

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Immunohistochemistry of Vasohibin-2 in Human Kidney Disease: Implication in Impaired Glucose Tolerance and Reduced Renal Function

(ヒト腎におけるVasohibin-2の免疫組織化学的評価:耐糖能障害と腎機能障害への意義)

荒田夕佳、田邊克幸、雛元紀和、山崎浩子、杉山 斉、前島洋平、鹿股直樹、佐藤靖史、和田 淳

Acta Medica Okayama (掲載予定)

副 論 文

Exacerbation of Diabetic Renal Alterations in Mice Lacking Vasohibin-1

(Vasohibin-1 ヘテロ欠損マウスにおける糖尿病腎症の増悪)

雛元紀和、前島洋平、山崎浩子、高橋(那須)達世、斎藤大輔、綿谷博雪、大森(氏家)はる代、田邊克幸、益田加奈、荒田夕佳、杉山 斉、佐藤靖史、榎野博史

PLoS One 9 (9): e107934 (1-14), 2014.

主論文

Immunohistochemistry of Vasohibin-2 in Human Kidney Disease: Implication in Impaired Glucose Tolerance and Reduced Renal Function

(ヒト腎におけるVasohibin-2の免疫組織化学的評価:耐糖能障害と腎機能障害への意義)

[緒言]

腎疾患の成立には、vascular endothelial growth factor (VEGF)-A、soluble Flt-1 などの多彩な血管新生関連因子が関与する。

Vasohibin-1 (VASH-1)は、新規の内因性血管新生抑制因子であり、VEGF-A 刺激に対して内皮細胞より分泌され、血管新生への negative feedback regulator として作用する。VASH-1 は、糖尿病性腎症や腎線維化の動物モデルにおいて腎保護効果が示されており、また、腎疾患患者における血清及び尿中 VASH-1 値は腎機能予後の指標となりうることが報告されている。

VASH-1 のパラログとして同定された Vasohibin-2 (VASH-2)は、VASH-1 とは対照的に血管新生促進作用を持つと考えられている。実際に、卵巣癌や胃癌などのヒト悪性腫瘍で発現亢進が認められており、腫瘍の増大や転移を促進することが知られている。しかしながら、腎疾患を含めた非腫瘍性病態における役割は、未だ解明されていない。そこで我々は、腎疾患患者の腎生検組織を用いて、VASH-2 の免疫組織学的評価を行い、臨床的及び組織学的指標との関連性を検討した。

[材料と方法]

研究デザイン:

2007年～2009年及び2014年～2015年に当院で施行した腎生検(n=82)を対象とした。2007～2009年の症例(n=43)については、腎機能イベント(30%以上の低下)との関連を後ろ向きに観察した。本研究は、岡山大学倫理委員会の承認を受理しており(No. 471, Oct. 23, 2007 及び No. 2063, May 22, 2014)、全ての患者から文書で同意を得た。

臨床的指標として、既存の報告で心血管イベントとの関連が報告されている年齢、性別、BMI、血圧、尿酸、総コレステロール、HDL、LDL、トリグリセリド、リン、随時血糖、HbA1c と腎機能の指標であるクレアチニン、尿素窒素、推定糸球体濾過率(eGFR)の計13項目を採用した。2群比較検討に際して、高血圧群、糖尿病群、脂質異常症群は、臨床的な診断基準に準じて区分した。

腎組織のスコア化は、Periodic acid-Schiff (PAS)、Periodic acid-methenamine-silver (PAM)、Maason's trichrome 染色標本を用い、the Oxford classification of IgA nephropathy に準じて、半定量的に行った。

VASH-2 及び VASH-1 の免疫組織化学:

ホルマリン固定された4 μ m厚の組織切片を用い、脱パラフィン後の抗原賦活には Target Retrieval Solution (Dako, Glostrup, Denmark)、pH 9.0 を使用した。一次抗体には東北大学加齢医学研究所より供与されたモノクローナル抗ヒト VASH-2 抗体(clone 1760; 1 μ g/mL)及び抗ヒト VASH-1 抗体(clone 4E12; 2 μ g/mL)を使用し、二次抗体として EnVision+ system (Dako) を使用した。発色基質に diaminobenzidine を用い、ヘマトキシリンにより核染色を行った。

VASH-2 及び VASH-1 の染色性のスコア化と解析方法:

VASH-2 及び VASH-1 の糸球体、傍毛細管血管(preritubular capillaries: PTCs)、皮質/髄質尿細管、直血管(vaas recta: VR)の染色性は以下のようにスコア化した;(1) 皮質/髄質尿細管スコア: 200倍視野で範囲(0～3点)×強度(1～3点)の平均;(2) PTC/VRスコア: 200倍視野で VASH-2 陽性血管数の平均;(3) 糸球体スコア; 各糸球体での範囲(0～4点)。全ての変数はノンパラメトリックな分布を示し、2変数の相関には Spearman's rank order test、the Steel test statistics、2群間の比較には the Mann-Whitney U-test により JMP11.1.1 ver. 14.6.4 を用いて解析した。

[結果]

患者群は、総じて高血圧、耐糖能障害、脂質異常症について比較的良好にコントロールされており、著しい肥満を呈する患者は含まれなかった。臨床的分類では慢性腎炎症候群(52.4%)が多く、組織学的分類ではメサンギウム増殖性糸球体腎炎(32.9%)、腎硬化症(12.0%)が上位を占めた。

VASH-2 の免疫組織化学では尿細管、PCT、VR において様々なパターンで染色性が認められた。一方、糸球体は染色されなかった。VASH-2 VR スコアは全てのスコア値の中で最も高値であった(0.0; Interquartile range (IQR) 0-10.59)。VASH-2 尿細管スコアは腎皮質よりも腎髄質において高値であった(0.75; IQR 0.0-1.33 vs. 0.17; IQR 0.0-1.0)。

各 VASH-2 スコアと組織学的スコアの間には有意な相関は認められなかったが、糖尿病腎症群は、非糖尿病性腎症群と比較して高い VASH-2 皮質/髄質尿細管スコアを示した。また、各 VASH-2 スコアと臨床的指標との相関については、髄質尿細管の VASH-2 スコアが年齢($p=0.013$, $r=0.35$)、随時血糖($p=0.029$, $r=0.35$)、HbA1c($p=0.029$, $r=0.35$)と正の相関を示した。腎生検時の eGFR と VASH-2 VR スコアの間には弱い負の相関が認められたが、サブ解析では、腎機能低下群(eGFR ≤ 60 ml/min/1.73m²)での VR スコア値は非低下群と比較して有意に低値を示した($p=0.003$)。腎機能を縦断的に検討すると、髄質尿細管 VASH-2 スコア高値群(カットオフ: 第 3 四分位)では、低値群と比較して腎機能予後が悪い傾向にあった($p=0.0093$)。

VASH-1 の免疫組織化学では、既報と同様に糸球体及び腎皮質・髄質の一部の血管内皮細胞に染色性が認められた。VASH-1 スコアと VASH-2 スコアの間には関連性が認められなかった。

[考察]

ヒト腎組織での免疫組織化学により、VASH-2 は糸球体には染色されず、PTCs や VR のような血管とともに尿細管上皮に染色が認められた。尿細管では皮質よりも解剖学的に低酸素状態に暴露されやすい髄質でより強く染色され、随時血糖や HbA1c と正の相関を呈した。既報によると、高血糖環境下の腎では酸素需要量が増加し、虚血障害が惹起され、VEGF や Glucose transport 1 (GLUT-1) などの血管新生及び代謝制御因子の発現が亢進する。これらを踏まえると、VASH-2 は耐糖能障害の状態では虚血障害から保護するため髄質尿細管で発現が増加する可能性がある。また、VR での VASH-2 の染色性は腎機能低下群で低いことから、同部位での VASH-2 は腎血流の維持に関与する可能性がある。本研究は腎生検組織を使用しており、腎機能障害の進行例での検討は困難であるが、本研究の結果より、ヒト腎疾患において VASH-2 の発現は比較的良好な腎機能が保持された段階から関与している可能性が示唆される。

[結論]

本研究は、ヒト腎組織での VASH-2 免疫組織化学と臨床的パラメーターとの関連性を評価した、初めての研究である。VASH-2 は高血圧や耐糖能障害と関連しつつ腎機能障害の成立過程に関与する可能性が示唆された。

副論文

Exacerbation of Diabetic Renal Alterations in Mice Lacking Vasohibin-1 (Vasohibin-1ヘテロ欠損マウスにおける糖尿病腎症の増悪)

Vasohibin-1 (VASH-1)は内因性の血管新生抑制因子である。我々は、糖尿病腎症を誘発したマウスモデルにおいて外因性(アデノウィル)のVASH-1の腎保護効果について報告した。そこで今回は、VASH-1ヘテロ欠損マウスモデルを用い、内因性VASH-1の腎保護効果について検討した。

ストレプトゾシンを使い、野生型ならびにVASH-1ヘテロ欠損マウスに1型糖尿病を誘発した。それぞれの非糖尿病誘発群とあわせて、合計4群で比較検討した。ストレプトゾシン投与後、16週間後にサクリファイした。

VASH-1ヘテロ欠損糖尿病マウスでは、野生型糖尿病マウスと比較し、アルブミン尿が増加していた。スリット膜形成関連蛋白やネフリン、ZO-1の減少、基底膜肥厚化、スリット膜密度低下も呈していた。糸球体へ単球やマクロファージ浸潤やNF- κ Bp65経路の活性化は、より顕著であった。さらに、VEGF-A、M1マクロファージ誘導単球走化性タンパク質-1は増加、I κ B α のリン酸化は亢進し、一方アンジオポエチン-1/-2やM2マクロファージ誘導 Arginase-1は減少していた。

糸球体でのCD31陽性内皮細胞領域もVASH-1ヘテロ欠損糖尿病マウスにおいて拡大していた。さらに、糸球体の肥大化、メサンギウム基質やtypeIVコラーゲンも増加し、腎の線維化で中心的な役割を果たすTGF- β 1/Smad3シグナリングも活性化されていた。

高血糖下で培養したマウス由来の糸球体上皮細胞にVASH-1のsiRNAを導入したところ、ネフリン、アンジオポエチン-1、ZO-1の発現は減少しており、VEGF-Aは亢進していた。

これらの結果は、内因性VASH-1が、糸球体上皮細胞への直接的な影響などを介して糖尿病腎症の成立を制御しており、ゆえにVASH-1が糖尿病腎症の治療標的となる可能性が示唆された。

【主論文との関連性】

◎主論文の内容と副論文の内容との直接的関連性について

VASH-2のパラログであるVASH-1の、マウスにおける腎保護効果について示している。

◎論文相互間の引用の有無について

なし。