

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461237

研究課題名(和文) 前向き腎移植コホートにおける慢性移植腎障害関連分子に関するプロテオミクス解析

研究課題名(英文) Molecular analyses of chronic renal allograft injuries

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：移植腎症(132例)を対象とする疾患コホートの臨床病理所見を中心としたプロファイルを作成した。高・低分子アディポネクチン変化は、腎機能ならびに心血管疾患および移植後糖尿病の独立関連因子であった。さらに、移植後糸球体硬化と間質線維化では、免疫組織学的検討により異なる膠原繊維の集積を明らかとした。腎移植時の免疫モニタリングでは、移植早期の末梢血リンパ球においてTh1, Th2, Th17, Treg(Foxp3+)サブセットおよびnon-classical HLA分子(可溶性HLA-G5)の早期変動を確認した。さらに、長期経過では、可溶性HLA-G5分子量と移植後eGFR変化率との関連を認めた。

研究成果の概要(英文)：We constructed the cohort of 132 renal allograft transplanted patients, and analyzed the outcomes of renal and actuarial survival. As the results, 1) Serum high- and low-molecular-weight adiponectin (ADPN) fractions were related to the development of both cardiovascular diseases and post-transplant diabetes, and renal allograft function. 2) The gamma-H2AX (a marker of double-strand DNA breaks) and Collagen type VI expression in renal allograft glomeruli were positively correlated with the duration of the post-renal transplant period. 3) The alteration of Th1, Th2, Th17, Treg (Foxp3+) subsets and non-classical HLA-G5 molecules were found in the early stage of allograft transplantation. In addition, higher serum HLA-G5 level was selected as a protective factor for renal allografts after 60 months.  
Conclusion: In Japanese renal allograft recipients, ADPN fractions and non-classical HLA -G molecules were significant factors for the long-term allograft survival and complications.

研究分野：医学

キーワード：腎移植 移植腎機能障害 アディポサイトカイン non-classical HLA分子 膠原繊維

## 1. 研究開始当初の背景

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。さらに、腎機能障害と関連する腎間質線維化との関連が注目されていた CD34 陽性 circulating fibrocytes の移植腎における急性期虚血再灌流障害改善への関与を明らかとした (Nephron Clin Practice 2012)。一方、慢性移植腎障害の要因については、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

2007-2012 年度に作成した慢性移植腎症の疾患コホートから 2013-2015 年度に追跡可能な腎移植 120 症例を抽出するとともに新たな症例を加えた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。これにより従来は急性移植腎拒絶との関連に注目されていた non-classical HLA ならびにメタボリック症候群等で重要と考えられている脂質関連アデポサイトカインの慢性期移植腎障害への関与を継続的に検討するとともにこれらの発現に関連する分子についてプロテオミクスを用いて網羅的に判別し、免疫抑制薬などの治療因子を加えた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:

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 (132 例) を対象とする疾患コホートにおいて、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。

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、non-classical HLA およびアデポサイトカインの腎機能ならびに生命予後に関する解析を実施する。

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を実施する。

### (2) ヒト移植腎生検組織の病理ならびに免疫組織学的検討:

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 non-classical HLA の発現を糸球体ならびに間質病変を中心に検討する。

### (3) ヒト移植腎症における抗 HLA 抗体と血清・尿中機能分子の経時的測定:

Flow PRA による HLA クラス およびクラス抗体のスクリーニングを行い、陽性症例に対して Luminex 法による single antigen 同定検査を施行する。

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・ケモカイン測定ならびにプロテオーム解析に関して、その経時的変化を臨床経過と対比して解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 移植腎症の疾患コホート作成と解析:

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疾患コホートの臨床病理所見について、移植腎症 (132 例) を対象とする疾患コホートの腎生検時臨床病理所見を中心としたプロファイルを作成し、後向き調査を実施した。

### (2) 経時的移植腎生検の免疫病理学的検討による間質線維化因子の評価 (長期観察 35 例):

臨床病理学的診断における病変部血管・線維化の意義について、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よる糸球体硬化と間質線維化を特異的抗体による免疫組織化学法によりその分子を同定し、画像解析装置を用いたスコア化を行った。糸球体および間質病変では、異なる膠原繊維の集積（それぞれ 型と 型）を認めた（図1）。

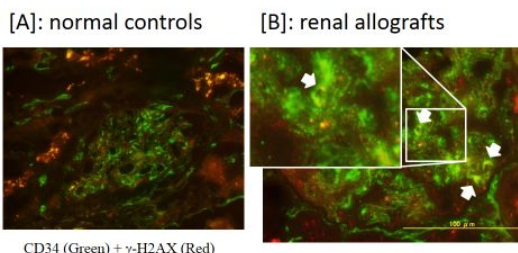


図1: 二重鎖 DNA 障害( $\gamma$ -H2AX発現)  
[A]:正常例(糸球体), [B]:長期移植腎障害例  
緑:CD34陽性内皮細胞, 赤:  $\gamma$ -H2AX陽性細胞核

糸球体における VI 型膠原繊維 (COLVI) 集積が、長期移植腎機能と関連し、移植後年数および二重鎖 DNA 障害( $\gamma$ -H2AX 発現)と強い正相関を認めた。この発現関連因子として非免疫学的機序では移植年数が最も関連する因子であった（図2）。

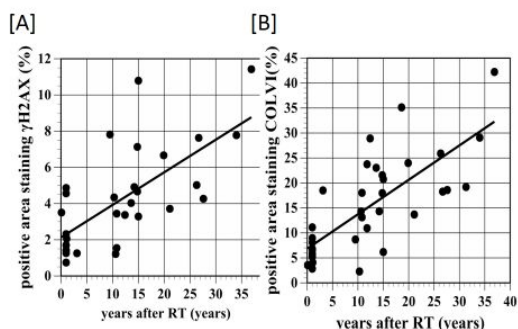


図2:  $\gamma$ -H2AXとCOLVI発現と移植年数  
[A]:  $\gamma$ -H2AX, [B]:COLVI

さらに、免疫学的機序として、抗 HLA クラス II およびクラス III 抗体陽性と関連した内皮細胞障害により惹起される慢性糸球体障害 (Cg)が最も重要であった(表1) (Clin Exp Nephrol on-line publication DOI 10.1007/s10157-015-1174-3)

表1: Multiple regression analysis of COLVI

《Stepwise Method》

Model	Relative factor	B	SE	$\beta$ value	t value	p value
①non-immune	移植後年数	0.590	0.123	0.679	4.800	p<0.001
②immune	Cg	5.558	2.520	0.363	2.206	p=0.035
③total	移植後年数	0.590	0.123	0.679	4.800	p<.0001

Model ①: non-immune factor  
性別、移植別、平均血圧、移植後年数、糖尿病合併、ドナー年齢、レシピエント年齢、蛋白尿定量、血尿定性、eGFR、CNI使用  
Model ②: immune factor  
ci, ct, cv, mm, ah, ptc, c4d染色性の有無(ABO不適合は陰性とする), DSAの有無  
Model ③: Total  
Model①+②

(3)血清・尿中機能分子の経時的解析による慢性移植腎症関連分子の特定:

慢性移植腎症関連分子として、血清低分子アデポネクチン (ADPN) の経時的増加による短期的腎機能に対する影響を見出した。さらに移植後3年以上生着し、血清クレアチニン値が 6mg/dl 以下の 57 例を対象として、年齢、性別、移植別、移植後期間、eGFR、血圧、LDL-C、HDL-C、血清総 ADPN、高分子および低分子量 ADPN、内臓および皮下脂肪面積、治療薬剤の関連について検討した。

Variable	Total	Living	Cadaveric
N	57	47	10
Gender: male: female	39:18	34:13	5:5
Age at transplantation, year	32.0(25.0-36.0)	29.0(22.8-35.0)	43.0(38.0-49.0)**
HLA mismatches, median (range)			
HLA-A/B	2(0-4)	2(0-4)	2(0-4)
HLA-DR	1(0-2)	1(0-2)	0(0-2)
Time after Tx, month	257(188-333)	266(204-344)	186(166-205)**
BMI	21.2(19.1-22.9)	21.2(19.0-23.7)	21.3(19.1-23.7)
Blood pressure, mmHg			
Systolic	126(120-132)	126(119-132)	126(124-128)
Diastolic	76(70-84)	76(70-84)	70(68-84)
eGFR at 2004(ml/min)	55.2(43.5-68.6)	54.8(42.8-66.1)	60.2(53.5-71.7)
eGFR at 2008(ml/min)	47.7(37.8-57.8)	44.6(38.1-57.3)	58.6(51.0-68.7)
eGFR at 2012(ml/min)	44.8(32.5-58.5)	42.1(32.1-57.9)	57.3(43.2-66.4)
eGFR(ml/min)	-2.8(-7.9-1.4)	-2.9(-8.2-1.3)	-2.4(-7.8-1.3)
Blood glucose(mg/dl)	101.0(90.8-117.5)	100.0(89.0-114.5)	110.5(100.0-128.0)
LDL-C mg/dl	104.0(86.8-123.5)	104(91.3-125)	88.5(75.0-119.0)
HDL-C mg/dl	63.0(53.0-81.8)	62.0(53-83.3)	69.5(57.0-79.0)
LDL-C/HDL-C ratio	1.68(1.19-2.15)	1.7(1.2-2.1)	1.4(1.04-2.43)
Triglyceride	146.0(101.8-208.5)	153(106-220)	314.0(101.0-167.0)
Total ADPN at 2012 ( $\mu$ g/ml)	10.1(6.5-14.9)	9.5(6.3-14.5)	11.3(6.6-15.9)
High weight molecular ( $\mu$ g/ml)	3.8(1.7-6.9)	3.6(1.8-6.8)	5.8(1.6-7.8)
Middle weight molecular( $\mu$ g/ml)	1.5(1.0-2.6)	1.5(1.1-2.6)	1.6(0.9-2.5)
Low weight molecular( $\mu$ g/ml)	4.3(3.2-5.3)	4.3(3.2-5.3)	4.4(2.9-5.9)
High-molecular ADPN ratio(%)	40.6(29.1-48.1)	39.9(30.3-47.4)	46.7(24.6-52.8)
Low-molecular ADPN ratio(%)	42.5(34.9-51.9)	43.9(34.8-51.7)	38.7(35.2-61.1)
Visceral fat area(cm <sup>2</sup> )	91.8(64.3-153.9)	82.3(60.1-133.4)	104.8(76.8-222.9)
Subcutaneous fat area(cm <sup>2</sup> )	96.2(57.3-131.4)	92.4(63.3-131.5)	15.1(46.9-142.1)
Therapeutic agents (Drug use, %)			
Immunosuppressive drugs			
Steroids	57(100%)	47(100%)	10(100%)
Antimetabolites	53(93%)	44(93%)	9(90%)
Calcineurin inhibitors	41(72%)	31(66%)	10(100%)**
ACEI/ARB	48(84%)	41(87%)	7(70%)
Anti-diabetic drugs	27(47%)	22(47%)	5(50%)
Insulin	1(2%)	1(2%)	0(0%)
Oral anti-diabetic drugs	8(14%)	8(17%)	0(0%)**
Statins	37(64%)	26(55%)	7(70%)
Cardiovascular disease	11(19%)	9(19%)	2(20%)
Angina pectoris	9(16%)	7(15%)	2(20%)
Aortic aneurysm	2(4%)	2(4%)	0(0%)
Cerebral infarction	1(2%)	1(2%)	0(0%)

eGFR と高・低分子量 ADPN とは、負の相関 ( $r=-0.415$ ,  $p=0.001$ ,  $r=-0.331$ ,  $p=0.012$ ) を示したが、高分子 ADPN 比率および低分子量 ADPN

比率とは関連しなかった (図 3)。

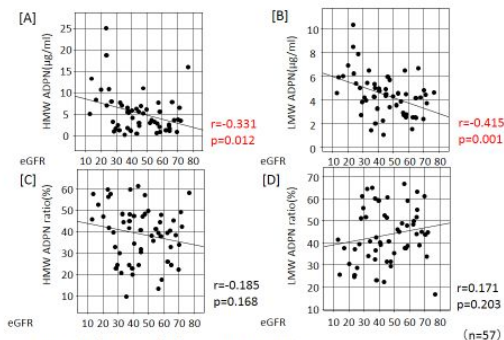


図3: 血清ADPN濃度とeGFRとの関係  
Serum HMW and LMW ADPN levels were negatively correlated with eGFR[A] and [B]. But HMW and LMW ADPN ratio were not significantly correlated with eGFR[C] and [D].

一方, ADPN に影響するとされる内臓脂肪面積は, 高・低分子量 ADPN と負の相関を認めた。これらについて, 高分子量 ADPN 比率増加は心血管障害の改善因子であったが, 低分子量 ADPN 比率の増加は, 移植後糖尿病発症に関与する事が判明した。以上より, ADPN 分子量比率の変化が長期移植腎機能および生命予後関連因子に影響する事が確認された(論文準備中)。

(4) 腎移植時の免疫モニタリングとその評価:

腎移植後 6 か月以内の non classical HLA (HLA-G5) 分子と末梢血リンパ球/NK/マクロファージ T リンパ球 (Th1, Th2, Th17, Treg(Foxp3+)) サブセットを検討し, 3 か月以内の早期の変動とそれ以後の正常化傾向を確認した。また, 長期観察においては, 可溶性 HLA-G5 分子量と移植後 eGFR 変化率 (低下率) との関連において改善因子である事が示された (図 4)。

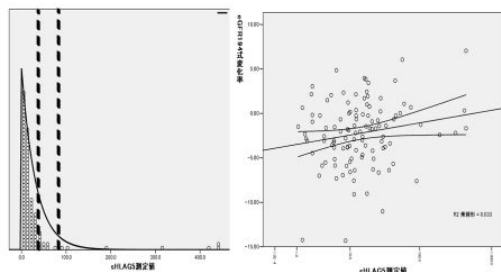


図4: 血清可溶性HLA-G5 とeGFR変化率

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3件)

Matsui Y, Sunatani Y, Hayashi N, Okino K, Okushi Y, Mukai K, Adachi H, Yamaya H, Iwabuchi K, Yokoyama H: DNA double-strand breaks induced intractable glomerular fibrosis in renal allografts. Clin Exp Nephrol in press 2016 査読有 DOI 10.1007/s10157-015-1174-3

Fujimoto K, Imura J, Atsumi H, Matsui Y, Adachi H, Okuyama H, Yamaya H, Yokoyama H: Clinical significance of serum and urinary soluble urokinase receptor (suPAR) in primary nephrotic syndrome and MPO-ANCA-associated glomerulonephritis in Japanese. Clin. Exp. Nephrol. 19:804-814, 2015. 査読有 DOI 10.1007/s10157-014-1067-x

Hayashi N, Akiyama S, Okuyama H, Matsui Y, Adachi H, Yamaya H, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Yokoyama H: Clinicopathological characteristics of M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R)-related membranous nephropathy in Japanese. Clin. Exp. Nephrol. 19:797-803, 2015. 査読有 DOI 10.1007/s10157-014-1064-0

(学会発表)(計5件)

Matsui Y, Hayashi N, Imura J, Fujimoto K, Adachi H, Yamaya H, Yokoyama H: DNA double strand breaks induced collagen type VI secretion of glomerular endothelial cells in renal allografts. The Annual of American Society of Nephrology (San Diego (USA) , 2015.11.7)

Adachi H, Matsui Y, Hayashi N, Fujimoto K, Imura J, Yamaya H,

Yokoyama H: Adiponectin fractions influences the development of cardiovascular disease in Japanese renal transplant recipients. The Annual of American Society of Nephrology (San Diego (USA) , 2015.11.7 )

Matsui Y, Sunatani Y, Iwabuchi K, Yokoyama H: DNA double strand breaks accelerated collagen type VI secretion of glomerular endothelial cells. ERA-EDTA Congress (London (UK) , 2015.5.30 ).

Matsui Y, Atsumi H, Imura J, Fujimoto K, Adachi H, Okuyama H, Yamaya H, Yokoyama H: DNA double strand brakes induced intractable glomerular fibrosis in renal allografts. The Annual of American Society of Nephrology (Philadelphia (USA) , 2014.11.15 ).

Adachi H, Atsumi H, Okuyama H, Yamaya H, Yokoyama H: Renoprotective effects of HDL-C and an adiponectin paradox in subjects with renal transplantation. WCN 2013 Satellite Symposium Kidney and Lipids ( ヒルトン福岡(福岡県 , 福岡市) , 2013.6.7 )

## 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

足立 浩樹 ( ADACHI , Hiroki )  
金沢医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 10350761

渥美 浩克 ( ATSUMI , Hirokatsu )  
金沢医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 70460342  
削除 : 平成 27 年 3 月 26 日