



Expression profile of mammalian target of rapamycin-related proteins in graft biopsy specimens: Significance for predicting interstitial fibrosis after kidney...

Ogawa, Satoshi

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6876号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006876>

※ 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。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Expression profile of mammalian target of rapamycin-related proteins in graft biopsy specimens: Significance for predicting interstitial fibrosis after kidney transplantation

腎移植後定期生検における mTOR 経路発現と移植腎線維化の関連

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
腎泌尿器科学
(指導教員: 藤澤 正人教授)

小川 悟史

【背景】

近年、免疫抑制剤や免疫組織学的検査方法の進歩により、急性拒絶反応の頻度は著しく低下し、腎移植の短期成績は飛躍的に向上している。しかし長期成績に関してはその限りではない。このため長期的な視点に立ち、移植腎機能の維持を図ることがますます重要になってきている。

移植腎機能障害が慢性的に進行すると、その原因によらず、組織学的に移植腎間質の線維化進行が認められる。また移植腎線維化進行は移植腎機能低下の程度と強く相関することがよく知られている。しかしながら移植腎線維化を引き起こす詳細な機序は現在でも不明な部分が多い。

mTOR (mammalian target of rapamycin) は、多くの細胞生理反応を制御する serine/threonine kinase である。その上流には PI3K/AKT が位置し、PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達経路を形成する。下流においては p70S6K や 4EBP1 のリン酸化を介し、蛋白質合成、細胞の成長、増殖を制御する重要な役割を担う。一方、mTOR 伝達経路は、慢性腎疾患においては、腎線維化に関与することが知られている。

【目的】

今回、移植腎線維化に mTOR 伝達経路が関与するという仮説を立て、移植後早期の定期生検における mTOR 関連分子の発現を評価し、移植後長期の移植腎線維化との関連を検討する。これにより移植後早期の mTOR 関連分子発現が、長期の移植腎機能予測因子となり得るか検討することを本研究の目的とした。

【方法】

2000 年から 2012 年において神戸大学病院泌尿器科で施行された腎移植 104 例のうち移植後 3 か月、3 年時に定期生検を施行されている症例で、以下を除外項目とした。すなわち移植後 3 か月時の腎機能が、eGFR(estimated glomerular filtration rate)30ml/min 未満の症例、生検により十分な検体量が採取できなかつた症例、急性拒絶反応の発症例、原疾患の再発症例を除外した。結果、計 77 例が本研究の対象となった。

移植腎定期腎生検を移植腎採取前、移植後 3 か月、3 年で実施した。移植腎採取前、移植後 3 か月定期腎生検組織を mTOR 関連分子である p-Akt、Rheb、p-mTOR、p-4EBP、p-p70S6K の 5 つの分子について各々の一次抗体を用い、免疫組織化学染色を行った。各抗体について染色された面積の組織全体における割合を求め、15%未満を弱発現、15%以上を強発現と定義した。

腎機能評価については、血清クレアチニン値(Scr)を用いた日本人の eGFR 換算式($eGFR = 194 \times \text{serum creatinine mg/dL}^{-1.094} \times \text{age}^{-0.287} \times 0.739$ [females])を用いて求めた。3 か

月、3年時のeGFRを求め、腎機能増悪の指標として $\Delta eGFR$ を3年時のeGFRと3か月時のeGFRの差と定義し、次の式のごとく求めた。 $\Delta eGFR(\text{ml}/\text{min}) = 3\text{年時 eGFR}(\text{ml}/\text{min}) - 3\text{か月時 eGFR}(\text{ml}/\text{min})$ また $\Delta eGFR \leq -10(\text{ml}/\text{min})$ を腎機能増悪群、 $\Delta eGFR > -10(\text{ml}/\text{min})$ を非増悪群と定めた。

3か月、3年定期腎生検組織を Masson trichrome 染色を行い、画像解析ソフトで腎皮質の線維化領域を抽出し、腎皮質全体に占める割合を FI(fibrosis index)%とした。線維化進行の指標として ΔFI を3年時のFIと3か月時のFIとの差と定義し、次の式ごとく求めた。

$\Delta FI(\%) = 3\text{年時 FI}(\%) - 3\text{か月時 FI}(\%)$ また $\Delta FI \geq 10\%$ を線維化進行群、 $\Delta FI < 10\%$ を非進行群と定めた。

【結果】

移植後3か月生検組織を免疫染色したところ、おもに尿細管細胞質において p-Akt、Rheb、p-mTOR、p-p70S6K、および p-4EBP1 の発現を認めた。移植前生検組織においては mTOR 関連分子の発現は弱く、移植後3か月生検組織に比し、有意に弱い結果であった。

移植後3か月から3年における全患者のeGFR中央値は $61.1\text{ ml}/\text{min}$ から $56.3\text{ ml}/\text{min}$ へと有意に低下し、FI中央値は 9.9% から 18.0% へと有意に増加認めた。さらに $\Delta eGFR$ と ΔFI 間に強い負の相関を認めた。

5つのmTOR関連分子の発現の強弱により ΔFI を評価したところ、すべてのmTOR関連分子において発現が強い群が、弱い群より ΔFI が大きい結果であった。

次にmTOR関連分子の発現度および臨床的因子と線維化進行($\Delta FI \geq 10\%$)との関連についてロジスティック回帰分析で検討した。単変量解析では、献腎ドナー、長期期間、p-Akt、p-mTOR、p-p70S6K 発現が有意な ΔFI の予測因子となり、これら5つの因子で多変量解析を行った結果、献腎ドナー、p-mTOR、p-p70S6K が独立した線維化進行の予測因子となった。

さらに多変量解析で3つの独立した予後予測因子の保有数により3群(保有因子0個、1つ、2または3個)に分け、線維化進行の割合を比較したところ、保有因子の多い群のほうが、線維化進行の割合が高く、3群間で有意差を認めた。

【考察】

移植腎線維化は移植腎機能低下に強く相關する因子であるが、移植後早期の生検組織における線維化から長期予後を予測することは困難である。mTOR伝達経路は腎線維化に重要な働きをしていると考えられており、我々は、移植後早期移植腎生検組織におけるmTOR関連分子の発現を評価することで、その後引き起こされる移植腎線維化進行が予測できるか検討した。

まず本研究において移植腎線維化進行を評価したところ、移植後3か月から3年時にかけて有意に線維化進行を認めた。また線維化進行が、移植腎機能の低下と有意に相關することが示され、移植後3か月から3年にかけての移植腎線維化進行が移植腎機能低下に大き

く影響することが確認された。次に我々はmTOR関連分子の発現と線維化進行との関連を検討した。その結果、3か月生検のmTOR関連分子発現が強い群において線維化進行が強い結果であった。さらにmTOR関連分子の線維化進行の予測因子となり得るかを評価するため、多変量解析を用いて検討したところ、献腎ドナー、p-mTOR、p-p70S6K が独立した予測因子となった。

より正確な線維化予測のため、多変量解析で残った3つの独立した予測因子の保有数により3群に分け、線維化進行の割合を比較したところ、線維化予測因子がより多い群が、線維化進行の割合がより多い結果であった。これら3つの因子を評価することで将来引き起こされる線維化進行の予測が可能となると考えられた。

【結語】

本研究により移植後早期定期腎生検のmTOR関連蛋白発現から、移植腎線維化および腎機能低下を予測し得ると考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2669 号	氏名	小川 悟史
論文題目 Title of Dissertation	Expression profile of mammalian target of rapamycin-related proteins in graft biopsy specimens: Significance for predicting interstitial fibrosis after kidney transplantation 腎移植後定期生検における mTOR 経路発現と移植腎線維化の関連		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner	西慎一	
	副査 Vice-examiner	佐々木 伸	
	副査 Vice-examiner	西尾久英	

(要旨は1,000字～2,000字程度)

背景と目的: 移植後の腎機能低下には、腎間質の線維化が関与している。この線維化に働く細胞あるいはメディエーターは多数知られている。mammalian target of rapamycin-related proteins (mTOR) は、細胞増殖、分化、代謝、血管増殖など多機能に関与し、近年 mTOR 活性が腎疾患の進行にも関与していることが指摘されている。mTOR 活性に関与する因子として Akt, Rheb, p70S6K, 4EBP1 など多種の因子が知られている。本研究では、移植腎の腎間質線維化に mTOR 及びその関連因子が関与しているか検討した。

対象と方法: 対象患者は、2000 年から 2012 年までに神戸大学医学部附属病院にて腎移植を受けた 77 例。Delayed graft function、急性拒絶反応を示した症例、再発性腎炎を呈した症例は除外された。カルシニューリン阻害薬はシクロスボリンあるいはタクロリムスのどちらかが使用された。その他、メチルプレドニゾロン、MMF、バジリキシマブが初期免疫抑制治療に用いられた。移植腎の生検は、移植時及び移植後 3 カ月目に実施された。mTOR 関連因子の発現を免疫組織化学法で確認し、発現強度を 4 段階のスコアで評価した。また、腎間質線維化面積を画像処理ソフトにて測定した。移植後 3 カ月目から 3 年目までの eGFR の低下も測定した。mTOR 関連因子の発現と、腎間質線維化あるいは臨床パラメーターとの関連を評価した。

結果: 腎間質線維化の進行と腎機能 eGFR の低下には有意な相関関係が認められた。ドナー腎組織と比較して、移植後 3 カ月の腎検査組織における p-mTOR, p-Akt, p-Rheb, p-4EBP1, p-p70S6K の有意な発現スコアの増強を認めた。これらの mTOR 関連因子の発現スコアを強い群と弱い群の 2 群に分け腎間質線維化進行度を比較したところ、p-mTOR, p-Akt, p-Rheb, p-p70S6K の発現スコア増強が強い群で有意に腎間質線維化進行度が高かった。また、多変量解析では、腎間質線維化進行度と有意な関連を認める因子は、年齢、p-mTOR スコア、p-p70S6K スコアであった。また、これらの合計スコアが高いほど、腎間質線維化進行が顕著であった。

結論: 以上の結果より、移植腎の腎間質線維化進行に、腎組織内の mTOR 系の活性亢進が深く関与していることが示唆された。本研究は、mTOR 系の活性化と移植腎組織の線維化との関連性を明らかにした点で重要かつ新規知見を得た価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。