



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	腎移植の慢性抗体関連拒絶における新規尿中診断バイオマーカー、治療ターゲットORM1についての研究 [全文の要約]
Author(s)	樋口, はるか
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2401 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13022号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70547
Type	doctoral thesis
File Information	Haruka_Higuchi_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

腎移植の慢性抗体関連拒絶における新規尿中診断
バイオマーカー、治療ターゲット ORM1 についての研究

(Urinary ORM1 as a noninvasive biomarker and a
therapeutic target for chronic active antibody mediated
rejection in kidney allograft)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

樋口 はるか

Higuchi Haruka

【背景と目的】腎移植は末期腎不全に対する腎代替療法の選択肢のひとつであり、腎移植患者の生命予後は透析患者に比べて優位に優れていると報告されている。免疫抑制剤の進歩により、前時代と比較して移植腎生着率の目覚ましい改善を認めている。免疫抑制剤の発展により移植腎生着率が延長した一方で、移植後は半永久的な免疫抑制剤の内服が必要であり、免疫抑制と日和見感染のバランス、腎毒性、悪性腫瘍などが免疫抑制剤内服の大きなリスクとなっている。また、移植腎の急性拒絶の多くは治療可能になってきたものの、慢性抗体関連拒絶反応（chronic active antibody mediated rejection:CAAMR）の治療については十分な薬物療法が確立されておらず、移植腎喪失の原因となっている。CAAMRは腎機能増悪や尿蛋白陽性など臨床所見が乏しい症例でも組織学的な変化を来す場合があり、診断の gold standard は移植腎生検である。

当研究室ではこれまでに、局所における慢性炎症誘導の分子基盤として、線維芽細胞・血管内皮細胞などの非免疫細胞において、NF- κ B経路とSTAT3経路の同時活性化によりIL-6などの炎症性メディエーターの発現・産生が相乗的に増加し、臓器特異的な慢性炎症性疾患や自己免疫性疾患の病態形成の起点となるInflammation amplifier (IA)を見出した。この機構の活性化後に発現する主な機能分子はケモカインや成長因子であり、免疫細胞の局所集簇と局所細胞の増殖により病巣局所の恒常性が保たれなくなることであり、IL-6はSTAT3の活性化を維持する燃料のような役割を果たしている。また、臨床検体組織やいくつかの疾患モデルにおける細胞で、IAが活性化されており、この活性化をブロックすることにより疾患モデルにおける炎症を抑制することが報告されている。さらに、IAの活性化がヒト肺移植の慢性拒絶組織およびマウスの慢性拒絶モデルの発症に重要であることが見出された。当研究室では過去にshRNAライブラリを用いたゲノムワイドスクリーニング解析を行い、IAを正に制御する1,000以上の遺伝子群を同定し、これらの遺伝子群の中にヒト慢性炎症性疾患の関連遺伝子が含まれることを証明している。同遺伝子群の中から、可溶性分子であるORM1（オロソムコイド-1, α 1-アシドグリコプロテイン1）に着目した。ORM1は炎症の際に増加する急性期の血漿タンパク質である。ORM1は心不全、関節リウマチ、膀胱癌などの尿中で上昇することが報告されているが、その機序については明らかにされておらず、移植に関連した報告もない。IAの活性化のCAAMRへの関与を明らかにし、CAAMRの新たな診断および治療標的となりうるORM1の機能解析を行うことを目的として本研究を行った。

【対象と方法】2015年11月～2017年1月の期間に移植腎生検を施行した移植患者の血清と尿を北海道大学病院および市立札幌病院で収集した。移植患者の臨床データ（血清クレアチニン:S-Cre、CRP、尿蛋白、尿アルブミン、尿中N-acetyl- α -D-glucosaminidase:NAG、推定糸球体濾過量:eGFR）を分析した。尿中のORM1を酵素結合免疫吸着法（Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA）、血清ORM1を免疫比濁法で測定した。移植患者の腎生検組織の免疫組織化学染色を行い、リン酸化p65（pp65）、リン酸化STAT3（pSTAT3）、ORM1の発現について検討した。In vitro 実験としてヒト腎初代培養細胞：近位尿管上皮細胞（RPTEC）、糸球体血管内皮細胞、腎線維芽細胞、メサングウム細胞をサイトカインで刺激しIAの活性化を定量PCR（real time-quantitative polymerase chain reaction ; RT-PCR）

で評価した。IAの活性化に重要なNF- κ B経路及びSTAT3経路ORM1との関与について、RPTECをサイトカインおよびORM1で刺激し、RT-PCTと共焦点顕微鏡による解析を行った。また、in vivoの実験としてマウス炎症モデルを用いた関節炎誘導実験を行った。

【結果】病理診断により移植患者をNormal (n=17)、interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA, n=30)、CAAMR (n=17)の3群に分けて比較した。eGFRはNormalに比べてCAAMR群で有意に低かった。血清中のORM1、尿細管障害を反映する尿中NAGも差がなかったが、尿中クレアチニンで補正した尿中ORM1は他の2群に比してCAAMRで有意に高かった。この結果から尿中ORM1はCAAMRの診断バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

刺激した全てのヒト腎初代培養細胞ではIAが活性化された状態(NF- κ B経路とSTAT3経路の同時活性化条件)においてIL-6、CCL2などの産生がみられ、ヒト腎の非免疫細胞でもIAの活性化が起こることが証明された。移植腎生検組織の免疫染色ではNormalと比較してCAAMR患者の組織の尿細管細胞のbrush borderでORM1が強く発現した。Pp65とpSTAT3はNormalの組織でのpp65の発現が弱かったのに対して、CAAMRの尿細管でpp65、pSTAT3ともに強く発現していた。これらの結果から移植腎のCAAMRにおいてNF- κ BとSTAT3の同時活性化が関与しており、特に尿細管でORM1が重要な役割を果たしていることが示唆された。In vitroではRPTECでORM1をノックダウンするとIA活性化刺激によるサイトカインの産生は抑制された。また、RPTECをORM1で刺激するとIL-6またはORM1単独に比較してIL-6とORM1で共刺激した際にRT-PCRでサイトカインの産生が亢進した。共焦点顕微鏡でもNF- κ B p65の細胞質から核への移行が確認され、NF- κ Bのシグナルを増強させることが示唆された。CAAMRの動物モデルがないため、関節炎動物モデルで実験を行ったが、低用量のIL-6とIL-17の刺激では軽度の関節炎が誘発されたのに対して、ORM1を加えると強い炎症が惹起された。

【結論・考察】CAAMR患者の尿中でORM1が有意に高く検出され、尿中ORM1の検出はCAAMRの非侵襲的な診断バイオマーカーとなり得る。CAAMR患者の腎組織においてpNF- κ BとpSTAT3が尿細管で強く発現しており、ORM1がIAの活性化を介したCAAMRの発症に重要な働きをしていることが示唆された。RPTECにおいてORM1のノックダウンによりIAの活性化は阻害され、ORM1とIL-6の共刺激により活性化された。関節炎モデルマウスにでもORM1により関節炎が増悪することが示された。ORM1を介したIAの活性化を阻害することが、CAAMRの治療ターゲットとなる可能性がある。ORM1を介したIAの活性化を阻害することが、CAAMRの治療ターゲットとなる可能性がある。移植腎患者でも拒絶反応が進行した状態では血清、および尿中のIL-6が上昇することが報告されており、抗IL-6受容体モノクローナル抗体トシリズマブが近年CAAMRの治療薬として注目を集めている。今回のCAAMRとIAに関する発見は移植患者でのIL-6の上昇とCAAMRに対する抗IL-6受容体ブロックの有効性を説明することが可能であるひとつのメカニズムと言える。

【今後の展望と課題】CAAMR発症前、治療後のORM1の継続的な評価による発症予測因子、治療効果判定因子としての可能性についてのさらなる検索が望まれる。ORM1がどのようにNF- κ Bのシグナル経路に影響しているか、IAの活性化に至る正確なメカニズムを解明することは将来の研究課題である。ORM1のNF- κ Bのシグナルにおける更なるメカニズムの解

明により、より特異的な機序を治療ターゲットとすることで、副作用の少ない効率的かつ効果的な治療法への道が開ける。