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

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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-κB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, α1-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：近位尿細管上皮細胞(RPTEC)、糸球体血管内皮細胞、腎線維芽細胞、メサンギ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-κB 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-κB 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-κB 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-κB p65 の細胞質から核への移行が確認され、NF-κB 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-κB 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 の継時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-κB 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-κB 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。