



Mast cell numbers and protease expression patterns in biopsyspecimens following renal transplantation from living-relateddonors predict long-term graft function

石田, 敏郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3495

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003495>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 79 】

氏 名・（本 籍） 石田 敏郎 （ 兵庫県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1701号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成18年3月25日

【 学位論文題目 】

Mast cell numbers and protease expression patterns in biopsy
specimens following renal transplantation from living-related
donors predict long-term graft function
(生体腎移植 protocol biopsy における Mast cell 及び
その subtype の発現と graft 長期予後)

審 査 委 員

主 査 教 授 黒田 嘉和
教 授 尾原 秀史
教 授 丸尾 猛

【緒言】

腎臓移植において、カルシニューリンインヒビターのような免疫抑制剤の発達により早期の移植腎機能や急性拒絶反応の頻度は著しく改善されたにもかかわらず長期正着率や長期移植腎機能の増悪に関してはその限りではない。その主な原因となる病態は chronic allograft nephropathy (CAN) であると言われており、その特徴は間質の線維化である。近年、mast cell が慢性炎症や線維化に関与している事が示唆されており、急性拒絶反応を起こした移植腎組織において、mast cell の発現が亢進していることが証明されている。そしてまた、mast cell は含まれる protease によって tryptase しか含まない MC_T と tryptase と chymase の両方を含む MC_{TC} に分けられる。本研究の目的は、移植後腎機能も安定しており、拒絶反応も起こしていない患者の移植後 100 日生検の標本を免疫染色し、その時点での mast cell の数及びその subtype の発現を調べ、3 年間での移植腎機能の増悪や線維化の進行とどのような関連があるかを検討し、mast cell の移植後早期の生検標本での発現が長期の移植腎機能予後を予測できるかを調べることである。

【対象と方法】

対象症例

神戸大学病院 腎泌尿器科では患者の同意のもと、生体腎移植後 100 日目、及び 3 年目に局所麻酔下、超音波ガイド下に 18 G バイオプシーニードルを用いて移植腎生検を行っており、ドナーからも移植腎摘出の直前に生検を行なっている。本研究では、十分な量の組織が採取され、移植後 3 年まで急性拒絶反応や急性尿細管壊死、シクロスポリンによる腎毒性、原病の移植腎への再発などの異常を認めなかった 24 症例を対象とした。

Mast cell 抗体による免疫組織学的染色

腎生検によって得られた組織を、ホルマリン固定、パラフィン包埋し、2 μ M に薄切した。得られた標本を anti-human tryptase および anti-human neutrophil cathepsin G にて免疫染色を施行した。それぞれの同一視野で anti-human tryptase で染まる細胞を total mast cell とし、anti-human tryptase と anti-human neutrophil cathepsin G の両方で染まる細胞を tryptase と chymase の両方を含む subtype であ

る MC_{TC} として total mast cell から MC_{TC} の数を引いて tryptase のみしか含まない subtype である MC_T とした。anti-human tryptase で染まらず、anti-human neutrophil cathepsin G のみで染まる細胞は monocyte であり、すべての視野で各々の数をしらべて、一視野あたりの mast cell の数の平均 (MC/HPF) と mast cell 全体の数に対する MC_{TC} の割合 (the ratio of MC_{TC} to total MC) を計算した。また各種抗体を用いて、T-リンパ球、マクロファージ、好中球の発現を調べ、その合計を total inflammatory cells として計算した。以上の免疫染色を、正常 control、移植前ドナー腎、移植後 100 日目、移植後 3 年目生検標本に対し施行し、長期移植腎機能や線維化との関連を検討した。正常 control としては、腎悪性腫瘍などで腎摘除術を施行された 12 症例の摘除腎の正常部分を用いた。

移植腎線維化の評価

control、移植前ドナー腎、100 日目、3 年目生検の組織に対し、組織の線維化の観察のため masson-trichrome 染色を行った。線維化をきたした組織では、尿細管間質に青染を認めた。得られた標本のうち、皮質のみの含まれる任意の 3 視野以上を倍率 100 倍にてデジタル画像として撮影し、画像処理ソフトである Photoshop、及び画像解析ソフトである NIH-image を使い、組織の線維化の定量を行なった。解析の方法としては、取り込んだ画像のうち線維化をきたし青く染まった部分を抽出し、その面積の画像全体に占める割合を fibrosis index (FI) として求めた。100 日目および 3 年目の時点での FI の差 Δ FI をもって線維化の進行度とした。

移植腎機能の評価

移植後 100 日目および 3 年目の時点でのクレアチニークリアランス (Ccr) を使い、その差を Δ Ccr として移植腎機能の変化の指標とした。

【結果】

免疫組織学的染色

標本中の Mast cell は円形で、糸球体内部にも見られたがほとんどが間質に分布しており、尿細管内には認めなかった。(Fig.1)

正常 control、移植前、100 日目生検における Mast cell の総数、the

ratio of MC_{TC} to total MC、total inflammatory cells の総数

1 視野あたりの Mast cell の総数 (total MC per HPF) は正常 control 群 (N 群)、移植前生検群 (P 群) でそれぞれ 0.19 ± 0.05 、 0.20 ± 0.05 であるのに対し、100 日群 (A 群) では 0.72 ± 0.14 と有意に多く認められた。また、全 Mast cell のうちの MC_{TC} の割合 (the ratio of MC_{TC} to total MC) は、N 群、P 群でそれぞれ 0.39 ± 0.09 、 0.36 ± 0.09 であるのに対し、A 群では 0.57 ± 0.13 と有意に上昇していた。(Table 1) T-リンパ球やマクロファージ、好中球などの inflammatory cells の浸潤は N 群、P 群では見られず、A 群で total inflammatory cells/HPF は 0.49 ± 0.08 であったが、Mast cell の総数と total inflammatory cells/HPF に相関関係を認めなかった。(Fig.2)

Mast cell の発現と移植腎機能

100 日後生検標本中の Mast cell およびその subtype の発現が長期の移植腎機能にどのような影響をあたえるかを調べるために回帰分析を行った。

移植後 100 日の時点での Mast cell の総数と Δ SCr、 Δ CCr の間に有意な相関関係が見られ (Fig.3)、Mast cell が多く発現している患者ほど移植腎機能が増悪していた。

移植後 100 日の時点での ratio of MC_{TC} to total MC と Δ SCr、 Δ CCr の間に有意な相関関係が見られ (Fig.4)、全体の Mast cell のうち MC_{TC} の割合が多い患者ほど移植腎機能が増悪していた。

Mast cell の発現と移植腎線維化

線維化の指標である FI (%) は正常 control 群、移植前生検群、移植後 100 日群、および 3 年目群でそれぞれ 3.41 ± 1.05 、 5.53 ± 1.47 、 15.16 ± 6.89 、 18.17 ± 5.35 であり、腎移植後の経過と共に進行性の線維化が認められた。(Table 1)

回帰分析により移植後 100 日の時点での Mast cell の総数および ratio of MC_{TC} to total MC がその時点での FI と有意な正の相関が認められ (Fig.5)、より多くの Mast cell が発現し、また全体の Mast cell のうち MC_{TC} の割合が多いほどその生検組織の線維化が進んでいることが示された。

移植後 100 日の時点での Mast cell の総数および ratio of MC_{TC} to total MC が Δ FI と有意な正の相関を認め (Fig.6)、移植後 100 日の生検標本で Mast cell がたくさん発現しているほど、また全体の Mast cell のうち MC_{TC} の割合が多い

ほど、その後より高度に移植腎の線維化が進んでいたことが示された。

Inflammatory cell の発現と移植腎機能および移植腎線維化

移植後 100 日の inflammatory cell の総数と Δ CCr は相関せず、また移植後 3 年の FI とも有意な相関を認めなかった。そして、移植後 100 日の inflammatory cell の総数と Δ FI も有意な相関関係を認めなかった。

【考察】

今回の検討の結果から移植後早期の安定した生検標本においても、Mast cell がすでに発現しており、その総数が多いほど、またその内の MC_{TC} の割合が多いほど、3 年後の線維化が進行し、またその結果として移植腎機能が低下していることが示された。また、今回の検討では、移植後早期の stable な標本での Mast cell の発現と炎症細胞の発現に関連は見られず、移植後早期の炎症細胞の発現とその後の線維化や移植腎機能に関連は見られなかった。このことより Mast cell やその subtype を調べることが移植後早期の stable な標本ではより良い予測因子であると思われる。

そして Mast cell の subtype のうち、MC_{TC} の割合が多いほど線維化や腎機能の低下が進むことから、MC_{TC} に含まれる protease の chymase がこの事に関連していると推測される。chymase は collagen の生成や間質の線維化に関与していると報告され、また angiotensin II の forming enzyme として知られていて、動物実験で腎組織において angiotensin II が TGF- β の産生を促進することが示されている。これらの事と今回の検討の結果から CAN の本質である線維化には Mast cell およびその subtype である MC_{TC}、さらにはそこに含まれる chymase が重要な役割を果たしていることが考えられた。

【結論】

移植後早期の移植腎生検組織中の Mast cell およびその subtype の発現は、長期腎機能の予後を予測しうる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1702 号	氏 名	石田 敏郎
論文題目	<p>Mast cell numbers and protease expression patterns in biopsy specimens following renal transplantation from living-related donors predict long-term graft function</p> <p>生体腎移植 protocol biopsy における Mast cell 及びその subtype の発現と graft 長期予後</p>		
審査委員	<p>主 査 黒田嘉和</p> <p>副 査 尾原秀史</p> <p>副 査 丸尾 猛</p>		
審査終了日	平成 17 年 1 月 18 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

1. 序文

生体腎移植において、免疫抑制剤の発達により早期の移植腎機能や急性拒絶反応の頻度は著しく改善されたにもかかわらず長期正着率や長期移植腎機能の増悪に関してはその限りではない。その原因となるのは chronic allograft nephropathy (CAN) であると言われており、その病態はまだはっきりとは解明されていないが特徴は間質の線維化である。Mast cell は人間のほぼすべての組織に存在し、含まれる protease によって tryptase しか含まない MC_T と tryptase と chymase の両方を含む MC_{TC} というふたつの subtype に分けられ、近年、慢性炎症や線維化に関与している事が示唆されており、急性拒絶反応を起こした移植腎組織において、mast cell の発現が亢進していることも証明されている。申請者は、移植後腎機能も安定しており、拒絶反応も起こしていない患者の移植後100日生検の標本を免疫染色し、その時点での mast cell の数及びその subtype の発現を調べ、3年間での移植腎機能の増悪や線維化の進行とどのような関連があるかを検討し、mast cell の移植後早期の生検標本での発現が長期の移植腎機能予後を予測できうるかを検討した。

2. 対象と方法

本研究では、十分な量の組織が採取され、移植後3年まで急性拒絶反応や急性尿細管壊死、シクロスポリンによる腎毒性、原病の移植腎への再発などの異常を認めなかった24症例を対象とした。

組織の線維化の観察のため masson-trichrome 染色を行い、NIH-image を用い、線維化をきたし青く染まった部分を抽出し、その面積の画像全体に占める割合を fibrosis index(FI) として求め、100日目および3年目の時点での FI の差 ΔFI をもって線維化の進行度とした。また、移植腎機能の変化の指標として移植後100日目および3年目の時点での血清クレアチニン値、およびクレアチニンクリアランス (Ccr) を用い、その差を ΔSCr 、 ΔCcr とした。

Mast cell 抗体による免疫組織学的染色

腎生検によって得られた組織を anti-human tryptase および anti-human neutrophil cathepsin G にて免疫染色を施行した。Chymase のかわりに cathepsin G の抗体を使用したのは chymase の免疫活性がホルマリン標本では失活してしまうからである。それぞれの同一視野で anti-human tryptase で染まる細胞を total mast cell とし、anti-human tryptase と anti-human neutrophil cathepsin G の両方で染まる細胞を tryptase と chymase の両方を含む

subtype である MC_{TC} として数え、total mast cell から MC_{TC} の数を引いて tryptase のみしか含まない subtype である MC_T とした。すべての視野で各々の数をしらべて、一視野あたりの mast cell の数の平均と mast cell 全体の数に対する MC_{TC} の割合を計算した。

3. 結果

1 視野あたりの Mast cell の総数は正常 control 群(N 群)、移植前生検群(P 群)でそれぞれ 0.19 ± 0.05 、 0.20 ± 0.05 であるのに対し、100 日群(A 群)では 0.72 ± 0.14 と有意に多く認められた。また、全 Mast cell のうちの MC_{TC} の割合は、N 群、P 群でそれぞれ 0.39 ± 0.09 、 0.36 ± 0.09 であるのに対し、A 群では 0.57 ± 0.13 と有意に上昇していた。

繊維化の指標である FI(%)は正常 control 群、移植前生検群、移植後 100 日群、および 3 年目群でそれぞれ 3.41 ± 1.05 、 5.53 ± 1.47 、 15.16 ± 6.89 、 18.17 ± 5.35 であり、腎移植後の経過と共に進行性の繊維化が認められた。

移植後 100 日の時点での Mast cell の総数と Δ SCr および Δ CCr の間に有意な相関関係が見られ、移植後 100 日の時点で Mast cell が多く発現している患者ほど長期の移植腎機能が増悪していた。

移植後 100 日の時点での MC_{TC} の割合と Δ SCr および Δ CCr の間に有意な相関関係が見られ、全体の Mast cell のうち MC_{TC} の割合が多い患者ほど長期での移植腎機能が増悪していた。

移植後 100 日の時点での Mast cell の総数および MC_{TC} の割合がその時点での FI と有意な正の相関が認められ、より多くの Mast cell が発現し、また MC_{TC} の割合が多いほどその時点での繊維化が進んでいることが示された。

移植後 100 日の時点での Mast cell の総数および MC_{TC} の割合が Δ FI と有意な正の相関を認め、移植後早期に Mast cell がたくさん発現しているほど、また全体の Mast cell のうち MC_{TC} の割合が多いほど、その後より高度に移植腎の繊維化が進んでいたことが示された。

4. 考察

今回の検討の結果から移植後早期の安定した生検標本においても、Mast cell がすでに発現しており、その総数が多いほど、またその内の MC_{TC} の割合が多いほど、3 年後の繊維化が進行し、またその結果として移植腎機能が低下していることが示された。また、そして Mast cell の subtype のうち、MC_{TC} の割合が多いほど繊維化や腎機能の低下が進むことから、MC_{TC} に含まれる protease の chymase がこの事に関連している可能性が推測される。chymase は collagen の生成や間質の繊維化に関与していると報告され、また

angiotensin II の forming enzyme として知られていて、動物実験で腎組織において angiotensin II が TGF- β の産生を促進することが示されている。

以上のように、本研究は、腎移植後早期の生検組織に対し、免疫染色を用いて Mast cell 及びその subtype の発現を検索し、移植腎の繊維化および機能に及ぼす影響を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった、安定した機能を持つ移植腎の機能予後を予測する因子を明らかにし、chronic allograft nephropathy の進む過程に関する重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。