

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592385

研究課題名(和文) 献腎移植における移植腎予後と心機能を評価するバイオマーカーの確立

研究課題名(英文) Establishment of graft and cardiac biomarker after kidney transplantation from donors after cardiac death.

研究代表者

日下 守 (Kusaka, Mamoru)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：40309141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：献腎移植における移植腎予後と心機能を評価するバイオマーカーの開発を行う目的で、血清を用い解析を行った。献腎移植における移植腎予後を評価するバイオマーカーに関する研究ではNGAL、L-FABPならびにHMGB-1に着目し有用性について検討した。各々が心停止下献腎移植における移植腎機能回復のバイオマーカーとして有用であることを示した。心機能を評価するバイオマーカーに関する研究では、心不全マーカーである血清高感度トロポニンTとNT-proBNPに着目した。両者は移植腎機能回復に影響を受けるものの、心イベント発症の有無や、潜在的疾患のモニタリングを行う上で有用なバイオマーカーである事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated the usefulness of serum NGAL, L-FABP and HMGB-1 as potential biomarkers to predict early graft functional recovery of transplanted kidneys from donors after cardiac death(DCD). From our results suggested that serial monitoring of serum NGAL, L-FABP and HMGB-1 may predict graft recovery and the need for hemodialysis after a kidney transplantation from DCD. Cardiovascular morbidity and mortality are highly prevalent in kidney transplant recipients. Troponin T and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) are well known maker of cardiac dysfunction and is a strong predictor of mortality in dialysis patients. We evaluated the serum Troponin T and NT-proBNP as predictive biomarkers for the adverse cardiac events after KTx from DCD. From our results suggested that serial analysis of sTroponin T and sNT-proBNP, even though under the influence of graft recovery, may predict adverse cardiac events after kidney transplantation from DCD.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 泌尿器科学

キーワード：腎移植 バイオマーカー 循環器合併症 心機能 移植腎機能

1. 研究開始当初の背景

改正臓器移植法が実施され、本邦においても2010年7月以降脳死下臓器提供が徐々に増加しつつあるが、全世界規模でも臓器提供不足は依然深刻であり、腎移植の推進が社会的急務である。本邦では11,000人以上の献腎移植登録がなされているが、日本臓器移植ネットワークの報告によると2008年度に献腎移植を受けた患者は210例に過ぎず、献腎登録以後の待機期間は長く、成人の場合平均約15年3ヶ月の待機期間を要し、recipientは移植時に既に多くの合併症、特に循環器合併症を有している。脳死下臓器提供が徐々に進む一方、本邦で従来行われてきた心停止下の献腎提供(DCD)は従来通り行われることが予想されているが、その約4割は高齢者あるいは高血圧の既往、脳血管障害を死因とするExpanded Criteria Donor(ECD)からの腎提供である。生体腎移植と比較して厳しい状況下で実施されているDCD腎からの献腎移植において、移植後に移植腎機能が発現しない、primary non-function (PNF)が約5%存在することが知られている(Weber M, et al: *N Engl J Med* 347:248; 2006)。本邦ならびに当施設からの報告では、厳しい状況下でのDCDからの腎提供にもかかわらず、献腎移植成績は短期ならびに長期においても世界に誇る良好な成績を報告している(Hoshinaga K, Shiroki R, et al: *Clin. Transpl.* 1998:213; 1998)。当院では、1974年4月から現在に至るまで、264 donorから523腎を心停止下に摘出し、127例の献腎移植を行っている。当施設は心停止後、体内局所灌流冷却法(in situ cooling technique)を用いて機械灌流を行い良好な成績を報告しているが、本邦では最も多い腎提供施設であり、全体の約10%にのぼる(Kusaka M, et al. *Cell Transplantation* 2008)。しかし献腎移植において移植後早期は、移植腎機能発現が遅延し平均約2週間の維持透析期間を要し(delayed graft function (DGF)), PNFとともに移植後のrecipient管理が重要である。

移植前にrecipientは長期透析に伴う循環器疾患を中心とする多くの合併症を有しているが、donor factorに加えてrecipientの透析期間や移植術中の血圧などを含む循環動態、いわゆるrecipient factorがDGFのrisk factorとして知られている(Snoeijs MG, et al. *Am J Transplant.* 2007, Irish WD, et al. *Am J Transplant.* 2010)。移植腎の機能発現とともに、recipientは腎不全、溢水等に伴う心負荷から改善され、移植腎機能が安定している場合、持続的心負荷の原因となる内シャントも閉鎖することが可能となる。ただし、生体腎移植のように短期間に劇的に状況が改善される場合と、DGFを伴う献腎移植のように緩徐に回復する経過をたどる。術前から冠動脈狭窄や不整脈、心筋症など様々な合併症が存在する場合、移植腎機能回復目的で水負荷を行う場合、負荷可能な域値が少なく、容易に心不全状態に陥りやすい。

DCD腎における移植後の腎における変化は、一般的に組織学的特徴として急性尿管壊死(ATN)に伴い腎機能発現が遅延するが、発生機序はdonor因子に加えrecipient因子も深く関与し、両者の多因子を含み、確立した予防法がなく、移植腎短期ならびに長期予後に影響を及ぼし、慢性移植腎症(CAN)のrisk factorとなる。献腎移植における長期透析後の周術期心機能の変化と腎移植による改善の評価と、移植早期のgraftに引き起こされる病態を詳細に把握し、腎修復と再生の機序を解明し、両者の相互関連について検討を加える。

2. 研究の目的

本邦における心停止下献腎移植において、移植腎機能ならびに移植腎予後と循環器特に心機能を評価する新規バイオマーカーの開発を目的とする。腎ならびに心疾患で報告のある既存のバイオマーカーの検証に加え、新規にmiRNAを検討し関連する遺伝子の制御機構を解明する。移植腎組織を用いて遺伝子解析を行い、複数遺伝子を制御する作用を利用して、miRNAが献腎移植における移植腎での遺伝子変化を制御する機構を解明する。DGF, PNFを引き起こすrecipient factorを中心とする新たなバイオマーカーが確立されれば、献腎移植における長期透析後の移植前ならびに周術期の心機能を把握し、献腎移植登録から移植前に治療介入と評価を行うことが可能となる。本研究により迅速で簡便な新規バイオマーカーの開発を行うとともに、遺伝子制御を中心とする新たな治療、創薬開発を目指す。

3. 研究の方法

当施設で行った心停止下、脳死下献腎移植ならびに生体腎移植について、移植前と周術期ならびに安定期の血清と尿を解析する。心機能に関してはmedical record review (MRR)を行い、周術期心不全に対する追加治療の有無や心機能変化の評価を行う。心停止下献腎移植1時間生検を用いてmiRNA, mRNAに関して網羅的遺伝子解析を行い、生体腎移植群、脳死献腎移植各群と比較し、遺伝子制御の候補遺伝子を選択する。Target遺伝子については、real time RT-PCRを行い実験結果の確認を行う。選択したmiRNAが直接ターゲット遺伝子を抑制するかどうかの確認実験についてはin vitroで、ターゲット遺伝子を組み込んだplasmidを用いてluciferase活性を確認する。臨床応用に向けた基礎実験として、制御を行うべきmiRNAに対してはmiRNA inhibitorのtransfectionや抗体投与を行い、実際にターゲット遺伝子が抑制を受けない機構を確立する。

4. 研究成果

献腎移植における移植腎予後と心機能を評価

するバイオマーカーの開発を行う目的で、対象は研究開始時と比較し、症例が増加し、心停止下献腎移植 30 例、脳死下献腎移植 4 例、脳死下膵腎同時移植 5 例と生体腎移植 50 例、ならびに生体膵腎同時移植 2 例となった。移植腎予後を評価するバイオマーカーの開発を目的とし、移植前と周術期の各タイムポイントで、血清 L-FABP と Kim-1 について検討した。血清 L-FABP については、移植後いわゆる delayed graft function 群(DGF)、DGF で移植後 1 週間以上透析を要する群(DGF long)、移植後直ちに腎機能を発現する群(immediate function (IF))に分けて検討したところ移植後早期で DGF、DGF long は血清 L-FABP の有意な上昇を認めた。一方、Kim-1 については症例毎に移植前から高値を示す症例があり各臨床経過で再検討を要することが判明した。献腎移植における心機能を評価するバイオマーカーの開発を行う目的で、症例数は心停止下献腎移植 27 例、生体腎移植 29 例、脳死下献腎移植 4 例。移植前、移植後 1 か月、移植後 1 年の血清高感度トロポニン T と NT-proBNP を Elecsys immunoassay(Roche Diagnostics)を用いて測定した。心イベント発症の有無について比較検討した。移植前の高感度トロポニン T と NT-proBNP は各々 44.4 ± 4.9 pg/ml, 2058 ± 321 pg/ml と高値であり、移植後速やかに低下した。心停止下献腎移植では移植後 1 か月の高感度トロポニン T と NT-proBNP は各々 44.6 ± 5.0 pg/ml, 1670 ± 688 pg/ml と、生体腎移植と比較し、低下が緩徐であった。心イベント発症有の症例では、高感度トロポニン T と NT-proBNP は移植後 1 ヶ月で各々 57.2 ± 6.0 pg/ml, 4793 ± 2742 pg/ml と心イベント発症無の症例と比較し、高値を示した。心不全マーカーである血清高感度トロポニン T と NT-proBNP は、移植腎機能回復に影響を受けるものの、心イベント発症の有無や、潜在的な心疾患のモニタリングを行う上で有用なバイオマーカーである事が示唆された。移植腎予後に関するバイオマーカーの候補として HMGB-1 に関する検討を行ったところ、移植前の血清 HMGB-1 は 4.3 ± 0.5 ng/ml であった。献腎移植では移植後の変化が POD1: 6.6 ± 0.9 , POD2: 5.9 ± 0.8 , POD3: 5.1 ± 0.7 ng/ml であったのに対し生体腎移植では POD1: 5.2 ± 0.4 , POD2: 6.8 ± 0.4 , POD3: 5.7 ± 0.4 ng/ml と移植後のピークに相違が認められた。DGF 期間の相違による検討では DGF-S が POD1: 5.9 ± 1.1 , POD2: 5.1 ± 0.9 , POD3: 4.9 ± 1.0 ng/ml に対して DGF-L が POD1: 7.4 ± 1.8 , POD2: 7.0 ± 1.4 , POD3: 4.9 ± 1.2 ng/ml と高い傾向が認められた。さらに移植術直後の検討では献腎移植では 9.0 ± 1.0 ($p < 0.01$) と生体腎移植とを比較し有意な上昇を認めた。miRNA に関する検討では献腎移植腎内で発

現亢進する 17 つの遺伝子と発現低下する 3 つの遺伝子に着目した。詳細はここでは明らかとしないが、結果をもとに継続して血清中の miRNA の変化に着目し、研究を継続した。現在移植術直後の血清を用いて 45 サンプルに関して real time PCR による定量実験を行っている。具体的には内部標準 2 遺伝子 (rnu44,u6) と 13 候補遺伝子に解析を絞り、献腎移植ならびに生体腎移植直後の血清中にある miRNA と予後相関について検討している。

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. Kawai A, Kusaka M, Kitagawa F, Ishii J, Fukami N, Maruyama T, Sasaki H, R. Shiroyki, Kurahashi H, Hoshinaga K. Serum liver-type fatty acid-binding protein predicts recovery of graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. Clin Transplant 2014 (in press)(査読あり)
2. Kusaka M. Editorial Comment to Dual kidney transplantation from uncontrolled deceased donors after cardiac arrest: A possible option. Int. J. Urol. Vol.21(2)207 2014(査読あり)
3. 日下守, 星長清隆. [腎保存と臓器提供推進活動] 献腎採取と腎保存 腎と透析 75(1) 99-102 2013(査読なし)
4. 丸山通弘, 坪尚武, 大月和宣, 青山博道, 松本育子, 長谷川正行, 西郷健一, 浅野武秀, 伊藤泰平, 剣持敬, 日下守. 単孔式後腹膜鏡下移植用腎採取術日本臨床腎移植学会雑誌 1(2)206-208 2013(査読あり)
5. M Kusaka, F Iwamatsu, Y Kuroyanagi, et al. Serum Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin During the Early Postoperative Period Predicts the Recovery of Graft Function After Kidney Transplantation From Donors After Cardiac Death. J Urol. 187 2261-2267 2012(査読あり)
6. 日下守, 星長清隆 心停止下献腎移植におけるドナー評価・管理の現状と課題 Organ Biology, 19(1), 53-58, 2012(査読なし)
7. 河合昭浩, 日下守, 深見直彦 他, CMV 網膜炎に対してホスカルネットが著効した 1 例 腎移植症例集 2012 ; 66-68, 2012(査読あり)
8. 日下守, 星長清隆 「法改正後の移植の現状と問題点: 腎膵領域」脳死下献腎移植と心停止下献腎移植の現状と問題点 移植 Vol.47 (1) : 21-26 2012(査読なし)

9. 日下 守, 星長清隆 改正臓器移植法施行後の当院における変化: 提供病院において DAP を推進する移植医の立場から. 移植, 46: 485-489. 2011 (査読なし)
10. 日下 守 他 腎移植におけるバイオマーカー - 急性拒絶反応と献腎移植機能回復に対するバイオマーカーについて. 腎と透析, 70: 183-188. 2011 (査読なし)
11. 日下 守, 星長清隆 心停止ドナーからの献腎摘出法. 腎移植・血管外科, 23: 70-75. 2011 (査読なし)
〔学会発表〕(計 18 件)
1. Kusaka M, Kubota Y, Fukami N, Takenaka M, Sasaki H, Shiroki R, Kenmochi T, Hoshinaga K. Long-term graft survival retrieved from donors after cardiac death have been significantly improved in these two decades although the procurement technique remains unchanged during the three decades. American Transplant Congress 2013 (米国 シアトル)
2. Kusaka M, Kitagawa F, Junichi I, Fukami N, Takenaka M, Sasaki H, Shiroki R, Hoshinaga K. Cardiac Troponin T Predict Adverse Cardiac Event After Kidney Transplantation From Donors After Cardiac Death. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation 2013 (京都)
3. Kusaka M, Kawai A, Kitagawa F, Ishii J, Shiroki R, Kurahashi H, Hoshinaga K. Serum liver-type fatty acid binding protein during the early postoperative period predicts recovery of the graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. 16th Congress of The European Society for Organ Transplantation (オーストリア ウィーン)
4. Kusaka M, Kitagawa F, Ishii J, Fukami N, Takenaka M, Sasaki H, Shiroki R, Hoshinaga K. Serum NT-proBNP predict adverse cardiac event after kidney transplantation from donors after cardiac death. 16th Congress of The European Society for Organ Transplantation 2013 (オーストリア ウィーン)
5. 日下守, 深見直彦, 竹中政史, 丸山高広, 佐々木ひと美, 白木良一, 星長清隆 腎移植における心不全マーカー高感度トロポニン T と NT-proBNP の有用性 第 101 回日本泌尿器科学会総会 2013 (札幌)
6. 日下守, 深見直彦, 竹中政史, 伊藤泰平, 佐々木ひと美, 白木良一, 剣持敬, 星長清隆 腎移植における心不全マーカーの有用性 第 49 回日本移植学会総会 2013 (京都)
7. 日下守, 竹中政史, 深見直彦, 佐々木ひと美, 伊藤泰平, 剣持敬, 白木良一, 星長清隆 腎移植における血清 High-mobility Group Box-1 (HMGB-1) の経時変化 第 40 回日本臓器保存生物医学会学術集会 2013 (東京)
8. 日下守, 星長清隆 【シンポジウム】腎移植後の合併症と対策 心血管系疾患(CVD) 第 63 回日本泌尿器科学会中部総会 2013 (名古屋)
9. 日下守, 星長清隆 【シンポジウム】当院における献腎採取術の成績と現状 第 45 回日本臨床腎移植学会 2012 (千葉)
10. 河合昭浩, 日下守, 深見直彦, 丸山高広, 佐々木ひと美, 石川清仁, 白木良一, 星長清隆 心停止下献腎移植における血清 L-FABP の変化 第 100 回日本泌尿器科学会総会 2012 (横浜)
11. 日下守, 相川厚, 星長清隆 【卒後教育プログラム】脳死/心停止ドナーの管理と腎摘出法 第 100 回日本泌尿器科学会総会 2012 (横浜)
12. Kusaka M, Kubota Y, Kawai A, Fukami N, Sasaki H, Maruyama T, Shiroki R, Hoshinaga K. Should we Discard the Graft? Analysis of the Renal Grafts with a High Serum Creatinine Level at Cardiac Arrest Donated After Cardiac Death American Transplant Congress 2012 (米国 ボストン)
13. Kawai A, Kusaka M, Kitagawa F, Ishii J, Fukami N, Sasaki H, Maruyama T, Shiroki R, Hoshinaga K. Serum liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) during the early postoperative period predicts the recovery of graft function after kidney transplantation from donors cardiac death American Transplant Congress 2012 (米国 ボストン)
14. 日下守, 星長清隆 【シンポジウム】提供病院における移植医の立場から 近年の変化と今後の課題 第 48 回日本移植学会総会 2012 (名古屋)
15. Kusaka M, Kubota Y, Sasaki H, Maruyama T, Fukami N, Takenaka M, Shiroki R, Hoshinaga K. The Fate of 527 Renal Allografts Retrieved from Donors after Cardiac Death (Fujita Experience) The 42nd Annual Congress of the Korean Society for Transplantation 2012 (韓国 仁川)
16. Kusaka M, Kubota Y, Sasaki H, Maruyama T, Hayakawa K, Shiroki R, Sugitani A, Hoshinaga K. Delayed Graft Function Longer Than 10 Days is The critical risk factor for long term Graft Survival of kidney Transplantation from Donors after Cardiac Death. American Transplant Congress 2011 (米国 フィラデルフィア)
17. Kusaka M, Fukami N, Sasaki H, Maruyama T, Shiroki R, Hoshinaga K. Serial analysis of serum neutrophil gelatinase-associated

lipocalin (NGAL) predicts organ recovery from delayed graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. 12th Congress of the Asian Society of Transplantation, 2011 (米国 フィラデルフィア)

18. Kusaka M, Iwamatsu F, Nakaya M, Ichino M, Sasaki H, Maruyama T, Shiroki R, Kurahashi H, Hoshinaga K Delayed graft function longer than one week is the critical risk factor for long term graft survival of kidney transplantation from donors after cardiac death. 15th Congress of the European Society for Organ Transplantation, 2011 (スコットランド グラスゴー)

〔 図書 〕 (計 1 件)

Takashi Kenmochi, Takehide Asano, Naotake Akutsu, Taihei Ito, Mamoru Kusaka, Hoshinaga Kiyotaka Marginal Donors Part VI Kidney Transplantation DCD for Kidney Transplantation Springer 147-161 2014

〔 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

6 . 研究組織

- (1) 研究代表者 日下 守 (KUSAKA Mamoru)
藤田保健衛生大学 医学部 教授

研究者番号 : 40309141

- (2) 研究分担者 星長清隆 (HOSHINAGA Kiyotaka) 藤田保健衛生大学 医学部 教授

研究者番号 : 30229174

- (3) 研究分担者 白木良一 (SHIROKI Ryoichi) 藤田保健衛生大学 医学部 教授

研究者番号 : 70226330

- (4) 研究分担者 河合昭浩 (KAWAI Akihiro)
藤田保健衛生大学 医学部 助手

研究者番号 : 00617144