●症報報告●

生体腎移植後の FSGS 再発で著明な cellular lesion を認め、早期に移植腎機能が廃絶した 1 女児例：液性因子と臨床病理像に関する検討

荻野 大助^{*1*2}・秋岡 祐子^{*1}・近本 裕子^{*1}・久野 正貴^{*1}・大森 多恵^{*1*3}
松村 英樹^{*1*4}・中倉 兵庫^{*1*4}・松永 明^{*5}・服部 元史^{*1}

(受付日：平成20年7月28日 採用日：平成20年8月30日)

要 旨

生体腎移植後の FSGS 再発で著明な cellular lesions (CL) を認め、移植後早期に移植腎機能が廃絶した 1 女児例を経験した。患者血漿中の液性因子と CL との関係や移植腎機能予後との関連性について検討したので報告する。

培養ポドサイト (Mundel 細胞) に患者血漿を添加して integrin-linked kinase (ILK) 活性の経時的変化、ビンキュリン染色による形態変化、培養皿からの剥離について検討した。その結果、ILK 活性の上昇、ポドサイト

接着像の乱れ、そして一部のポドサイトの培養皿からの剥離を認めた。本患者血漿中に、ポドサイトの ILK 活性を上昇させる何らかの液性毒性因子が存在する可能性が示され、ILK 活性上昇の結果、ポドサイトの糸球体基底膜からの剥離や CL が観察され、その後、糸球体硬化が進行して早期に移植腎機能が廃絶したものと推察された。

はじめに

原発性巣状分節性糸球体硬化症 (focal segmental glomerulosclerosis : FSGS) は、難治性ネフローゼ症候群を呈し末期腎不全に至ることの多い予後不良な疾患であり、腎移植後の再発が多いことも臨床上の問題となっている¹⁾。今回、生体腎移植直後に FSGS が再発し、移植後早期の移植腎生検にて著明な cellular lesions (CL) を認め、集学的な治療に抵抗して早期に移植腎機能が廃絶した 1 女児例を経験した。

ポドサイトが傷害を受けると細胞内 integrin-linked kinase (ILK) の活性化が誘導され、糸球体基底膜 (GBM) からの剥離、蛋白尿の出現が生じて腎障害が進行する機序が存在する可能性が示されている²⁾。そこで、患者血漿中の液性因子と CL や移植腎機能廃絶との関連性について、培養ポドサイトの ILK 活性³⁾に注目して検討したので報告する。

^{*1}東京女子医科大学腎臓小児科
(〒162-8666 東京都新宿区河田町8-1)

^{*2}山形市立病院済生館小児科

^{*3}東京都立墨東病院小児科

^{*4}大阪医科大学応用医学講座小児科学教室

^{*5}山形大学医学部発達生体防御学講座小児医科学分野

A case of recurrent focal segmental glomerulosclerosis with cellular lesions soon after living-related renal transplantation : A possible association of the plasma circulating factors with clinicopathologic features

Daisuke Ogino^{*1*2}, Yuko Akioka^{*1}, Hiroko Chikamoto^{*1}, Masaki Hisano^{*1}, Tae Ohmori^{*1*3}, Hideki Matsumura^{*1*4}, Hyogo Nakakura^{*1*4}, Akira Matsunaga^{*5}, Motoshi Hattori^{*1}

^{*1}Department of Pediatric Nephrology, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine

^{*2}Department of Pediatrics, Yamagata City Hospital Saiseikan

^{*3}Department of Pediatrics, Tokyo Metropolitan Bokutoh Hospital

^{*4}Department of Pediatrics, Osaka Medical College

^{*5}Department of Pediatrics, Yamagata University, Faculty of Medicine

Key words : 原発性 FSGS

腎移植後再発

ポドサイト

integrin-linked kinase (ILK)

cellular lesions

図1 移植後臨床経過

RTx：生体腎移植，mPSL：メチルプレドニゾロン，ARB：アンギオテンシンⅡ受容体拮抗薬，FK：タクロリムス，CyA：シクロスポリン，HD：血液透析，RBx：移植腎生検（丸囲みの数字は回数を表す），PE：血漿交換

図2 第1回移植腎生検（術後第53病日）
4/9（44％）の糸球体に上皮細胞の腫大・変性・増生像を伴う cellular lesions が認められた。（PAM 染色 200倍）

図3 第4回移植腎生検（術後第253病日）
典型的な糸球体硬化病変がみられ，また，間質の線維化と尿細管の萎縮が認められた。（PAM 染色 40倍）

症 例

症例：12歳7ヵ月，女兒。

家族歴：腎疾患なし。

既往歴：特記事項なし。

現病歴：6歳11ヵ月時にネフローゼ症候群を発症した。ステロイド抵抗性で，シクロスポリン（CyA）を併用したが完全寛解には至らず，高度蛋白尿が持続して徐々に腎機能は悪化した。9歳9ヵ月時に腹膜透析導入となったが，肺水腫，急性心不全のため9歳11ヵ月時に

血液透析に変更となり，以後，血液透析を継続していた。12歳7ヵ月時に母をドナーにO（+）からO（+）への血液型一致の生体腎移植をうけた。術前に予防的血漿交換（PE）を3回施行し，初期免疫抑制はメチルプレドニゾロン（mPSL）＋タクロリムス（FK）＋ミコフェノール酸モフェチル（MMF）＋バシリキシマブで開始した。

臨床経過（図1）：術後12時間で高度蛋白尿が出現し，FSGSの再発と考え術後第2病日からPEを開始した。なお，術後第1病日に尿漏れに対して膀胱尿管再吻合術を施行したところ，術後，無尿となったため血液透

図4 ILK 活性の経時的変化

ILK 活性は、0 時間の ILK 活性を 1 として、それに対する比率（倍）で評価した。培養ポドサイトには患者血漿を添加後 1 時間目をピークに ILK 活性の上昇を認めた。PAN を添加しても、添加後 1 時間目をピークに ILK 活性の上昇を認めたが、腎移植後再発しなかった FSGS 患者血漿では、ILK 活性上昇は認められなかった。

処置前

血漿添加後24時間

図5 培養ポドサイトの形態変化

患者血漿添加24時間後には、ビンキュリン染色でみた培養ポドサイト接着像の乱れと部分的な剥離が観察された。

析を6回施行した。血液透析中もPEを実施したが、透析離脱後も高度尿蛋白が持続していた。

術後第53病日、血清クレアチニン (Cr) の上昇が見られ、第1回目の移植腎生検を施行した(図2)。4/9 (44%) の糸球体にCLがみられ、また、FK毒性が認められたためFKを減量したところCrは低下した。その後、高度蛋白尿が持続しているためPEを再開したが、Crが徐々に上昇したため、術後第102病日、第2回目の移植腎生検を施行した。CLは14/25 (56%) の糸球体に認められ、1個の糸球体では全周性半月体様であった。その後さらにCrが2.2mg/dℓまで上昇したため、術後第137病日に第3回目の移植腎生検を施行した。FK毒性の所見を認めたためFKを一時中止したところ、Crは0.7~0.8mg/dℓまで低下したためFKからCyAに変更し、そしてアンギオテンシンⅡ受容体拮抗薬 (ARB) を開始して、移植腎機能の保持と尿蛋白の減少に努めた。暫くの間、移植腎機能は安定していたが、高度蛋白尿は持続していた。術後第253病日の第4回目の移植腎

生検(図3)では糸球体硬化病変が主体となっており、その後、移植腎機能は徐々に悪化して、移植後1年10ヵ月で透析再導入になった。

実験方法と結果

培養ポドサイトに対する本患者血漿の直接的な影響を調べる目的で以下の実験を行った。培養ポドサイトはMundel細胞⁴⁾を用い、①血漿添加による培養ポドサイトのILK活性の経時的変化⁵⁾(添加後30分、1、2、8、24時間)、②ビンキュリン染色を用いた培養ポドサイトの形態変化⁶⁾、③Reiserらの細胞剥離アッセイ⁷⁾を用いて、ラミニンコーティングした培養皿からの培養ポドサイトの剥離について検討した。添加した患者血漿は移植後再発に対するPEで得られたものを使用した。細胞毒性のコントロールとして、PAN (puromycin aminonucleoside) を10μg/mlの濃度で培養ポドサイトに添加した。

その結果、①培養ポドサイトに患者血漿を添加したと

ころ、添加後1時間目をピークにILK活性の上昇 (1.6 ± 0.2 倍) を認めた。PANを培養ポドサイトに添加しても、添加後1時間目をピークにILK活性の上昇 (2.7 ± 0.3 倍) を認めた。一方、腎移植後再発しなかったFSGS患者血漿では、ILK活性上昇は認められなかった(図4)。②患者血漿添加後24時間後には、ピンキュリン染色でみた培養ポドサイト接着像の乱れと部分的な剥離が観察された(図5)。③細胞剥離アッセイでは、添加24時間後には $10 \pm 3\%$ の培養ポドサイトの剥離が認められた。PAN添加では、 $16 \pm 5\%$ の培養ポドサイトが剥離した。なお、移植後再発しなかった症例の血漿添加では剥離は認められなかった。

考 察

FSGSは腎移植後に約30%の頻度で再発するため、臨床的に大きな問題となっている¹⁾。移植後再発には患者血液中の液性因子(circulating permeability factors)が関与すると考えられている¹⁾。当施設では、FSGSに対して生体腎移植を施行する場合、術前にこの液性因子を取り除くための予防的PEを施行しており、また、移植後に再発があった場合にも、PEで治療し多くの例で寛解を得ることに成功している⁸⁾。本症例では、術前に予防的PEを施行したが、移植後早期に高度蛋白尿が出現した。また、再発に対する治療としてPEを繰り返して対応したが、蛋白尿を減少させることはできなかった。

本症例の移植腎生検では、移植後早期にCLが認められた。CLはSchwartz⁹⁾が初めて報告したFSGSの組織学的variantであり、細胞性半月体と見誤るような上皮細胞の腫大・変性・増生像と対応する係蹄の虚脱傾向や係蹄内へのマクロファージの浸潤・集積を特徴とする¹⁰⁾。CLは病初期に認められることが多く、典型的硬化像の初期病変と考えられている¹⁰⁾。CLでは高度蛋白尿を呈し腎機能予後は不良とされているが、治療により寛解が得られれば、予後は良いことも報告されている¹¹⁾。このため、蛋白尿を減少させ、腎機能を保護するべく、多数回のPE、FKからCyAへの変更、ARBの併用など集学的な治療を試みたが、尿蛋白を減少させることができず最終的に透析再導入となった。移植腎機能廃絶までの経過が早く、ポドサイト傷害像も強かったことから、前述の実験を行った。

ポドサイトは $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンを介してGBMに接着している。ILKは $\beta 1$ 鎖の細胞質ドメインに結合するセリン/スレオニンキナーゼで、インテグリン機能として重要な細胞接着、細胞骨格編成、細胞増殖、生存・アポトーシスなどに関与している。PANなどによりポ

ドサイトが障害を受けるとILK活性・発現が上昇し、 $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンの接着能が低下してポドサイトのGBMからの剥離が起きることがKretzlerらにより報告されている¹²⁾。

今回の実験結果から、ILKに注目して本症例の病態を考察してみたい。まず、本患者の血漿中には、培養ポドサイトのILK活性を上昇させ、そしてラミニンコーティングした培養皿からの培養ポドサイトの剥離を惹起する何らかの液性毒性因子が存在する可能性が示された。このILK活性を上昇させる液性毒性因子の性状に関して、何らかの成長因子やフリーラジカルの可能性も考えられるが、現在のところ全く不明である³⁾。また、なぜこの液性毒性因子が本症例で存在したのかも不明であり、今後さらに検討が必要と考えている。そして、この液性毒性因子によりポドサイトのGBMからの剥離が起こり、移植腎生検で観察されたポドサイトの腫大、変性、増生を特徴とするCLを形成したのではないかと考えられた。また、ポドサイトのGBMからの剥離は、高度蛋白尿や糸球体硬化病変形成を惹起する重要な事象であるため¹³⁾、腎障害が進行して移植後早期に移植腎機能廃絶につながったと思われる。

ま と め

生体腎移植後のFSGS再発で著明なCLを認め、移植後早期に移植腎機能が廃絶した1女児例を経験した。患者血漿の添加により、培養ポドサイトのILK活性の上昇、接着像の乱れ、培養皿からの剥離が認められたことから、患者血漿中にはポドサイト傷害を惹起する何らかの液性毒性因子が存在する可能性が示唆された。また、本症例の病態として、血漿中の液性毒性因子によりポドサイトのILK活性が上昇し、その結果としてGBMからの剥離やCLが観察され、その後、糸球体硬化が進行して早期に移植腎機能が廃絶したのではないかと考えられた。

謝辞：今回の実験において、ご協力・ご助言をいただいた、愛媛大学・小林直人先生、徳島大学・香美祥二先生、清水真樹先生、Dr. Peter Mundel (Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York), Dr. Matthias Kretzler (Department of Internal Medicine, University of Michigan, Michigan) に深謝いたします。

本論文の要旨は第43回日本小児腎臓病学会学術集会(2008年6月、福岡)において発表した。

日本小児腎臓病学会の定める基準に基づく利益に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) Vincenti, F., Ghiggeri, G.M. : New insights into the pathogenesis and the therapy of recurrent focal glomerulosclerosis. *Am J Transplant* 5 : 1179-1185, 2005.
- 2) 香美祥二 : 進行性腎炎における $\beta 1$ インテグリンファミリーの役割—細胞生物学的アプローチによる糸球体病変の解析—. *日小児会誌* 109 : 795-804, 2005.
- 3) Hattori, M., Akioka, Y., Chikamoto, H., Kobayashi, N., Tsuchiya, K., Shimizu, M., Kagami, S., Tsukaguchi, H. : Increase of integrin-linked kinase activity in cultured podocytes upon stimulation with plasma from patients with recurrent FSGS. *Am J Transplant* 8 : 1550-1556, 2008.
- 4) Mundel, P., Reiser, J., Zuniga Mejia Borja, A., Pavenstadt, H., Davidson, G. R., Kriz, W., Zeller, R. : Rearrangements of cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 236 : 248-258, 1997.
- 5) Kagami, S., Shimizu, M., Kondo, S., Kitamura, A., Urushihara, M., Takamatsu, M., Yamaji, S., Ishigatsubo, Y., Kawachi, H., Shimizu, F. : Up-regulation of integrin-linked kinase activity in rat mesangioproliferative glomerulonephritis. *Life Sciences* 78 : 1794-1800, 2006.
- 6) Kobayashi, N., Reiser, J., Schwartz, K., Sakai, T., Kriz, W., Mundel, P. : Process formation of podocytes : morphogenetic activity of microtubules and regulation by protein serine/threonine phosphatase PP2A. *Histochem Cell Biol* 115 : 255-266, 2001.
- 7) Reiser, J., Oh, J., Shirato, I., Asanuma, K., Hug, A., Mundel, T. M., Honey, K., Ishidoh, K., Kominami, E., Kreidberg, J. A., Tomino, Y., Mundel, P. : Podocyte migration during nephritic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and $\alpha 3$ integrin. *J Biol Chem* 279 : 34827-34832, 2004.
- 8) Ohta, T., Kawaguchi, H., Hattori, M., Komatsu, Y., Akioka, Y., Nagata, M., Shiraga, H., Ito, K., Takahashi, K., Ishikawa, N., Tanabe, K., Yamaguchi, Y., Ota, K. : Effect of pre- and postoperative plasmapheresis on posttransplant recurrence of focal segmental glomerulosclerosis in children. *Transplantation* 71 : 628-633, 2001.
- 9) Schwartz, M. M., Lewis E. J. : Focal segmental glomerular sclerosis : The cellular lesion. *Kidney Int.* 28 : 968-974, 1985.
- 10) Hattori, M., Horita, S., Yoshioka, T., Yamaguchi, Y., Kawaguchi, H., Ito, K. : Mesangial phenotypic changes associated with cellular lesions in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 30 : 632-638, 1997.
- 11) 服部元史, 鈴木俊明, 伊藤克己 : 原発性 FSGS と cellular lesion : 病理像の特徴とその臨床病理学的意義. *日児腎誌* 14 : 17-21, 2001.
- 12) Kretzler, M., Teixeira, V. P. C., Unschuld, P. G., Cohen, C. D., Wanke, R., Edenhofer, I., Mundel, P., Schlondorff, D., Holthofer, H. : Integrin-linked kinase as a candidate downstream effector in proteinuria. *FASEB J* 15 : 1843-1845, 2001.
- 13) Wiggins, R. C. : The spectrum of podocytopathies : A unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int* 71 : 1205-1214, 2007.

A case of recurrent focal segmental glomerulosclerosis with cellular lesions soon after living-related renal transplantation : A possible association of the plasma circulating factors with clinicopathologic features

*¹Department of Pediatric Nephrology, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine

*²Department of Pediatrics, Yamagata City Hospital Saiseikan

*³Department of Pediatrics, Tokyo Metropolitan Bokutoh Hospital

*⁴Department of Pediatrics, Osaka Medical College

*⁵Department of Pediatrics, Yamagata University, Faculty of Medicine

Daisuke Ogino*^{1,2}, Yuko Akioka*¹, Hiroko Chikamoto*¹, Masaki Hisano*¹, Tae Ohmori*^{1,3}, Hideki Matsumura*^{1,4}, Hyogo Nakakura*^{1,4}, Akira Matsunaga*⁵, Motoshi Hattori*¹

We report a 12-year-old girl with recurrent focal segmental glomerulosclerosis with cellular lesions developing soon after living-related renal transplantation. Her graft function progressively deteriorated until she finally developed end-stage renal disease. We studied the association of the plasma circulating factors with clinicopathologic features.

We treated cultured podocytes with her plasma and examined the time-course of integrin-linked kinase (ILK) activity, alterations of focal contacts, and detachments of cultured podocytes from culture dishes coated with laminin-1. We observed an increase in ILK activity, focal contacts were disassembled, and some cultured podocytes were detached from the laminin matrix.

We speculated that circulating toxic factors in her plasma induced an increase in podocyte ILK activity that promoted the detachment of podocytes from the GBM. Podocyte detachment might be associated with the formation of cellular lesions, massive proteinuria, and glomerulosclerosis, which all led to the progressive decline of her graft function.

Key words : primary FSGS, post-transplant recurrence, podocyte, integrin-linked kinase (ILK), cellular lesions