

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591199

研究課題名(和文)腎移植後急性拒絶反応の新規診断法の開発

研究課題名(英文)The development of novel diagnosis method for post-transplant acute rejection

研究代表者

西 慎一(Nishi, Shinichi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70251808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：移植腎急性拒絶反応の早期診断には血清クレアチニン以外の鋭敏な感度と特異度をもつ組織・尿中バイオマーカーが必要である。急性拒絶反応症例の腎生検組織における炎症性マーカーPTX-3の発現と尿中測定を検討した。急性拒絶反応症例の組織では、PTX-3が尿細管間質組織に5%以上陽性エリアが認められ、特にポーターライン症例でも5%以上陽性例はその後に急性拒絶反応を発症し腎機能悪化がみられることを証明した。

研究成果の概要(英文)：Major cause of graft dysfunction is acute rejection (AR) and it affects to the graft survival. Available markers with high sensitivity and specificity other than serum creatinine are necessary for early diagnosis of AR. We evaluated the histological expression of an inflammatory marker; petraxin-3(PTX-3) and the amount of urine (PTX)-3 in AR cases. In AR cases including border line cases, PTX-3 expression of 5% and more indicated the current AR expression or predicted the future incidence of AR in border line cases. Unfortunately urine PTX-3 did not elevate in AR and border line cases. Histological expression of PTX-3 is an available maker for early diagnosis of AR.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：急性拒絶反応 早期診断 petraxin-3(PTX-3) ポーターライン

1. 研究開始当初の背景

(1) 末期腎不全の腎代替療法は、血液透析、腹膜透析、腎移植に限定される。中でも生命予後、QOL、医療経済の全ての点において腎移植は最も優れている。しかし、海外と比較すると本邦の腎移植件数は少なく、生体腎移植が多いことも特徴である。よって、腎移植患者の長期予後成績を向上させることは重要な課題である。

(2) 移植腎の機能低下の主因は、抗体関連拒絶型急性拒絶反応と T 細胞型急性拒絶反応である。臨床的診断はマーカーとしては、血性クレアチニンが使用されるが、拒絶反応の確定診断には移植腎生検が必須である。しかし、必ずしも病態によっては移植腎生検が受けられない症例もある。また、腎生検診断においては、国際的な腎移植病理診断基準である Banff 分類があるが、拒絶反応診断に有用な組織学的マーカーは、傍尿細管毛細血管(PTC)への補体 C4d 沈着であるが、これも本邦において多い ABO 不適合腎移植は非特異的に陽性となるため、診断マーカーとして利用できない。そこで、病理学的かつ臨床的に有用な拒絶反応の診断マーカーの開発が望まれる状態である。

2. 研究の目的

(1) 我々は、局所産生炎症性マーカーである Pentraxin-3(PTX-3)に着目し、PTX-3 が急性拒絶反応を呈している腎生検組織に発現しているか検討した。

(2) また、尿中に PTX-3 が増加しているのか、この2点を検討することで、急性拒絶反応の診断マーカーとしての有用性を検討することを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 第一の研究として、ヒト組織における PTX-3 の急性拒絶反応マーカーとしての有用性を血液材料と移植腎生検組織で検討した。神戸大学及び新潟大学、二つの腎移植施設で過去および研究期間に移植を受けた症例を対象とした。また、神戸大学において ANCA 関連血管炎で治療入院した症例も対象とした。いずれも学内の倫理委員会にて臨床研究への承認を受けて研究を実施した。

プロトコール移植腎生検組織を対象組織として、免疫組織化学法にて PTX-3 の発現部位を同定した。また、拒絶反応に関して、血液によるドナー抗体検査、そして組織判定基準である Banff 分類を用いたポーターライン、抗体関連急性拒絶、T 細胞型急性拒絶への分類を行い、PTX-3 の発現量との関連を分析した

(2) 次に、PTX-3 の尿中排泄量を既存の血液用 PTX-3 ELISA キット、自組織で作成した PTX-3 ELISA キットにて測定を試みた。

(3) 最後に、発展的研究として当初予定していなかった、ANCA 関連血管炎症例の血液及び腎生検材料を用いて PTX-3 の発現と腎組織

障害の関連を検討した。

4. 研究成果

(1) 第一の研究の解析の結果では、移植時の 0 時間生検と比較して、ポーターライン、抗体関連あるいは T 細胞関連急性拒絶反応を呈している症例の腎組織内に PTX-3 発現が増加していた。0 間生検ではほとんど陽性所見が認められなかったが、ポーターライン以上の組織では、傍尿細管毛細血管周囲の腎間質エリアに陽性所見が認められた。浸潤しているリンパ球細胞などの炎症性細胞と間質膠原線維上に陽性所見が認められた。また、ポーターライン組織では、5%以上の組織エリアに PTX-3 が陽性であれば、その後、急性拒絶反応が発症する確率が高いことが判明した。PTX-3 発現量と腎機能は逆相関することも判明した。従って、腎組織内発現 PTX-3 は急性拒絶反応の予測マーカー、かつ重症度判定マーカーとして有用であることが判明した。

図 1. PTX-3 の発現部位

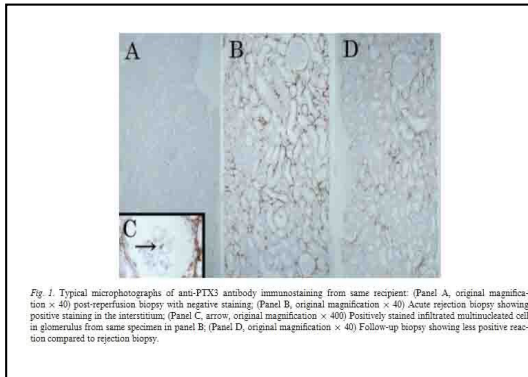


Fig. 1. Typical microphotographs of anti-PTX3 antibody immunostaining from same recipient: (Panel A, original magnification $\times 40$) post-perfusion biopsy with negative staining. (Panel B, original magnification $\times 40$) Acute rejection biopsy showing positive staining in the interstitium. (Panel C, arrow, original magnification $\times 400$) Positively stained infiltrated multinucleated cells in glomerulus from same specimen in panel B. (Panel D, original magnification $\times 40$) Follow-up biopsy showing less positive reaction compared to rejection biopsy.

図 2. 拒絶反応の有無と PTX3 の組織発現率

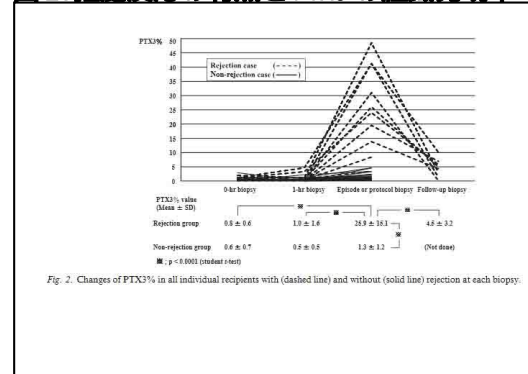


Fig. 2. Changes of PTX3% in all individual recipients with (dashed line) and without (solid line) rejection at each biopsy.

(2) 次に、尿中 PTX-3 測定用の ELISA キットの作成であるが、作成を試み測定を試みたが、成功しなかった。市販の血中 PTX-3 測定用の ELISA キットで、拒絶反応発症例の血中及び尿中 PTX-3 を測定したが、非発症時と比較して有意差は認められなかった。その理由として、腎移植患者に移植後はステロイド薬、免疫抑制薬を内服しており、このために血中及び尿中 PTX-3 の上昇に抑制が加わったのではないかと推測した。

(3) そこで、当初の研究計画にはなかったが、ANCA 関連血管炎症例における PTX-3 の血

中測定と腎生検組織での発現を検討した。ステロイド治療前の症例において、血中PTX-3を測定すると上昇しており、ステロイド治療を受けると低下することが判明した。興味深いことに、CRPが陰性のANCA関連血管炎症例が存在するが、そのような症例でもPTX-3の血中濃度は増加していた。また、ANCA関連血管炎症例の腎生検組織内のPTX-3の発現は、半月体形成部位、腎間質細胞への細胞浸潤領域と一致していた。このことより、ANCA関連血管炎症例において、血中PTX-3測定は、腎組織病変の広がりに関連する可能性が示唆された。今後は、対象症例を増やして、この課題も検討する予定である。

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16件)

今井直史, 西慎一, 高橋香, 伊藤由美, 吉田一浩, 河野恵美子, 田崎正行, 中川由紀, 齋藤和英, 高橋公太, 成田一衛, Pentraxin 3発現の, 抗体関連型拒絶反応発症ABO血液型不適合移植腎, 日本臨床腎移植学会誌, 査読有, in press, Vol.4, 2015, pp1 - 4

Risa Ishida, Kentaro Nakai, Hideki Fujii, Shunsuke Goto, Shigeo Hara, Naofumi Imai and Shinichi Nishi, Elevated Expression of Pentraxin 3 in Anti-neutrophil Cytoplasmic Antibody-associated Glomerulonephritis with Normal Serum C-reactive Protein, Internal Medicine, in pres, 査読有, Vol.54, 2015, pp1 - 5, DOI: 10.2169/internalmedicine.54.3815

Nishi S, Imai N, Yoshita K, Ito Y, Ueno M, Saeki T, Ultrastructural studies of IgG4-related kidney disease, Intern Med, 査読有, Vol.54, No2, 2015, pp147 - 153, doi: 10.2169/internalmedicine.54.2581. [Epub 2015]

Fujii H, Nakai K, Goto S, Nishi S, Clinical characteristics of very elderly patients at hemodialysis initiation, Intern Med, 査読有, Vol.54, No6, 2015, pp579 - 583, DOI: 10.2169/internalmedicine.54.3672. [Epub 2015]

Goto S, Nakai K, Ito J, Fujii H, Tasaki K, Suzuki T, Fukami K, Hara S, Nishi S, Marked elevation of serum hyaluronan levels in collagenofibrotic glomerulopathy, Intern Med, 査読有, Vol.53, No.16, 2014, pp1801 - 1804

Yonekura Y, Goto S, Sugiyama H, Kitamura H, Yokoyama H, Nishi S, The influences of larger physical constitutions including obesity on the

amount of urine protein excretion in primary glomerulonephritis: research of the Japan Renal Biopsy Registry, Clin Exp Nephrol, 査読有, 2014, [Epub ahead of print]

Goto S, Nakai K, Kono K, Yonekura Y, Ito J, Fujii H, Nishi S, Dietary phosphorus restriction by a standard low-protein diet decreased serum fibroblast growth factor 23 levels in patients with early and advanced stage chronic kidney disease. Clin Exp Nephrol, 査読有, Vol.18, No.6, 2014, pp925 - 931, DOI: 10.1007/s10157-014-0947-4.

西慎一, 先行的腎移植とは?, 泌尿器外科, 27巻, 2014, pp717 - 718

西慎一, 生体ドナーの安全性, 日本臨床腎移植学会雑誌, 査読有, Vol.2, No.1, 2014, pp23 - 28

Kono K, Fujii H, Nakai K, Goto S, Kitazawa R, Kitazawa S, Hirata M, Shinohara M, Fukagawa M, Nishi S, Anti-oxidative Effects of Vitamin D Analog on Incipient vascular Lesion in Non-obese Type 2 Diabetic Rats, Am J Nephrol, 査読有, Vol.37, No.2, 2013, pp167 - 174

Nakai K, Fujii H, Kono K, Goto S, Miura S, Maeda A, Takeda K, Nishi S, Parathyroid enlargement at dialysis initiation in patients with chronic kidney diseases, Ther Apher Dial, 査読有, Vol. 17, No.1, 2013, pp24 - 29

西慎一, 先行的腎移植, 日本腎臓学会誌, 査読有, Vol.55, No.2, 2013, pp119-124

Imai N, Nishi S, Yoshita K, Ito Y, Osawa Y, Takahashi K, Nakagawa Y, Saito K, Takahashi K, Narita I, Pentraxin-3 expression in acute renal allograft rejection, Clin Transplant, 査読有, Vol.26 Suppl 24, 2012, pp25 - 31.

Nishi S, Polyomavirus nephropathy-recent pathological diagnostic problems and the report from the 2011 Banff meeting: Clin Transplant, 査読有, Vol.26, No.24, 2012, pp9 - 12:

Imai N, Nishi S, Yoshita K, Ito Y, Osawa Y, Takahashi K, Nakagawa Y, Saito K, Takahashi K, Narita I. Pentraxin-3 expression in acute renal allograft rejection: Clin Transplant: 査読有, Vol.26, No.24, 2012, pp25 - 31

吉田一浩, 今井直史, 西慎一, 中川由紀, 齋藤和英, 高橋公太, 成田一衛, 腎臓におけるPentraxin3(PTX3)の発現と血中濃度の関係, 新潟県医師会報, 744巻, 2012, pp6 - 7

[学会発表](計10件)

西慎一, 藤井秀毅, 石村武志, 藤澤正人, 腎移植患者に及ぼす透析合併症

としての心血管系合併症, 第 47 回日本臨床移植学会: 2014.3.12, ホテル日航奈良(奈良県)

中井 健太郎, 西 慎一, 透析現場における腎移植患者をどの様に診療するか「透析室スタッフへの腎移植教育」, 第 59 回日本透析医学会学術集会・総会, 2014.6.14, 神戸国際会議場(兵庫県)

Yoshikawa M, Kitamura K, Kentaro N, Fujii H, Ishimura T, Fujisawa M, Nishi S, Pre-transplant desensitization and the outcome of kidney transplantation of IgA nephropathy, The 51th ERA-EDTA Congress, 2014.5.31, Amsterdam (The Netherlands)

Yoshikawa M, Nakai K, Goto S, Fujii H, Ishimura T, Fujisawa M, Nishi S, What kinds of graft/body size mismatches do influence the renal outcomes of recipients and donors? American Society of Nephrology, 2014.11.13, Philadelphia (USA)

吉川 美喜子, 後藤 俊介, 原 重雄, 石村 武志, 竹田 雅, 藤澤 正人, 西 慎一, 当院で施行された腎移植患者の体重変化と臨床的経過の検討, 第 46 回日本臨床移植学会, 2013.1.31, 東京ベイホテル(千葉県)

北村 謙, 西 慎一, 石村 武志, 竹田 雅, 藤沢 雅人, 移植前 ESA 反応性と移植後貧血の関連について, 第 46 回日本臨床移植学会, 2013.1.31, 東京ベイホテル(千葉県)

今井 直史, 西 慎一, 高橋 香, 吉田一浩, 伊藤 由美, 中川 由紀, 齋藤 和英, 高橋 公太, 成田 一衛: Pentraxin 3 (PTX3) 発見の ABO 不適合移植腎における意義, 第 46 回日本臨床移植学会, 2013.1.31, 東京ベイホテル(千葉県)

西 慎一, 先行的腎移植, 日本泌尿器科学会東部部会, 2013.10.18, 朱鷺メッセ新潟(新潟県)

Yoshikawa M, Nakai K, Goto S, Fujii H, Ishimura T, Takeda M, Fujisawa M, Nishi S, The Availability Pre-Operative Geriatric National Risk Index (GNRI) In Kidney Transplant Recipient, The 50th ERA-EDTA Congress, 2013.5.20, Istanbul (Turkey)

西 慎一, 長期生存・生着を更に改善する為に～内科医が活躍できる腎移植～, 第 42 回日本腎臓学会東部学術大会, 2012.10.13, 朱鷺メッセ新潟(新潟県)

〔図書〕(計 2 件)

今井 直史, 西 慎一, 吉田 一浩, 高橋香, 伊藤 由美, 大澤 豊, 中川 由紀, 齋藤 和英, 高橋 公太, 成田 一衛, 日本医学館, 腎移植患者の血中ペントラキシン, 腎移植症例集 2012, 2012, 363(101 - 103)

西 慎一, 文光堂, 免疫抑制療法(拒絶反応への対策も含めて), 2012, 218(307 -

310)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 慎一 (NISHI, SHINICHI)
神戸大学・大学院医学研究科・腎臓内科分門
教授

研究者番号: 70251808

(2) 研究分担者

齋藤 和英 (SAITO, KAZUhide)
新潟大学・大学院医学研究科・腎泌尿器病態
学分野 講師

研究者番号: 20262438

(3) 連携研究者

今井 直史 (IMAI, NAOFUMI)
新潟大学・大学院医学研究科・腎・膠原病内
科学 研究員

研究者番号: 50599165