

腎移植慢性拒絶反応の病態と治療： 腎移植慢性拒絶反応の発症メカニズムとその治療

大阪医科大学泌尿器科学教室（主任：勝岡洋治教授）

東 治 人

CHRONIC ALLOGRAFT NEPHROPATHY： ITS DIAGNOSIS AND TREATMENT

Haruhito AZUMA

From the Department of Urology, Osaka Medical College

The process of chronic allograft nephropathy (CAN) is primarily concerned with disparity in major histocompatibility. However, changes similar to CAN have been seen in human kidney transplants between identical twins, as well as in rat kidney isografts. Such changes cannot be explained by antigen-dependent factors; antigen-independent factors are likely to be involved in the onset of CAN. A CAN-type picture also was seen in a rat single kidney model subjected to ischemic injury, indicating the importance of ischemia in the process of CAN. In the present study, CAN was accelerated by renal ablation in a rat kidney transplant model with reduced nephron number. Conversely, recipients with increased renal mass bearing two allografts, did not show any signs of CAN. These observations suggested that a non-allogenic factor such as ischemia and insufficient nephron number is critical in the development of CAN, and thus the etiology of CAN is hypothesized as follows. Many factors such as ischemic injury, acute rejection or infection reduce the functioning nephron number, which causes hyperfiltration in remaining nephrons leading to glomerulosclerosis. This in turn, further reduces the functioning nephron number. These progressive events may reinforce further the stimulus of hyperfiltration, thereby establishing a self-sustaining vicious cycle. Any factor preventing the reduction of functioning nephron number, can be a candidate for treatment. Herein, we showed that treatment with hepatocyte growth factor (HGF), a renotropic factor, in the initial disease stage prevented further development of CAN.

(Acta Urol. Jpn. 48 : 679-682, 2002)

Key words: Hyperfiltration, HGF, Nephron mass

緒 言

近年の移植医療において、種々の免疫抑制剤の開発により移植腎の生着率は飛躍的に向上し、急性拒絶反応に対する治療も進歩したが、腎移植患者の約50%は術後7年以内に移植腎機能不全にて透析に移行しており、その原因の殆んどが慢性拒絶反応である。慢性拒絶反応の診断は、血清クレアチニン値の上昇や、尿量低下などの移植腎機能の低下と腎生検による組織診断によって下される。代表的な組織所見は糸球体硬化像、尿細管萎縮、間質の線維化および血管狭窄であり、現在国際的な診断基準も提唱されているが、その病態生理や原因は判然とせず、有効な治療法も発見されていない¹⁾

ラット腎移植慢性拒絶反応モデル

われわれはこれまで慢性拒絶反応の発症メカニズムを詳しく検索するため、ラット腎移植慢性拒絶反応モ

デルを用いて検討してきた。

1) モデルの作成：F344 ラット (RT11vl) をドナー、Lew ラット (RT11) をレシピエントとして同所性に腎移植を施行する。この際ドナーの腎動静脈および尿管は顕微鏡下にレシピエントの腎動静脈および尿管と10-0 ナイロン糸にて端々吻合する。レシピエントの右固有腎は術当日、左腎は術後10日目に摘除し、移植術後の急性拒絶反応を抑制するため移植術当日から低濃度のシクロスポリン (5 mg/kg/day) を5日間皮下投与する。

2) 検索方法：移植腎機能の評価として、術後4週間毎にレシピエントの尿中蛋白量を測定し、病理組織学的には、術後6, 8, 12, 16, 24, 32週目に移植腎を摘出し、HE, PAS および trichrome and silver masson 染色を行い検討した。また、レシピエントの移植腎に対する免疫反応を明らかにするため、組織内浸潤細胞の同定や各種サイトカインの産生 (IL-1, IL-6, IL-10, MCP-1, NOSi, RANTES, TGF-β,

TNF- α , IFN- γ , ICAM-1) について, 免疫組織化学および RT-PCR assay を用いて検索した.

3) 経過: 当モデルにおけるレシピエントの平均生存期間は約52週である. 術後8週目で組織学的に極軽度の糸球体内および血管周囲の炎症性細胞浸潤が認められ, 間質では軽度の尿細管萎縮が見られた. 術後16週目には, 炎症性細胞浸潤 (特にマクロファージ) はピークに達し, マクロファージの浸潤に伴い, IL-1, MCP-1, TNF- α , TGF- β などのサイトカインの産生が多量に認められた. また, 糸球体に種々な程度の硬化像が認められ, 間質では硬化した糸球体の周囲を中心に尿細管の萎縮や線維化所見がみられた. この頃から移植腎機能も著明に低下し始め, 血清クレアチニン値の上昇と高度の蛋白尿を認めた. 術後24週目には接着分子の発現や, サイトカインの産生などの変化は減退し, 慢性拒絶反応の典型的な所見である間質の広範囲な線維化と高度な糸球体硬化像がみられた. この時期には血管における変化も著明となり, 50%以上の血管で内皮細胞や平滑筋細胞の増殖が認められた. 以後これらの変化は増強し, 術後52週では70%以上の糸球体に硬化像が, 60%以上の血管に狭窄所見が認められた. これら所見から, 慢性拒絶反応の発症には接着分子の発現, マクロファージの浸潤, およびそれらによって産生された多量のサイトカインが進行の過程で重要な役割を果たしていることが示唆された²⁾.

発 症 因 子

これまで, 慢性拒絶反応の要因として, ドナーとレシピエントの主要組織適合性抗原の相違による antigen dependent な因子が主であると考えられてきた. しかし, Tilney らをはじめわれわれは, 主要組織適合性抗原が同一である一卵性双生子間で行った腎移植においても移植腎機能低下, 糸球体硬化, 血管狭窄, 尿細管萎縮などを伴う, 典型的な慢性拒絶反応の所見

が発症したことに注目し, ラットを用いてこのことを検証することを試みた. 主要組織適合性抗原が全く同じであるアイソグラフト間における腎移植モデル (Lew-Lew) を作成し, 72週にわたって長期的に経過を観察した. その結果, 24週目以降から徐々に蛋白尿が出現し, 50週目頃にはマクロファージの浸潤とそれに伴う IL-1, TNF- α , TGF- β などのサイトカインが著明に発現し, 最終的にはやはり糸球体硬化や血管狭窄などの典型的な慢性拒絶反応組織所見が認められた. これらの結果から主要組織適合性抗原が同一であるラットアイソグラフトにおいても, アログラフトにくらべて発症時期は遅いが, 慢性拒絶反応を呈することが明らかになった³⁾ また, さらにわれわれは, 移植という操作による他の様々なファクターを除外し, 腎阻血再灌流障害のみの慢性拒絶反応に対する影響を明らかにするため, 移植していない naive ラットに腎阻血再灌流障害を生じさせ (腎動脈を45分間クランプし対側腎を摘除) 長期的に観察した. その結果, 腎阻血再灌流障害のみを生じさせた腎において, アログラフトにおいて生じた慢性拒絶反応と同様の変化を呈してくることが明らかになり, 慢性拒絶反応の発症には, 腎移植術時における腎阻血再灌流障害が非常に重要な要因であることが示唆された⁴⁾

Brenner らは, 腎障害の進行の過程において, 機能糸球体数の減少が重要な factor であることを報告している⁵⁾ この理論は移植においてもいくつかの臨床的な報告から支持されている. 例えば, 機能糸球体数が加齢により減少している老人をドナーとして行った腎移植や, 解剖学的に機能糸球体数が白人より少ない黒人から白人への腎移植では, 慢性拒絶反応の発症時期が早くなることなどが良い例である. これらの事実から, われわれは慢性拒絶反応の発症には機能糸球体数の減少が要因の1つと考え以下のような機能糸球体数の異なるラット腎移植慢性拒絶反応モデルを作成し

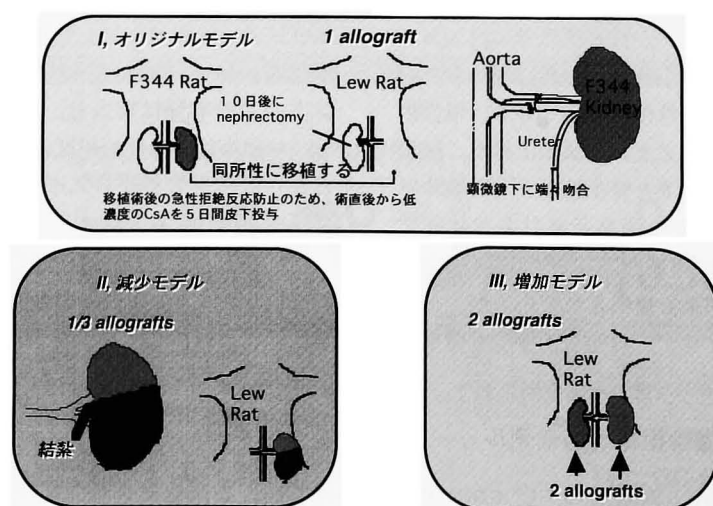


Fig. 1. 機能糸球体数の異なるラット腎移植慢性拒絶反応モデル

(Fig. 1), 慢性拒絶反応の発症時期や、そのメカニズムについて、機能的、組織学的および免疫組織学的に検討した。1) 機能糸球体数減少モデル：(1/3アログラフト) F344 ラット腎動脈は3本に分枝しこれらは終動脈であるためこのうち2本を結紮することによって1/3 機能腎を作成できる。この1/3 機能腎を Lew レシピエントに同所性に移植し、1/3 腎アログラフトを作成。2) オリジナルの慢性拒絶反応モデル：(1 アログラフト) 1つの F344 腎を両側腎摘した Lew ラットに移植。3) 機能糸球体数増加モデル：(2 アログラフト) 左右両側2つの F344 腎を1匹の Lew ラットに移植し、機能糸球体数を2倍に増加したモデルを作成。その結果、1/3 アログラフトモデルでは、術後早期から単位ネフロンあたりの GFR (SNGFR) は著明に上昇し残存糸球体では高度な hyperfiltration を呈しており、また、接着分子の発現、マクロファージの浸潤およびそれらによる多量のサイトカインの産生などの変化が1 アログラフトモデルに比較して早期(術後4~6週目)に出現し、このころから移植腎機能も著明に低下した (Fig. 2A, B)。術後10週目には糸球体硬化および高度な尿細管萎縮を伴う慢性拒絶反応の典型的な組織所見がみられ、12週までに80%以上が死亡した。これに対して機能糸球体数を増加させた2 アログラフトモデルでは SNGFR はほぼ均一に保たれ、全観察期間32週を通して慢性拒絶反応を示す所

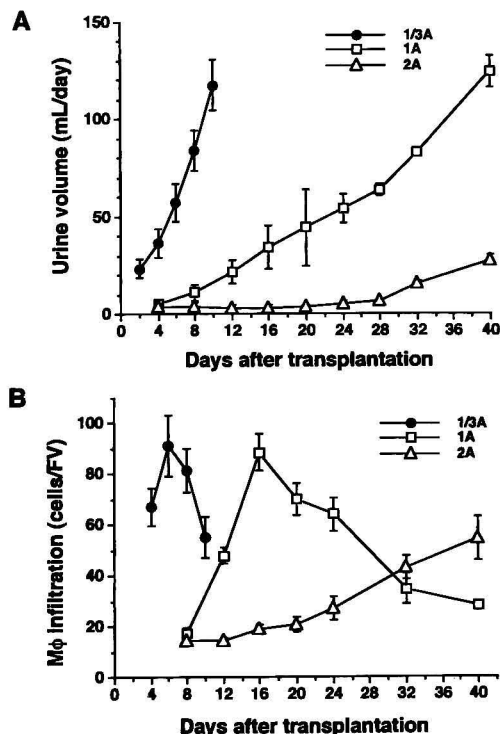


Fig. 2. 機能糸球体数の CAN に対する影響。A: 機能糸球体数の異なるラットモデルにおける蛋白尿の推移。B: 機能糸球体数の異なるラットモデルにおけるマクロファージ浸潤。

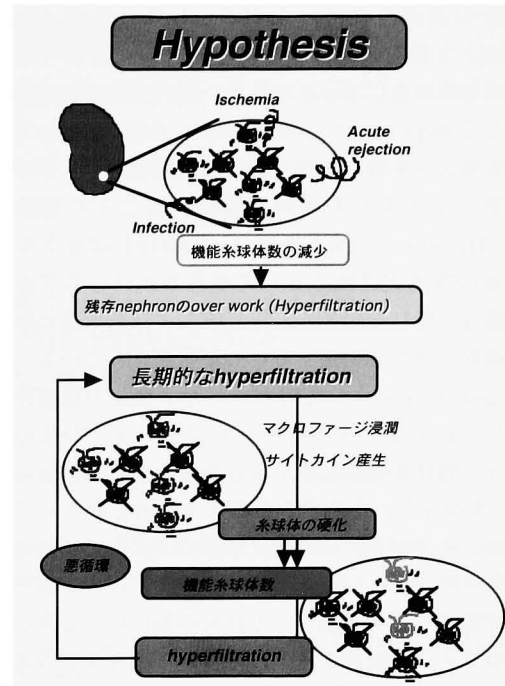


Fig. 3. Hypothesis, mechanisms of chronic allograft nephropathy.

見は認めず、移植腎機能、組織はほぼ正常に保たれていた。そして、その中間のネフロン数を持つ1 アログラフトモデルでは12~16週目頃から移植腎機能の低下とともに SNGFR は大きくバラツキはじめ、20週目には SNGFR が著明に低下した糸球体と、著明な hyperfiltration を示す糸球体が混在していた⁶⁾。

これらの実験から慢性拒絶反応の発症には antigen dependent な因子に加えて、antigen independent な因子、特に手術時における腎阻血再灌流障害や、様々な因子による機能糸球体数の減少が深く関わっていることが強く示唆され、われわれは以下のような仮説を立てた。

“腎阻血再灌流障害や急性拒絶反応など、様々な因子によって糸球体が障害され機能糸球体数が減少すると、残存糸球体は over work となり hyperfiltration を生じ、やがてそれらは硬化に陥る。こうして機能糸球体数はますます減少し、これら一連の反応に拍車をかける結果となり慢性拒絶は加速度的に進行する” (Fig. 3)。

治 療

慢性拒絶反応の trigger は multifactorial であり、腎阻血再灌流障害、急性拒絶反応をはじめウイルス感染など、機能糸球体数を減少させるすべての要因となる。したがってその治療としては患者の病態をよく把握し、機能糸球体数を減少させるすべての要因を取り除くあらゆる手段を常に実行させるべく、細心の注意を払って治療にあたることが重要であり、しいては

移植腎の長期生存につながる。われわれは multi-factorial な機能糸球体数を減少させる要因のうち腎阻血再灌流障害に focus をあて、これを減少させる手段として hepatocyte growth factor (HGF) という肝細胞増殖因子を腎移植後4週間静注投与することで慢性拒絶反応の発症を著明に軽減することに成功した⁷⁾。Hepatocyte growth factor (HGF) はもともと肝細胞の増殖促進因子として発見されたものであるが、最近、腎においても、尿管および糸球体の血管内皮細胞の再生を促進することが報告されている。つまり ischemia によって障害された糸球体や尿管を HGF が recovery するというわけである。われわれはラット慢性拒絶反応モデルに術後4週間にわたって HGF を投与し、その後の経過を8カ月にわたって観察した。その結果、HGF 投与群では蛋白尿は殆ど見られず (Fig. 4A), 術後8週目頃コントロール群でみられた接着分子の発現や、それらの後に生じる多数のマクロファージ浸潤やそれに伴うサイトカインの産生は著明に抑制され、術後32週目においても組織はほぼ正常に保たれていた。生存率においてもその効果は明らかで、50%以上のレシピエントが死亡したコントロール群とは対照的に HGF 投与群では全例が生じた (Fig. 4B)。ここで再度念頭におくべきことは、術直後4週間の HGF 投与が8カ月におよぶ長い経

過を呈する慢性拒絶反応の発症を抑制したということである。そこでわれわれは HGF 投与時期である急性期における作用を明らかにするためにさらに術直後2週間目までの変化をより詳しく検索した。その結果、術後4日目にコントロールにおいてみられた尿管構築の崩壊や著明な細胞浸潤などの変化は、HGF 投与群では殆どみられず、組織はほぼ正常に保たれており、電顕像でも、コントロール群では核の変型や細胞質の空胞化および膨化したミトコンドリアなどの高度な necrosis の所見が見られたのに対して、HGF 投与群ではこのような所見は見られず、細胞はほぼ正常に保たれていた。これらの所見より、HGF は術後急性期における尿管細胞や糸球体を含めた血管内皮細胞の再生を促進させることにより、機能糸球体数の減少を防ぎ、その後に発症する慢性拒絶反応を抑制した可能性が示唆された。さらにわれわれはこの結果をふまえて、移植腎に HGF 遺伝子を導入し、術直後から HGF を腎内で局所的に産生させることによる、腎移植慢性拒絶反応に対する HGF 遺伝子治療を検討中である。

文 献

- 1) Azuma H, Paul LC and Tilney NL: Insights into acute and chronic rejection. *Transplant Proc* **28**: 2081-2084, 1996
- 2) Diamond JR, Tilney NL, Frye J, et al.: Progressive albuminuria and glomerulosclerosis in a rat model of chronic renal allograft rejection. *Transplantation* **54**: 710-716, 1992
- 3) Tullius SG, Heemann UW, Hancock WW, et al.: Long-term kidney isografts develop functional and morphologic changes that mimic those of chronic allograft rejection. *Ann Surg* **220**: 425-432, discussion 432-435, 1994
- 4) Azuma H, Nadeau K, Takada M, et al.: Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation* **64**: 190-197, 1997
- 5) Brenner BM and Milford EL: Nephron underdosing: a programmed cause of chronic renal allograft failure. *Am J Kidney Dis* **21**: 66-72, 1993
- 6) Azuma H, Nadeau K, Mackenzie HS, et al.: Nephron mass modulates the hemodynamic, cellular, and molecular response of the rat renal allograft. *Transplantation* **63**: 519-528, 1997
- 7) Azuma H, Takahara S, Matsumoto K, et al.: Hepatocyte growth factor prevents development of chronic allograft nephropathy in rats. *J Am Soc Nephrol* **12**: 1280-1292, 2001

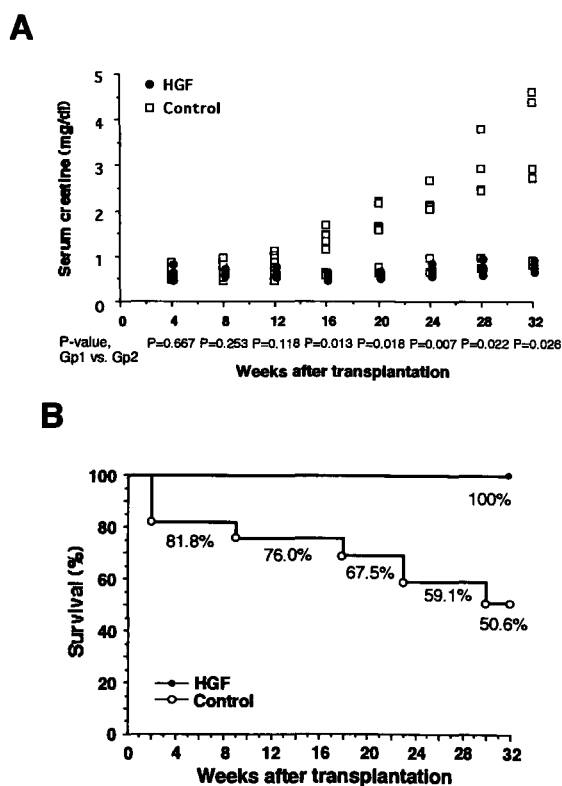


Fig. 4. CAN に対する HGF の効果. A: ラットモデルにおける蛋白尿の推移. B: 生存率.

(Received on August 8, 2002)
(Accepted on September 17, 2002)