama H., et al: Renal disease in the elderly and the very elderly Japanese: analysis of the Japan Renal Biopsy Registry (J-RBR), Clin. Exp. Nephrol., 査読有, 16(6):903-920, 2012.
- ④ Y. Noborisaka, M. Ishizaki, M. Nakata, Y. Yamada, R. Honda, Yokoyama H., M. Miyao, M. Tabata : Cigarette smoking, proteinuria, and renal function in middle-aged Japanese men from an occupational population, Environ. Health Prevent. Med., 査読有, 17:147-156, 2012.
- ⑤ S. Kimura, M. Asaka, H. Atsumi, J. Imura, K. Fujimoto, Y. Chikazawa, M. Nakagawa, H. Okuyama, H. Yamaya, Yokoyama H. : Circulating fibrocytes in ischemia-reperfusion injury and chronic renal allograft fibrosis, Nephron Clin. Pract., 査読有, 121(1-2): C16-24, 2012.
- ⑥ H. Sugiyama, Yokoyama H., H. Sato, T. Sito, Y. Kohda, S. Hishi, K. Tsuruya, H. Kiyomoto, H. Iida, T. Sasaki, M. Higuchi, M. Hattori, K. Oka, S. Kagami, M. Nagata, T. Kawamura, M. Honda, Y. Fukasawa, A. Fukatsu, K. Morozumi, N. Yoshikawa, Y. Yuzawa, S. Matsuo, Y. Kiyohara, K. Joh, T. Taguchi, H. Makino : Japan Renal Biopsy Registry: the first nationwide, web-based, and prospective registry system of renal biopsies in Japan, Clin Exp Nephrol, 査読有, 15:493-503, 2011.
- ⑦ Yokoyama H., H. Okuyama, H. Yamaya : Clinicopathological insights into lupus glomerulonephritis in Japanese and Asians, Clin Exp Nephrol, 査読有, 15 : 321-330, 2011.
- ⑧ K. Furuichi, Y. Hisada, M. Shimizu, T. Okumura, K. Kitagawa, K. Yoshimoto, Y. Iwata, H. Yokoyama, S. Kaneko, T. Wada : Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and membrane-type 1 MMP (MT1-MMP) affect the remodeling of glomerulosclerosis in diabetic OLETF rats, Nephrol. Dial. Transplant., 査読有, 26:3124-3131, 2011.
- ⑨ A. Saito, Y. Matsumoto, H. Okuyama, M. Asaka, Yokoyama H. : Effectiveness of weekly percutaneous maxacalcitol injection therapy in patients with secondary hyperparathyroidism, Ther Apher Dial, 査読有, 14:98-103, 2010.
- ⑩ I. Ishikawa, S. Hayama, K. Morita, T. Nakazawa, H. Yokoyama, R. Honda, K. Satoh, T. Kakuma : Long-term natural history of acquired cystic disease of the kidney, Ther Apher Dial, 査読有, 14:409-416, 2010.
- ⑪ H. Atsumi, M. Asaka, S. Kimura, J. Imura, K. Fujimoto, Y. Chikazawa, M. Nakagawa, H. Okuyama, H. Yamaya, M. Moriyama, T. Tanaka, K. Suzuki, H. Yokoyama : A case of second renal transplantation with acute

antibody-mediated rejection complicated with BK virus nephropathy, Clin. Transplant., 査読有, 24:35-38, 2010.

〔学会発表〕(計3件)

①山谷秀喜, 松井佑樹, 林 憲史, 井村淳子, 藤本圭司, 羽山智之, 近澤芳寛, 中川 卓, 奥山 宏, 横山 仁: 腎移植患者におけるイルベサルタンとロサルタンの腎保護効果の検討, 第55回日本腎臓学会学術総会, (横浜, 2012.6) .

②S. Kimura, J. Imura, H. Atsumi, K. Fujimoto, Y. Chikazawa, M. Nakagawa, S. Hayama, H. Okuyama, H. Yamaya, H. Yokoyama: A new insight into circulating fibrocytes and peritubular pericytes in renal allograft nephropathy, XLVIII ERA-EDTA Congress, (Prague, 2011.6).

③H. Yamaya, H. Adachi, S. Kimura, M. Asaka, H. Yokoyama: Statins and lower LDL-C/HDL-C ratio preserved the function of transplanted kidneys under controlled blood pressure, The kidney and the vascular system:emerging culprits in pathogenesis and advances in therapy, (Kyoto, 2010. 4).

〔図書〕(計3件)

①横山 仁, 杉山 斉, 佐藤 博, 今井圓裕, 医学ジャーナル, 変革する透析医学, 2章 保存期慢性腎臓病 (CKD)管理の意義と重要性
1. 保存期 CKD 管理の現状, 2012, 28-33

②横山 仁, 中外医学社, Annual Review 腎臓 2012, II. Basic nephrology D. 検査・診断 1.腎臓病総合レジストリーの登録および二次研究の状況, 2012, 87-92

③横山 仁, 中外医学社, Annual Review 腎臓 2010, III. 腎炎・ネフローゼ 1.ヒト膜性腎症の原因抗原: neutral endopeptidase と M-type phospholipase A₂ receptor, 2010, 84-89

6. 研究組織

(1)研究代表者

横山 仁 (YOKOYAMA HITOSHI)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50191531

(2)研究分担者

中川 卓 (NAKAGAWA MASARU)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50319050
(平成 22-23 年度)
近澤 芳寛 (CHIKAZAWA YOSHIHIRO)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80329408
(平成 22-23 年度)