

システムの概要

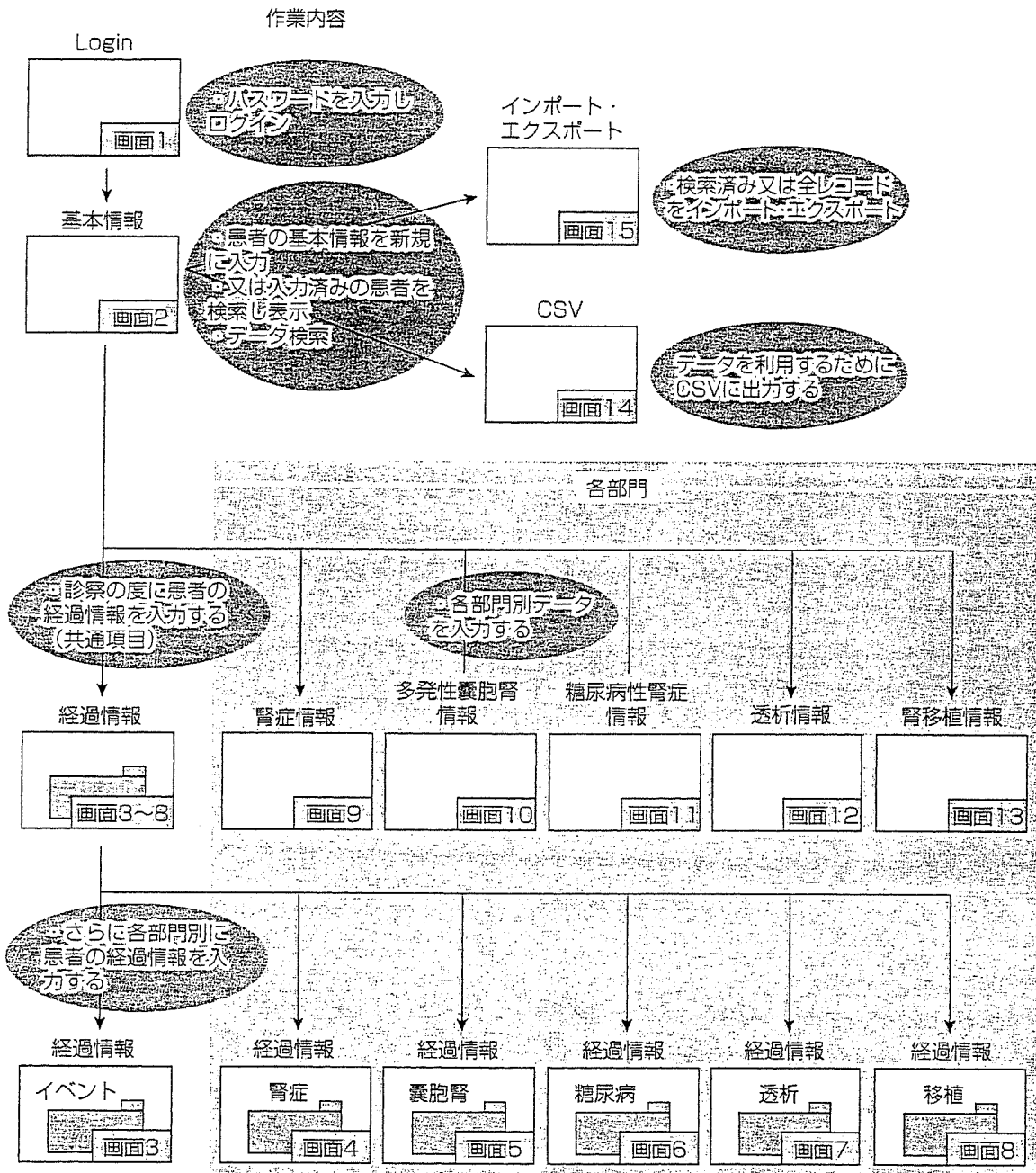


図6. 腎疾患データベースの基本構築

本システムは、腎生検病理診断の精度管理、腎症の障害度と進行度をスコア化して病勢のステージ化を図る標準化、稀症例の呈示などを主治医、専門医、病理医とが情報交換を可能とする点が特徴である。

3. 現在まで腎ネットワーク活動による成果

1) 糖尿病性腎症データベースと生活習慣因子と遺伝因子の解明

国立病院・療養所 72 施設が参加して共通プロ



図7. 腎疾患データベースの例示

トコールによるデータベース構築を行い、II型糖尿病症例が218例(8年以上の糖尿病罹病期間を認める65歳以下の、血清Cr<2.0mg/dlであり、糖尿病性網膜症(SDR以上)を有し、かつ文書同意を得た症例)、正常アルブミン尿群;86例、微量アルブミン尿群;63例、顕性腎症群;69例が登録された。生活環境と遺伝子の両面からの解析による糖尿病性顕性腎症の病態特性として、①HbA1c \geq 8.0%の不適切な血糖管理状況が3.9倍②高血圧(>130/85mmHg)の存在が9.9倍③dyslipidemia(量的・質的脂質代謝異常)が3.4~4.8倍④凝固系異常が5.9倍相対的に高く存在した。また、食事・栄養摂取の調査からある

種のアミノ酸(プロリン等)の摂取が腎機能と関連があり、また黄緑色野菜等に含用される抗酸化作用のあるビタミン摂取が腎症進展群で少ないことが明らかになった。かかるデータから、現在の医療レベルでも、判明した糖尿病性腎症の病態特性にintensiveに介入すれば、進展を抑制できる可能性と期待が見いだされた。

2) IgA腎症における腎組織病変のスコア化と治療指針作成に関する研究

腎生検でIgA腎症と診断され、採取糸球体8個以上、腎生検後観察期間2年以上の305例を対象に、腎組織病変をメサングウム細胞増殖、管内マイクロファージ浸潤、細胞性・線維細胞性



図8. 腎病理カンファレンスシステムの例示

半月体形成、及び間質リンパ球浸潤などの活動性と糸球体球状硬化、分節状硬化、線維性半月体・癒着、尿細管間質障害などの進行度を数量化 (activity index ; AI, chronocity index ; CI) し、1日尿タンパク量 (UP) を加えた3要素からステロイド療法による予後改善効果を検討した。その結果、① CIが5点以上の群はステロイドの有無による有意差はなく、② CI5点未満・AI5点未満・UP 1g未満の群ではステロイド療法の有効性は6%と低く、③ CI5点未満・AI5点以上/UP 1g以上の群ではステロイドにより有

意な尿タンパク減少が認められ、有効性が92%に認められた。腎ネットワークでは腎組織病変のスコア化とUPの3要素からステロイド療法を判断する検討を行っている。

3) 腎移植データベースと慢性拒絶の病態解明及び治療法の研究

腎移植例のほぼ全例を網羅する457症例のデータを充実させ、診療と臨床研究に用いるネットワークを構築した。病理学的解析ではシクロスポリン腎毒性が1カ月以内、急性拒絶反応は1年未満、慢性拒絶反応、IgA腎症など再発、移植

糸球体症は1年以上の経過にみられる傾向が示された。遺伝子解析では血圧制御に関係あるACEと慢性炎症や線維化などに関連するTGF- β 1 (tumor growth factor- β 1)の遺伝子多型の偏在が、腎機能悪化群で認められた。データベース活用を通して、慢性移植腎障害の病態を解明すべく検討が開始されている。

まとめ

わが国は未曾有の高齢化社会を迎え、特に糖尿病、腎硬化症といった高齢者の腎不全予備軍が増大しつつある。透析患者は20万人を越え、10年以上透析者が25%を占めるにいたり、長期透析合併症の増加も顕著であるが、腎移植は低迷を続け、わが国の腎不全医療は医学的、社会的、経済的にも深刻な問題を抱えている。一次性・二次性腎炎・腎症の早期発見・早期治療に努め、活動性を抑制し、進展にかかわる進行因子を阻止する長期的管理が求められているにもかかわらず、有意なEBMが欠落している。本ネッ

トワークは、国立病院・療養所をあげて組織的に構築されたが、このようなネットワークを構成し、支えていくのはあくまでもネットワーク参加の医療人である。これを機会に関係者が一致協力してこれまでなし得なかった課題に挑戦して、医療成果を挙げることを期待したい。

文 献

- 1) 日本透析医学会統計調査委員会：わが国の慢性透析療法の現況 (2002)。
- 2) 日本移植学会：腎移植臨床登録集計報告(2003)-1 2002年腎移植件数報告。移植 38(2):137-142。
- 3) 厚生科学研究：医療技術評価総合研究事業「腎不全予防治療指針作成のためのネットワーク利用による医療情報の開発に関する研究」(主任研究者 柏原英彦)1998-2000 報告書。
- 4) 厚生科学研究：健康科学総合研究事業「全国規模ネットワークシステムでの患者登録による糖尿病性腎症の解析と腎症進展阻止指針作成の為の体制整備に関する研究」(主任研究者 山田研一) 1998-2000 報告書。
- 5) 厚生労働科学研究：効果的医療技術の確立推進臨床研究事業「難治性腎疾患の進展抑制のための新たな指標作成とそれに基づく治療指針作成に関する研究」(主任研究者 山田研一) 2001-2002 報告書。

臓器移植と分子病理学

城 謙 輔¹, 山田 研一²

¹国立千葉東病院臨床研究センター免疫病理研究部, ²同病態機能研究部

I. はじめに

ヒトの臓器移植においては、いろいろな機序で移植された臓器は障害を受ける。免疫学的には拒絶反応であり、血管、胆管、尿管などの管腔の狭窄、血栓、縫合不全、阻血・灌流障害による細胞変性、さらに細菌、真菌、ウイルスによる感染症、薬剤中毒、原病の再発などと病態は多方面にわたる。その中で、分子病理学には、主として拒絶反応の診断と予後予測の分野で大きな期待が寄せられている。拒絶反応は基本的には血管-間質系の反応であり、その機序は液性免疫と細胞性免疫に大別される。前者は超急性、急性促進性、急性液性拒絶に、そして後者は急性細胞性拒絶と慢性拒絶に関係する。特に慢性拒絶反応には免疫学的機序の他に、動脈の狭窄による虚血性障害や薬剤毒性の機序も関係するが、急性拒絶が繰り返し発症し、慢性拒絶に至る機序が重要な予後不良因子であることには変わりない。急性拒絶の診断の遅れが拒絶反応の進展を受け入れ、非可逆的な慢性拒絶を誘導してしまう¹⁾。

拒絶の診断は生検を gold standard としている。生検には、術中生検、移植臓器の機能状態に関係なく計画的に実施される定期生検 (protocol biopsy)、移植臓器の機能低下あるいは何らかの異常が現れてから実施される偶発生検 (episode biopsy)、そして退院時生検がある。また、subclinical rejection といわれ、臨床的に機能障害がなくとも定期生検により拒絶反応が見出されることがあり、その際には免疫抑制剤の増量が考慮される。そのため、生検の時期を逃すと治療の機会を逸することになる。これらのことから、患者の負担や危険を伴わず、より簡便かつ頻回にでき、診断の

感度が高く、拒絶反応に特異性をもった分子病理学的検査法が望まれている。

この総説では、拒絶反応の診断、短期的予知、そして長期的な予後の予測に分子病理学がどの程度まで実用化されているかを腎移植を中心にまとめてみた。

II. 臓器生検の限界と分子病理学の必要性

臓器生検が、移植拒絶反応の診断、治療、予後予測、疾患の理解の面で主役を演じてきたが、生検には以下の限界が指摘されている。第1に、形態はいくつかの病態に対応しているため、組織診断にあたって形態学的状況証拠を提示し、鑑別診断をあげ、臨床データとつきあわせて疾患や病態を診断してきた。特に、移植病理はその特徴として、機序的にも時間的にも異なったいろいろな病態が生検の形態に折り畳まれているため、生検の時期や治療歴、その他の臨床データから、織り込まれた形態像を解きほぐすことが必要となる。その点で、拒絶に特異性の高い補助的診断が求められている。第2に、生検は拒絶の結果を診断するだけで拒絶反応の予測ができない。急性拒絶の発症を未然に予測しその発症を抑えることが、長期的観点での慢性拒絶への進展を予防し、また遅らせることができる。第3に、頻回の生検は患者に負担がかかるばかりでなく、ごく限られた領域から採取されるためサンプル・バイアスがかかる。陽性所見が発見できれば拒絶の診断が可能となるが、陰性の場合には false negative を絶えず考慮しなければならない。

以上の生検の限界を踏まえて、分子病理学に期待されていることは、拒絶反応の診断と予測において、患者に負担を与えず (non-invasive)、特異性 (specificity)

と感度 (sensitivity) の高い補助的役割を果たすことである。移植臓器の機能障害が生検における炎症反応に対応するが、炎症反応、主としてリンパ球浸潤が組織内に出現する前に、臓器には免疫学的な準備状態が起こる。すなわち、サイトカイン、接着因子、T細胞の共刺激因子 (costimulatory factor)、アポトーシス関連蛋白などの組織内発現が炎症細胞浸潤に先行するといわれる。それらを分子病理学的に組織内 (intra-graft) で証明することができれば、急性拒絶発症の予知につながる。一方、患者に侵襲的な生検を頻回に行うことなしに、拒絶反応を末梢血液中のリンパ球や尿から感知できる手法があれば、拒絶をモニターし、その進展を把握することもできる。

III. これまでの臓器移植に関する分子病理学の歩み

分子病理学的手法は多方面にわたる。組織切片上の *in situ* hybridization (ISH), *in situ* PCR や mRNA ISH 法による分子形態学的診断, FISH 法による染色体異常の解析, PCR による感染症の診断などが挙げられる。さらに、臓器移植後の拒絶に関する免疫学的なモニタリングは、移植患者の血液細胞、移植臓器からの逸脱酵素、血清や尿中の免疫関連蛋白を標的として、種々の抗体を用いて、ELISA, flow cytometry あるいは免疫組織化学的手法により行ってきた。しかし最近では、より再現性が高く安定な RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) を用いて、移植臓器、血液、尿中の mRNA の発現を半定量的に調べる手法が主流をなしている。

RT-PCR を用いた戦略としては、第 1 に、免疫学的知識からあらかじめ候補となる遺伝子を想定して、その数種の候補遺伝子に関して、それぞれの mRNA から RT-PCR により cDNA を増幅して、半定量的に発現量を測定し、拒絶反応のマーカーとして最も信頼性のあるコンビネーションを探り当てる方法である。第 2 の方法としては、検体内の mRNA から RT-PCR により cDNA を増幅産生し、発現している遺伝子群を microarray により網羅的に調べ、対照群の非拒絶臓器での発現と比較することにより、拒絶症例に特異的な遺伝子発現をパターン認識するものである。検索対象は移植臓器片で行うのが信頼性が高いが、末梢血中の単核球や尿、胆汁、肺内洗浄液で行うこともある。

腎移植の分野では、Strom TB (Harvard Medical School) と Suthanthiran M (Cornell Medical Center) の功績が分子病理学と臓器移植の実践を大幅に

結びつけた^{2,3)}。その歴史をたどることが、この分野の理解に最も適していると思う。彼らは pyogenic pro-inflammatory cytokine の解析から始めた。移植片における IL-1 (interleukin-1), TNF α (tumor necrosis factor α), そして、IL-6 について semiquantitative RT-PCR (QRT-PCR) を用いて、移植腎組織における mRNA の発現量を調べたが、再現性のある結果が得られなかった。さらに、IL-2 や IFN γ などのサイトカインについても同様に調べたが成果が得られなかった。特に、Th1 型リンパ球関連のサイトカインについては、あらかじめ治療で投与される calcineurin inhibitor をはじめとした免疫抑制剤の影響が強く、その結果として、false negative の症例数が true positive の症例を上回ったため実用に供しないことがわかった³⁻⁵⁾。

その後、cytotoxic T lymphocyte (CTL) effector molecule に着目した⁶⁾。CTL に内在する serine proteinase である granzyme B と perforin は、従来、CTL による細胞融解性機構に関与するといわれ、免疫組織化学的には granzyme A, B が急性拒絶反応症例の尿細管上皮に浸潤するリンパ球に多く発現するという報告があった⁷⁾。また、この分子は急性拒絶反応に特異性が高く、尿細管間質の炎症の強さとは相関しないものの、移植拒絶腎以外の間質炎の症例では発現がなかったという⁸⁾。Fas ligand (FasL) は活性化 T 細胞の表面に表出し、Fas を表出している細胞にアポトーシスを誘導するため、granzyme B や perforin とともに CTL effector molecule のひとつとされている⁹⁾。これらの分子の mRNA 発現は、CTL の活性相 (activating phase) に著明に発現し、休止期 (resting phase) には発現が起こらないことから、2 値 (black and white) 的な捉え方が可能で、その点で検出の感度 (sensitivity) を上げることができたこと、そして、CTL 以外の腎実質組織によって発現されないことの原因から急性拒絶に対する特異性 (specificity) も高い結果となった^{9,10)}。これらの成果は腎生検材料を用いることによって得られたが、さらに非侵襲性と簡便性の観点から、末梢リンパ球や尿沈渣の転写について同様に解析する方向に向かっている。

mRNA から cDNA を RT-PCR で増幅する段階で定量性を持たせることでも工夫が見られる。すなわち、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) などのもともと腎組織に内在して発現する遺伝子 (constitutively expressed gene) に着目し、

その単位あたりの granzyme B の cDNA 量を調べることで、個体間でのばらつきを標準化することができた。通常、mRNA の増幅には 10 μ g の total RNA か 500 ng の mRNA が必要とされるが、RNA の抽出法の最近の進歩も手伝って針生検材料でも実用が可能となった¹¹⁾。上記の CTL の serine proteinase の再現性の他に、IL-10, IL-7, IL-15 などのサイトカイン、T cell receptor の constant region も再現性が高く実用性のある指標であることがわかった³⁻⁵⁾。

以上の経緯を踏まえて、以下、分子病理学がどの程度生検の役割を補足しているかを中心に概説する(図1)。

IV. 組織生検を用いた拒絶反応における mRNA の発現

急性拒絶腎において、活性化 CD3⁺ cytotoxic T cell や CD56⁺ natural killer cell (NK cell) の顆粒に含まれる cytotoxic effector molecule である perforin, granzyme B, FasL は、腎から組織を採取し RT-PCR にて mRNA を定量化した結果、軽度の炎症細胞浸潤を認める症例においても specificity, sensitivity とともに 100% の信頼性があった⁵⁾。しかし、上記の cytotoxic marker の発現の上昇は、血清クレアチニンの最大値やバンフ分類における rejection grade と相関はなかった¹²⁾。一方、治療抵抗性の急性拒絶症例(7例)において、治療に反応した症例(8例)に比して FasL だけが有意に発現が上昇していたため、治療抵抗性の指

標になる可能性がある¹³⁾。granzyme B, perforin, IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ のうち granzyme B, IL-10, そして IL-2 が急性拒絶反応と相関したが¹³⁾, IL-2, IL-4, IFN γ は急性拒絶症例においても検出率が悪く、最近の免疫抑制治療の IL-2 と IFN γ に対する有効な治療のためだとしている⁵⁾。その他、IL-7 や IL-15 も急性拒絶に発現していたが、RANTES と IL-8 は sensitive であるものの、急性拒絶に specificity の低いマーカーといわれる⁵⁾。患者の負担の軽い吸引細胞 (fine needle aspirates) を用いた研究では、移植後 10 日間に連続して IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ についての mRNA の発現を追跡した結果、最初の 4 日間では IL-10 のみが亢進し、その後、腎機能の低下症例、非低下症例にかかわらず、IL-2 と IFN γ が炎症細胞浸潤に先行して亢進していた¹⁴⁾。一方、光顕的に拒絶反応のない症例においては、IL-2 か IFN γ のどちらかしか検出されなかった¹⁴⁾。心臓移植においても、拒絶の程度や機能の低下に相関する mRNA として、granzyme A が挙げられている¹⁵⁾。また、IL-2 receptor, IL-1 β , TNF α の mRNA の発現がステロイド反応性の症例で、ステロイド抵抗性の症例より有意に低値であったため、ステロイド反応の指標になるという報告もある¹⁶⁾。

一方、慢性拒絶に TGF β 1 が相関するという点では諸家の文献は一致している^{5,12,17)}。non-heart beated donner (心停止ドナー) は heart-beated donner (脳死ドナー) に比して、虚血障害からくる腎機能回復の遅延が高頻度であるにもかかわらず、心停止ドナーと脳死ドナーの間で、少なくとも移植後 1 週間目には糸球体内の線維化関連遺伝子に関する mRNA の発現には差がなかった¹⁸⁾。また、急性拒絶腎の糸球体にも同様な線維化関連遺伝子 (collagen III, collagen IV, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, tenascin) の発現はなかった¹⁹⁾。その他のサイトカインに関しては心移植での成果がある。bFGF (basic fibroblast growth factor) の mRNA が移植後第 1 週以内に発現した場合に、移植後 1 年以内に拒絶反応が起きる可能性が高い²⁰⁾。また、AIF-1 (allograft inflammatory factor 1) の mRNA が発現すると、allograft vasculopathy になる確率が高いといわれる²¹⁾。

腎機能が正常で、腎生検でバンフ分類の急性拒絶か、あるいは境界領域変化 (Borderline changes) を認める症例は、subclinical rejection といわれるが、この拒絶の適切な診断も分子病理的手法によりなされて

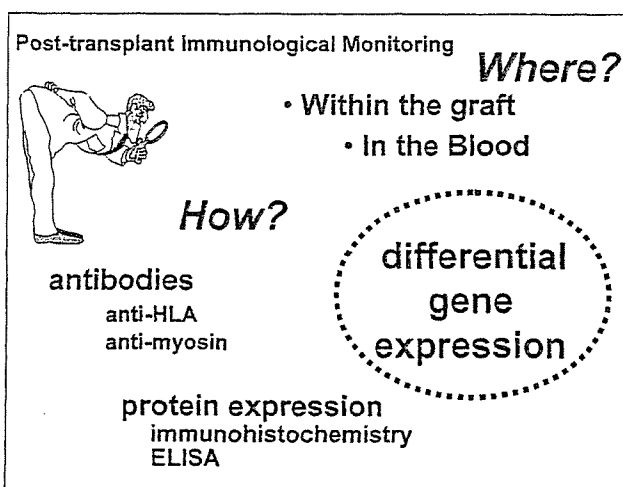


図1 第7回 Banff 会議において、Dr. M. Gerbase de Lima の講演に使用されたスライドの1枚²¹⁾。テーマは“心臓移植における分子病理”であったが、ストーリー性のある内容であった。本稿もその講演を参考にしている。

いる。Lipmanらは症例を、正常、borderline sub-clinical rejection, acute subclinical rejectionに分けて、TNF α , IL-1 β , TGF β , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-15のサイトカインに対するmRNAの発現を定量的に調べたところ、acute subclinical rejectionと正常症例では明らかな差があり、borderline sub-clinical rejectionはその中間であったことを報告している²²⁾。そして、subclinical rejectionの症例は長期間における腎機能に障害性に関連するため、治療を考慮すべき対象としている²²⁾。

急性拒絶反応の発症の予知に関して、granzyme B, perforin, FasLは組織にリンパ球が浸潤する前の時期、すなわち、腎機能と形態像が正常な時期から、mRNAの転写が始まるといわれる (pro-inflammatory gene transcript)。心生検標本を、急性拒絶のない時期、急性拒絶の始まる7~15日前の時期、拒絶の始まりから7~15日の時期に分け、そのCD40L, IFN γ , FasLのmRNAを比較すると、拒絶の始まる7~15日前の時期からこれらのcytotoxic effector moleculesのmRNAが増強していることがわかり、急性拒絶発症の予知が可能であった²³⁾。また、Tリンパ球の共刺激因子 (costimulatory factor) のひとつであるT-cell immune response cDNA 7 (TIRC7) が心移植組織において上昇し、末梢血中の単核球において減少することも急性拒絶発症の予知につながるという²⁴⁾。

急性拒絶反応における接着因子の研究では、ICAM1とVCAM-1のmRNAの発現が拒絶反応と関係している。ICAM1とVCAM-1は正常と移植腎においてほぼ相補的な分布を示すが、急性拒絶の筋性小動脈の内皮にもmRNAの発現を認め、また、細動脈の血管拒絶を認める症例では血管壁の平滑筋細胞にもICAM1とVCAM-1のmRNAが発現することを*in situ* hybridizationにより証明している²⁵⁾。

V. 末梢リンパ球, 尿を用いた拒絶反応におけるmRNAの発現

末梢血の単核球を用いて急性拒絶に関するmRNAの発現を調べることは、生検に比して非侵襲的で、頻回に施行できることから、より理想的な分子病理学的手法といえる。しかし現在は、より多くの証拠を集積している段階である。腎移植においては、急性拒絶症例の末梢リンパ球にgranzyme B, perforin, FasLのmRNAが増強していた²⁶⁾。また、末梢のCD4⁺ T細胞におけるCD40 ligand (CD40L) 遺伝子のmRNA

発現を、非移植対照腎、急性・慢性拒絶腎、移植腎で腎機能の正常な症例の3群において比較したところ、急性拒絶のBanff 97 scoreと傍尿細管毛細血管病変の程度に相関していたという²⁷⁾。さらに、CD40L遺伝子のmRNA発現は末梢CD4⁺ T細胞に対するCsAやFK506の*in vitro*での反応性のよい指標になったという²⁷⁾。末梢リンパ球でのFasL mRNAの発現が慢性拒絶腎に亢進し、それによって誘導されたアポトーシスが慢性拒絶腎の組織障害に関与するとの報告もある⁸⁾。尿中に排出された細胞を用いた研究では、perforinとgranzyme BのmRNAの発現を定量的に測定してcut off値を決め、急性拒絶腎の診断が可能であったという報告がある²⁸⁾。また、尿中のBKウイルス感染の診断にBKVP1に対するmRNAの検出が有効であった²⁹⁾。急性拒絶と急性尿路系感染との区別を尿中に排出された細胞から調べると、granzyme B mRNAの発現によって鑑別診断が可能であったという報告がある³⁰⁾。心移植の急性拒絶に関しても、末梢リンパ球のperforin, granzyme B, IFN γ のmRNA発現の亢進とIL-8, TNF α mRNAの発現が低下する結果が出ている³¹⁾。mRNAの増幅による手法ではないが、mass spectrometryを用いて、急性拒絶腎に特異的な尿蛋白出現パターンを同定して診断に役立てている論文も見られる³²⁾。

VI. cDNA microarray analysis

移植臓器組織に発現しているすべてのmRNAに着目し、RT-PCRにより対応するcDNAを増幅し、それをすでにわかっている既存の多種のoligonucleotideによる遺伝子チップに反応させ、疾患固有のパターン (finger print)を見ようとするDNA microarray法も有効な手段である^{33,34)}。cDNA microarray analysis (technology) はbioinformaticsの発達とともに実用面に大きく近づいた³⁵⁾。すなわち、cluster analysis (hierarchical cluster analysis) やself organizing mapsの作製、そしてprinciple component analysisなどが可能となり、これまでの個々の遺伝子mRNA発現の解析では不可能であった急性拒絶や慢性拒絶における亜型の診断を可能としている。

Sarwalらは、67症例の腎移植症例の腎生検材料を用いて、cluster解析を併用してcDNA microarray analysisを行い、腎生検、臨床経過、治療反応と対応させたところ、急性拒絶型、薬物中毒型、慢性拒絶型、正常型の4つ群に分けることができた。さらに、急性

拒絶群は免疫活性化と細胞増殖に関する遺伝子群により3つの亜型に分けられた。そして、その中の1つの亜型がCD20⁺ B細胞の浸潤がある症例群で、臨床的にステロイド抵抗性で移植腎機能廃絶に相関したという興味ある結果が得られている³⁶⁾。high-density oligoarray (GeneChip, Affymetrix, Santa Clara, CA) を用いた研究では、6800のヒト遺伝子中32から219の間の遺伝子が拒絶のない対照群に対して4倍以上の高値を示した。すなわち、7例中7例全例にmRNAの発現の亢進した遺伝子として、INF γ に誘導された monokine, T-cell receptor active β chain protein, interleukin-2 stimulated phosphoprotein, そして、RING4 (a transporter involved in antigen presentation) の4つが挙げられ、7例中6例にmRNAの亢進していた遺伝子としては、interferon-stimulated growth factor-3, complement factor 3, nicotine amide N-methyltransferase, macrophage inflammatory protein-3 β , myeloid differentiation protein, そして、CD18が挙げられた。この遺伝子チップを使用する限り、以前から報告のある cytotoxic T-cell effector 分子の亢進はなかったという³⁷⁾。

慢性拒絶症例に関しては、移植後6カ月と12カ月とを比較し、移植後12カ月目に慢性拒絶に進展した症例に10個の遺伝子セットが関係し、それにより6カ月後の予後が予測できたという報告がある³⁸⁾。また、慢性拒絶、嚢胞腎末期、正常腎の症例において、7K ヒト cDNA microarray を用いて解析した結果、細胞代謝、輸送、シグナル、翻訳活性、接着、免疫反応に関する571遺伝子のヒエラルキー・クラスター解析で上記の3つの疾患を鑑別することができた³⁹⁾。そして、慢性拒絶群においては2つの異なった亜型 (subset) の heterogeneity が見いだされた³⁹⁾。末梢血の単核球を用いた microarray の仕事はわずかであるが、長期生着症例の末梢リンパ球を解析した研究⁴⁰⁾ も始めている。

以上、cDNA microarray を用いた臓器移植の研究は、光顕診断では区別がつかない急性拒絶や慢性拒絶の亜型を鑑別し、予後の予測や発症の予知に貢献する可能性がある。

VII. microdissection 法の応用

腎臓は形態的にも機能的にも高度に分化した臓器で、糸球体と間質尿細管で、構成細胞も機能も大きく分かれている。そのため、遺伝子発現の解析のために

採取された腎組織における細胞の heterogeneity が研究成果の再現性に障害となる可能性がある。その観点から、microdissection法を組み合わせ、特定の組織の場所を切り出し、そのmRNAの発現をみる手法は有効である。臓器移植に関するこの方面の研究はまだ黎明期にあるといえる。急性拒絶の大部分は尿細管間質に病変が起こり糸球体には変化が起これないため、microdissectionを併用することなしに成果が出ているのかもしれない。最近のKretzlerらによる総説は今後の指針を立てる意味で参考になる^{41,42)}。

VIII. おわりに

臓器移植の分野における分子病理学はこれまで述べてきたような方向に進んできたと思う。移植後の経過中に、感染症や合併症、さらに薬剤中毒を避けることはいうまでもないが、現在の臓器移植の治療学において、有効かつ実用的な手段は免疫抑制剤の適正な使用であり、また、現在、持ち合わせている治療法を効果的に使用できる余地のある分野でもある。それにより、急性拒絶の頻度と強度を最小限に抑え、慢性拒絶への進展を防ぐか、少なくともその時期を延ばすことが、古くて新しい移植治療のひとつの課題であるかもしれない。

謝辞：本稿を終えるにあたり、貴重な資料を提供していただきました名古屋第二赤十字病院腎臓内科 両角國男先生に深甚なる感謝の意を表します。

文 献

- 1) Almond PS, Matas A, Gillingham K, Dunn DL, Payne WD, Gores P, Gruessner R, Najarian JS. Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993; 55: 752-756.
- 2) Strom TB, Suthanthiran M. Prospects and applicability of molecular diagnosis of allograft rejection. *Semin Nephrol* 2000; 20: 103-107.
- 3) Suthanthiran M. Acute rejection of renal allografts: mechanistic insights and therapeutic options. *Kidney Int* 1997; 51: 1289-1304.
- 4) Suthanthiran M. Molecular analyses of human renal allografts: differential intragraft gene expression during rejection. *Kidney Int Suppl* 1997; 58: S15-21.
- 5) Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, Strom TB. Quantitative detection of immune activation tran-

- scripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 695-700.
- 6) Kummer JA, Wever PC, Kamp AM, ten Berge IJ, Hack CE, Weening JJ. Expression of granzyme A and B proteins by cytotoxic lymphocytes involved in acute renal allograft rejection. *Kidney Int* 1995; 47: 70-77.
 - 7) Lipman ML, Stevens AC, Strom TB. Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. *J Immunol* 1994; 152: 5120-5127.
 - 8) Kasprzycka M, Klodos K, Nowaczyk M, Wyzgal J, Podobinska I, Durlak M, Gorski A. Expression of FasL gene in T cells of renal allograft recipients. *Immunol Lett* 2002; 80: 9-13.
 - 9) Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Maslinski W, Shapiro M, Strom TB. The intragraft gene activation of markers reflecting T-cell-activation and -cytotoxicity analyzed by quantitative RT-PCR in renal transplantation. *Clin Nephrol* 1996; 46: 30-33.
 - 10) Pavlakis M, Lipman M, Strom TB. Intragraft expression of T-cell activation genes in human renal allograft rejection. *Kidney Int Suppl* 1996; 53: S7-12.
 - 11) Suthanthiran M. Human renal allograft rejection: molecular characterization. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13 Suppl 1: 21-24.
 - 12) Nickel P, Lacha J, Ode-Hakim S, Sawitzki B, Babel N, Frei U, Volk HD, Reinke P. Cytotoxic effector molecule gene expression in acute renal allograft rejection: correlation with clinical outcome; histopathology and function of the allograft. *Transplantation* 2001; 72: 1158-1160.
 - 13) Suthanthiran M. Clinical application of molecular biology: a study of allograft rejection with polymerase chain reaction. *Am J Med Sci* 1997; 313: 264-267.
 - 14) McLean AG, Hughes D, Welsh KI, Gray DW, Roake J, Fuggle SV, Morris PJ, Dallman MJ. Patterns of graft infiltration and cytokine gene expression during the first 10 days of kidney transplantation. *Transplantation* 1997; 63: 374-380.
 - 15) Alpert S, Lewis NP, Ross H, Fowler M, Valentine HA. The relationship of granzyme A and perforin expression to cardiac allograft rejection and dysfunction. *Transplantation* 1995; 60: 1478-1485.
 - 16) Baan CC, Niesters HG, Balk AH, Mochtar B, Zondervan PE, Weimar W. The intragraft cytokine mRNA pattern reflects the efficacy of steroid antirejection therapy. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15: 1184-1193.
 - 17) August P, Suthanthiran M. Transforming growth factor beta and progression of renal disease. *Kidney Int Suppl* 2003; 87: S99-104.
 - 18) Jain S, Bicknell GR, White SA, Williams ST, Furness PN, Nicholson ML. Comparison of the expression of fibrosis-associated genes in glomeruli after renal transplantation between conventional cadaveric and non-heart-beating donors. *Br J Surg* 1999; 86: 1264-1268.
 - 19) Brook NR, White SA, Waller JR, Bicknell GR, Nicholson ML. Fibrosis-associated gene expression in renal transplant glomeruli after acute renal allograft rejection. *Br J Surg* 2003 (8); 90: 1009-1014.
 - 20) de Groot-Kruseman HA, Baan CC, Loonen EH, Mol WM, Niesters HG, Maat AP, Balk AH, Weimar W. Failure to down-regulate intragraft cytokine mRNA expression shortly after clinical heart transplantation is associated with high incidence of acute rejection. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20: 503-510.
 - 21) Autieri MV, Kelemen S, Thomas BA, Feller ED, Goldman BI, Eisen HJ. Allograft inflammatory factor-1 expression correlates with cardiac rejection and development of cardiac allograft vasculopathy. *Circulation* 2002; 106: 2218-2223.
 - 22) Lipman ML, Shen Y, Jeffery JR, Gough J, McKenna RM, Grimm PC, Rush DN. Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation* 1998; 66: 1673-1681.
 - 23) Shulzhenko N, Morgun A, Franco M, Souza MM, Almeida DR, Diniz RV, Carvalho AC, Pacheco-Silva A, Gerbase-Delima M. Expression of CD40 ligand, interferon-gamma and Fas ligand genes in endomyocardial biopsies of human cardiac allografts: correlation with acute rejection. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 779-784.
 - 24) Shulzhenko N, Morgun A, Rampim GF, Franco

腎移植後発症の糖尿病(PTDM)

国立病院機構千葉東病院臨床研究センター・内科

山田 研一

はじめに

糖尿病は、現在、本邦において生活習慣病の重要対象疾患として位置づけられている。2002年の厚生労働省の調査では、740万の糖尿病もしくはその疑いのある人がいると推定され、5年前の1997年の調査に比べ50万人の増加を認めている。

一方、今回の review の対象である移植医療後発症の糖尿病(PTDM)は、近年の生活習慣病の罹患増大の観点からも注目を集めてきた。移植医療や患者管理の進歩に伴い、急性拒絶反応の減少やその程度は軽減された一方、長期生着に伴う慢性拒絶反応や慢性移植腎症(chronic allograft nephropathy : CAN)の病態、さらに心血管合併症による死(death with functioning graft)が問題になってきた。CANはその病態として、免疫学的機序とともに非免疫学的機序が関与しており、そのなかで糖尿病の病態としての関与は重要である。長期生着腎移植患者の graft loss の43%にもものぼる death with functioning graft は¹⁾、心血管事故死が重要な位置を占め、その一部は、糖尿病または耐糖能異常(IGT)の病態の関与が示唆されている。

そこで今回、移植後の糖尿病の疫学・病態・治療・管理に関して概説する。

移植後発症の糖尿病(PTDM)の疫学

1. PTDM 発症

PTDMの疫学を検討するにあたり困ったことは、PTDMの、特に「DM」の定義が文献により異なっており、一致していないことである。今回はそのことを十分考慮したうえのこととする。今後の検討のこともあり、PTDMについて提唱されている定義は後述する。

日本移植学会からの大規模なPTDM発症率に関する報告は現在のところない。PTDMは必ずしも permanent に発症し続けるものでもなく、治療せずに寛解することもあり正確な把握は難しいが、米国からの大規模調査報告では移植後3カ月、1年、3年でそれぞれ9%、16%、24%程度の発症とされている²⁾。腎移植患者では移植後6カ月間に発症リスクが高く5.9%、その後も7.1%(1カ月)、10.4%(3年目)、13.2%(5年目)、20.5%(10年目)と増加している(図1)³⁾。

2. PTDMにおける graft 生着率

Rothらの報告⁴⁾では、腎移植後のPTDMは graft survival は3年目で対照群に比較し71% vs. 86%と悪く、長期 follow-up(12年後)ではさらに悪化しており、腎機能自体も低下していた。糖尿病性腎症の発症には、糖尿

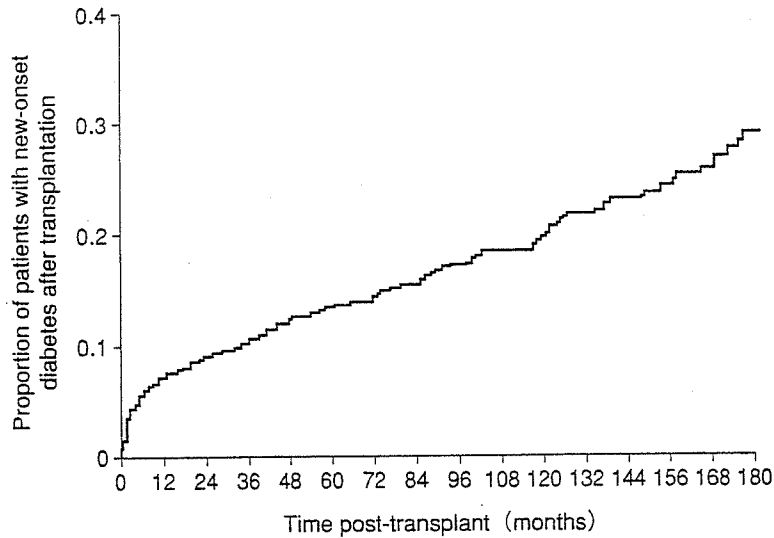


図 1 移植後の糖尿病発症率
(Kaplan-Meier 法)

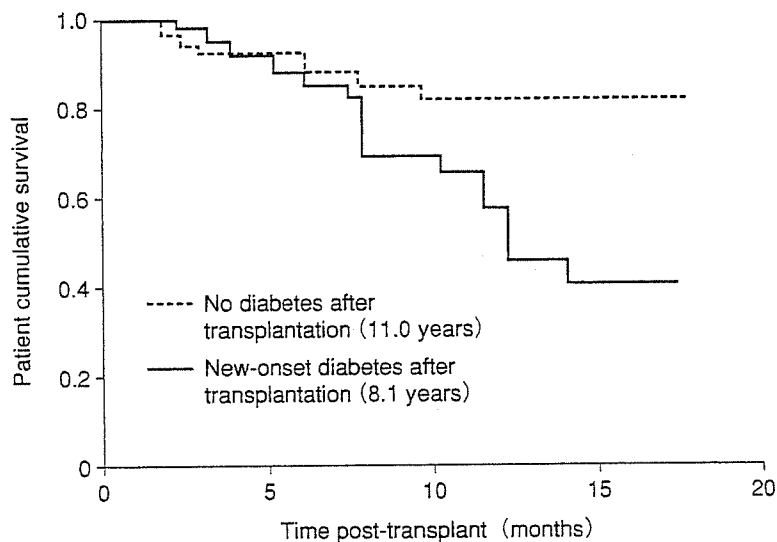


図 2 腎移植後発症糖尿病患者の生存率
PTDM と DM 非発症の比較 (Kaplan-Meier 法)

病発症から少なくとも 5~10 年の年月が必要であるが、腎移植患者の場合、単腎であること (glomerular hyperfiltration) に加え拒絶反応、免疫抑制剤による障害が加味され、糖尿病性腎症の発生を速める可能性がある。さらに糖尿病合併症としての高血圧の存在の可能性も重要である。しかし、前述の移植腎喪失の 43% が death with functioning graft であることは重大であり、その死因、特に cardiovascular disease (CVD) の成因に糖尿病や metabolic syndrome が関与している可能性は十分に考えられる。

3. PTDM における患者生存率

PTDM による患者生存率は悪いとの報告 (図 2)⁵⁾ がある。長期生着に伴う CVD 発症や感染症 (特に sepsis) 発症がその要因と考えられる⁶⁾。

表 1 腎移植後 1 年以上経過した患者の IHD 発症の相対危険度

Risk factor	Relative risk			
	Men		Women	
	Control	Transplant recipient	Control	Transplant recipient
Age	1.05	1.05 ^a	1.40	1.10
Cholesterol(mg/dl)				
< 160	0.52	0.00	0.77	0.00
160~199	1.00	1.00	1.00	1.00
200~239	1.19	2.39	1.23	2.07
240~279	1.66	2.02	1.28	2.44
> 280	1.93	2.25	1.71	1.84
Blood pressure(mmHg)				
< 120 and < 80	1.00	0.25	0.59	0.56
120~129 or 80~84	1.00	1.00	1.00	1.00
130~139 or 85~89	1.33	1.05	0.93	1.26
140~159 or 90~99	1.68	1.19	1.30	1.63
≥ 160 or ≥ 100	1.86	1.47	1.59	0.31
Diabetes mellitus	1.53	2.78 ^a	1.82	5.40 ^a
Smoking	1.69	1.95 ^a	1.34	1.82

a : p < 0.05

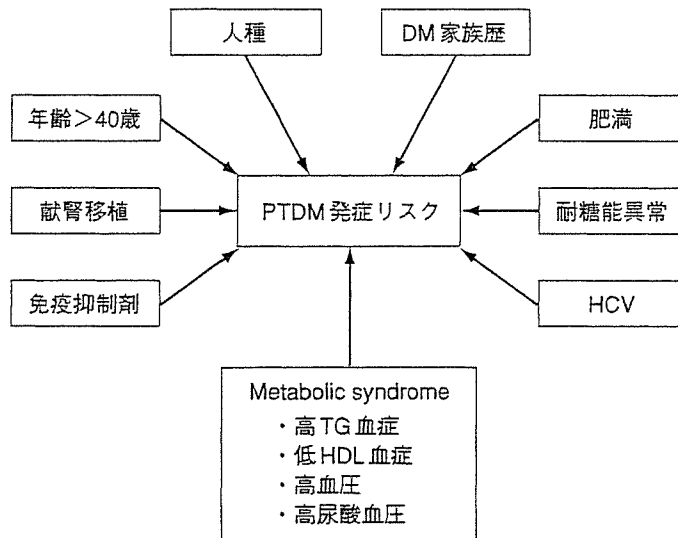


図 3 PTDM 発症の危険因子

4. PTDM における CVD 発症とそのリスク

近年、動脈硬化の病態とその成因に関して、インスリン抵抗性、糖代謝異常、高血圧、高脂血症、肥満などの病態を認める metabolic syndrome の面からその病態を捉える考え方がある。移植後の病態には同様の病態を備えることが多く、PTDM も metabolic syndrome の面から考えることができ、CVD 発症の強いリスク因子になる可能性がある。事実、表 1 に示すように、腎移植後 1 年以上の患者では糖尿病は高いリスク因子である⁷⁾。

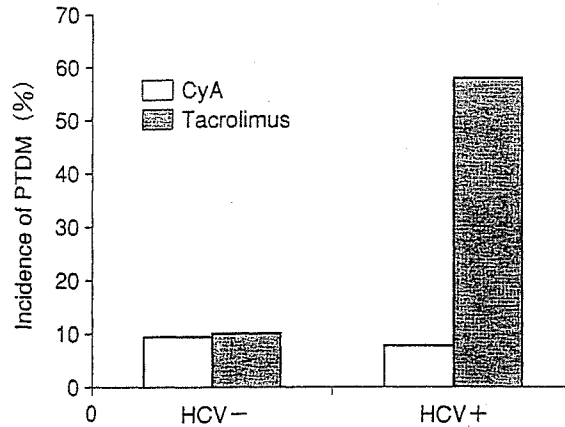


図4 HCV存在の有無と免疫抑制剤(シクロスポリンとタクロリムス)の違いによるPTDM発症率の違い

PTDM発症のリスク因子

PTDM発症のリスク因子についての報告は、本邦でも小規模解析による報告はあるが、米国の報告が最も参考になる(図3)⁸⁾。移植患者の年齢、糖尿病に関する家族歴(特に一等親での有無)や肥満がリスク因子としてあげられているが、これらは2型糖尿病に共通の問題であり、移植患者特有の問題ではない。

最近、C型肝炎ウイルス(HCV)とPTDMの関連について興味ある成績が報告された。まず肝移植後のPTDM発症は、移植前C型肝炎の存在と強く相関すること⁹⁾。同様のことが腎移植でも報告された。長期follow-up腎移植成績でも、HCV陽性患者はHCV陰性患者に比較し、PTDM発症は移植後3カ月、1年、3年目でも高かった²⁾。次にHCVが存在した場合、タクロリムスを基調とした免疫抑制療法を受けている腎移植患者のPTDM発症は、シクロスポリンによるそれと比べ、有意に多かったとの報告がなされた(図4)¹⁰⁾。これらは、抗HCV治療も考慮に入れたPTDM治療の重要性とともに、免疫抑制剤の選択も、PTDM発症リスクを考慮に入れて行うべきものと考えられる。最近、シクロスポリンのHCV増殖抑制作用も*in vitro*で報告されている¹¹⁾。これらのことが、PTDM発症とどのように関連するのか今後の研究が期待される。

免疫抑制剤とPTDM

グルココルチコイドが耐糖能異常を呈することはよく知られていることである^{12,13)}。このグルココルチコイド効果は用量依存性とされている¹⁴⁾(プレドニゾン0.01 mg/kg/dayの増加はPTDM 5%リスク増、IGT 4%リスク増との報告¹⁵⁾が、また約46%前後にPTDMを発症するとの報告もある¹⁶⁾。メチルプレドニゾン投与後2週間で75%の腎移植患者がPTDMを発症している。一方、カルシニューリンインヒビターは膵β細胞に対しての直接的なdiabetogenic factorとの報告がある¹⁷⁾。シクロスポリンとタクロリムスはともに、それぞれサイクロフィリン・FKBP12との複合体を成し、Ca²⁺-カルモジュリン(CalM)依存的に活性化されたカルシニューリン(CN)に結合し、転写因子NF-ATc(nuclear factor of activated T cell cytoplasmic component)の脱リン酸化を阻害し、インスリン遺伝子プロモーター領域刺激による遺伝子翻訳を抑制する¹⁸⁾。また、β細胞からのインスリン分泌に対する効果も、タクロリムスは臨床的有効濃度レベルで分泌抑制の報告¹⁹⁾があり、今後の検討が必要である。臨床データとして、移植症例にタクロリムス投与例と非投与例でPTDM発症を比較検討した報告では、移植後3カ月、1年、3年でタクロリムス投与例でPTDM発症が多かった²⁾。腎、肝、膵、肺、幹細胞移植

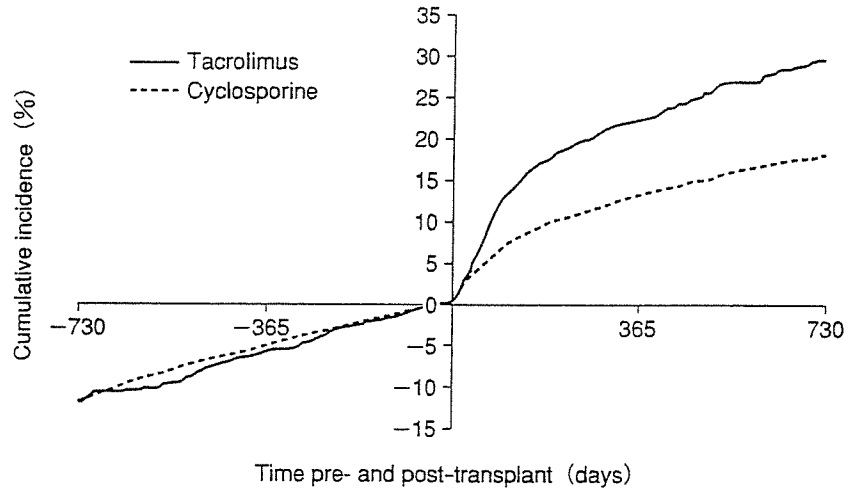


図 5 移植後の PTDM 発症に対するタクロリムスとシクロスポリンの影響

表 2 推奨される PTDM の定義と診断

1. DM(PTDM)とは：
(i) 糖尿病の症状(多飲・多尿・体重減少など)に随時血糖(静脈血) ≥ 200 mg/dl
(ii) 空腹時血糖(少なくとも8時間以上の絶食後) ≥ 126 mg/dl
(iii) 75 gOGTT で2時間血糖値 ≥ 200 mg/dl
以上のどれか一つを認めた場合、別の日に再確認を認めた場合、糖尿病と診断
2. 空腹時正常血糖(FPG), IFG(impaired fasting glucose), IGT(impaired glucose tolerance)とは：
(i) FPG : < 110 mg/dl = 空腹時正常血糖
(ii) IFG : 110 mg/dl \leq FPG < 126 mg/dl
(iii) IGT : 140 mg/dl \leq 2時間値 PG < 200 mg/dl (OGTT)

でもタクロリムス投与が PTDM や IGT 発症の高いリスク因子であるとの報告²⁰⁻²³⁾があり、1年の腎移植症例ではシクロスポリンに比べて約5倍高リスクであったとされている²⁴⁾。2年間の follow-up でも、シクロスポリンに比べ70%高頻度発症であった(図5)²⁵⁾。このように、タクロリムスは diabetogenic factor であるとの報告があるが、インスリン使用が必要となくなるような PTDM もあり、また可逆的であるとの報告もあり、今後の検討が必要である。

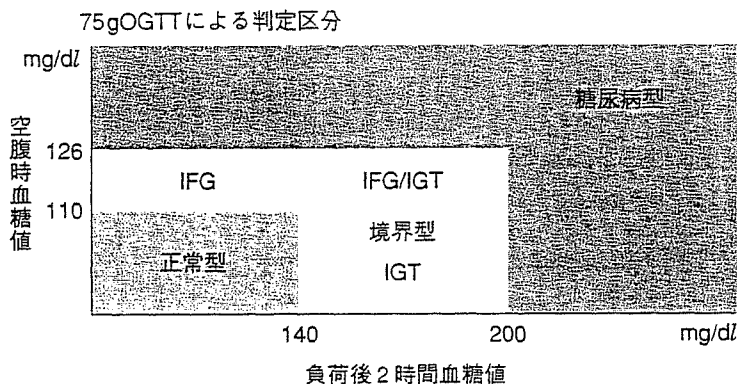
PTDM の定義

近年、「metabolic syndrome」に表現されるように、動脈硬化の病態の根幹に、インスリン抵抗性の存在があるとされている。したがって、顕性の糖尿病のみならず耐糖能異常としての IGT も視野に入れた診断と治療が必要とされる。移植医療においても、PTDM が可逆性とはいえ、IGT をも考慮に入れた対策が必要である。

過去に報告された PTDM の定義「インスリン治療1カ月間以上」などは、上記合併症を考慮に入れた病態の定義としては問題がある。ADA, WHO, IDF などの定義を考慮に入れた PTDM の定義が推奨されている(表2)。日本糖尿病学会よりの治療ガイドライン(2004~2005)も示した(表3)。

表 3 境界型の定義

境界型は75gOGTTで、糖尿病型にも正常型にも属さない血糖値を示す群である。WHO分類でのIGT^{注1)}(耐糖能異常)とIFG^{注2)}(空腹時血糖異常)がこの群に属する。



注1) IGT (impaired glucose tolerance) はWHOの糖尿病診断基準に取り入れられた分類で、空腹時126 mg/dl未満、75gOGTT 2時間値140~199 mg/dlの群を示す。

注2) IFG (impaired fasting glycemia: glucose) は空腹時110~125 mg/dl (WHO, ADA) で、2時間値を測定した場合には140 mg/dl未満 (WHO) の群を示す。

(日本糖尿病学会の治療ガイドライン(2004~2005)より引用)

移植患者の糖代謝の管理と糖尿病治療・管理

1. 移植前管理

移植前管理については、リスク因子を考慮し、一般的病歴のチェックとともに FPG < 110 mg/dl の場合は2~3年に一度、IFG (FBG: 110~126 mg/dl) または IGT (食後 2 hr \geq 140, < 200 mg/dl) の場合、毎年チェックをする。家族歴、HCV感染の有無、妊娠糖尿病、CVDのリスク、年齢(>40 years)、肥満などのチェックとその指導も重要である。

2. 移植患者のモニタリング

すべての移植患者はFPGのチェックをする。特に、移植後4週間は注意深い観察が必要である。

- 1) 移植後4週間は毎週1回FPGの測定
- 2) 移植後3, 6および12カ月目にFPGとHbA_{1c}の測定
- 3) 移植1年後は1年に1回、FPGとHbA_{1c}の測定
- 4) 異常があればOGTTの施行

異常があれば、ステロイド量の減量やタクロリムスからシクロスポリンへの変更も考慮すべきと考える。

3. PTDM患者の管理

1) SMBG(自己血糖値測定)は、インスリン治療患者は保険上認められている。しかし、経口剤や食事療法のみ患者もSMBGは可能なら行ったほうがよいと考える。HbA_{1c}は最低3カ月に一度は測定すべきと考える。目標値はHbA_{1c} \leq 6.5%とされているが(日本糖尿病学会も同様の目標)、少なくとも最低レベル(<7.0%)は達成すべきである。

- 2) PTDM治療について

基本的には、PTDMの管理と治療は内分泌・糖尿病代謝の専門医の follow-up が必要と考える。移植患者は程度の差こそあれ、移植臓器障害の状態である。運動療法を含めた生活指導や薬物療法もそれを十分考慮に入れて患者指導・教育を行うべきと考える。

治療手段としては step-wise 療法を考慮すべきである。また、特に経口剤治療で注意すべき点は、腎機能障害を伴っている移植患者は、スルホニル尿素(SU)剤系による遷延性の低血糖発作やビグアナイド系(メトホルミン)などによる lactic acidosis に注意すべきと考える。高齢者、肝障害や腎障害を伴う移植患者はグリニド系製剤の投与を考慮すべきと考える。

3) その他のPTDMに伴う高血圧、高脂血症などの治療は大変重要であり、各々のガイドラインに従って治療すべきと考える。

文 献

- Ojo AO, Hanson JA, Wolfe RA, et al. Long-term survival in renal transplant recipients with graft function. *Kidney Int* 2000 ; 57 : 307.
- Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, et al. Diabetes mellitus after transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2003 ; 3 : 178.
- Cosio FG, Pesavento TE, Osei K, et al. Post-transplant diabetes mellitus : Increasing incidence in renal allograft recipients transplanted in recent years. *Kidney Int* 2001 ; 59 : 732.
- Roth D, Milgrom M, Esquenazi V, et al. Posttransplant hyperglycemia. *Transplantation* 1989 ; 47 : 278.
- Jindal RM, Hjelmsaeth J. Impact and management of posttransplant diabetes mellitus. *Transplantation* 2000 ; 70 : S58.
- Miles AMV, Sumrani N, Horowitz R, et al. Diabetes mellitus after renal transplantation. *Transplantation* 1998 ; 65 : 380.
- Kasiske BL, Chakkeria HA, Roel J. Explained and unexplained ischemic heart disease risk after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2000 ; 11 : 1735.
- Reisaeter AV, Hartmann A. Risk factors and incidence of posttransplant diabetes mellitus. *Trans Proc* 2001 ; 33(Suppl 5A) : 8S.
- Baid S, Cosimi AB, Farrell ML, et al. Posttransplant diabetes mellitus in liver transplant recipients : Risk factors, temporal relationship with hepatitis C virus allograft hepatitis, and impact on mortality. *Transplantation* 2001 ; 72 : 1066.
- Bloom RD, Rao V, Weng F, et al. Association of hepatitis C with posttransplant diabetes in renal transplant patients on tacrolimus. *J Am Soc Nephrol* 2002 ; 13 : 1374.
- Watahi K, et al. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 2003 ; 38(5) : 1282-1288.
- Arner P, Gunnarsson R, Blomdahl, et al. Some characteristics of steroid diabetes : A study in renal transplant recipients receiving high dose corticosteroids therapy. *Diabetes Care* 1983 ; 6 : 23.
- Friedman EA, Shyh TP, Beyer MM, et al. Posttransplant diabetes in kidney transplant recipients. *Am J Nephrol* 1985 ; 5 : 196.
- Hjelmsaeth J, Hartmann A, Kofstad J, et al. Tapering off prednisolone and cyclosporine the first year after renal transplantation : The effect on glucose tolerance. *Nephrol Dial Transplant* 2001 ; 16 : 829.
- Hjelmsaeth J, Hartmann A, Kofstad J, et al. Glucose intolerance after renal transplantation depends upon prednisolone dose and recipient age. *Transplantation* 1997 ; 64 : 979.
- Gunnarsson R, Lundgren G, Magnusson G, et al. Steroid diabetes : A sign of overtreatment with steroids in the renal graft recipient? *Scand J Urol Nephrol (Suppl)* 1980 ; 54 : 135.
- Sumrani NB, et al. Diabetes mellitus after renal transplantation in the cyclosporine era : an analysis for risk factors. *Transplantation* 1991 ; 51 : 343-347.
- Lawrence MC, et al. Regulation of insulin gene transcription by a Ca^{2+} -responsive pathway involving calcineurin and NFAT. *Mol Endocrinol* 2001 ; 15 : 1758-1767.
- Paty BW, et al. Inhibitory effects of immunosuppressive drugs on insulin secretion from HIT15 cells and Wistar rat islets. *Transplantation* 2002 ; 73 : 353-357.

20. The U. S. Multicenter FK506 Liver Study Group. A comparison of tacrolimus(FK 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. *N Engl J Med* 1994 ; 331 : 1110.
21. Drachenberg CB, Klassen DK, Weir MR, et al. Islet cell damage associated with tacrolimus and cyclosporine : Morphological features in pancreas allograft biopsies and clinical correlation. *Transplantation* 1999 ; 68 : 396.
22. Kur F, Reichenspurner H, Meiser BM, et al. Tacrolimus(FK 506) as primary immunosuppressant after lung transplantation. *Thorac Cardiovasc Surg* 1999 ; 47 : 174.
23. Woo M, Przepiorka D, Ippoliti C, et al. Toxicities of tacrolimus and cyclosporin A after allogeneic blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997 ; 20 : 1095.
24. Pirsch J, Miller J, Deierhoi M, et al. A comparison of tacrolimus(FK 506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation : FK 506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 1997 ; 63 : 977.
25. Woodward RS, Schnitzler MA, Baty J, et al. Incidence and cost of new onset diabetes mellitus among U. S. wait-listed and transplanted renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2003 ; 3 : 590.

Induction of uPA release in human peripheral blood lymphocytes by [deamino-Cys¹,D-Arg⁸]-vasopressin (dDAVP)

Yoshitaka Yamaguchi,^{1*} Kenichi Yamada,^{1*} Toshikazu Suzuki,³ Yu-Ping Wu,^{2,3}
Kazuko Kita,³ Shunji Takahashi,³ Masaharu Ichinose,¹ and Nobuo Suzuki³

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery and ³Environmental Biochemistry, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670; and ²Division of Clinical Research, Sakura National Hospital, Sakura 285-8765, Japan

Submitted 24 March 2003; accepted in final form 4 June 2004

Yamaguchi, Yoshitaka, Kenichi Yamada, Toshikazu Suzuki, Yu-Ping Wu, Kazuko Kita, Shunji Takahashi, Masaharu Ichinose, and Nobuo Suzuki. Induction of uPA release in human peripheral blood lymphocytes by [deamino-Cys¹,D-Arg⁸]-vasopressin (dDAVP). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E970–E976, 2004. First published June 15, 2004; doi:10.1152/ajpendo.00027.2003. — [deamino-Cys¹,D-Arg⁸]-vasopressin (dDAVP), known to be an arginine vasopressin (AVP) V₂ receptor agonist, is an agent that increases fibrinolytic activity levels in plasma after its infusion into the human body. However, mechanisms underlying an increase and exact localization of the extrarenal dDAVP-responsive V₂ receptor remain unclarified. Two AVP receptors, V_{1a} and V₂, and a related oxytocin (OT) receptor were found to be expressed in human lymphocytes. Furthermore, we found an increase of fibrinolytic activity in the medium of peripheral lymphocytes obtained from human volunteers less than 20 min after dDAVP infusion. The increased activity was also detected in the medium after incubating the lymphocytes in the presence of dDAVP *in vitro*, being highest at 20 min after the incubation. In accord with the increased fibrinolytic activity, the levels of urokinase-type plasminogen activator (uPA) in the medium were also increased. However, there was no significant difference of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), pro-uPA, and tissue-type plasminogen activator (tPA) concentrations in the medium between dDAVP treatment and control. When lymphocytes were preincubated with a V₂ receptor antagonist [Adamantaneacetyl¹,O-Et-D-Tyr²,Val⁴,Aminobutyryl⁶,Arg^{8,9}]-vasopressin, the dDAVP-induced uPA increase was diminished. In contrast, preincubation with a V₁ receptor antagonist, [β-Mercapto-β,β-cyclopentamethylenepropionyl¹,O-Me-Tyr²,Arg⁸]-vasopressin, prior to dDAVP treatment resulted in a greater increase of the uPA concentration in the medium than with the dDAVP treatment alone. Thus it was suggested that dDAVP may induce uPA release from human lymphocytes via V₂ receptor-mediated reaction, and also via cross-talk between V₁ and V₂ receptors.

arginine vasopressin; plasminogen activator; urokinase-type plasminogen activator; protease release

PROTEASE ACTIVITY IN HUMAN LYMPHOCYTES is an intriguing topic because of its involvement in various senescence-associated diseases, neural migration, or demyelination disorders (31–33), although all of the proteases involved in these disorders have not been well characterized. To elucidate the role of protease activity, we recently established a method to search for agents that increase the protease activity levels in lymphocytes freshly prepared from human peripheral blood (34). In this new method, fibrinolytic activity is estimated by incubating lymphocytes with ¹²⁵I-labeled fibrin as a substrate in the presence of plasminogen. This cascade reaction amplifies the activity levels and therefore is useful for detecting protease activation

events of stress response in the human body (34). In particular, this reaction assay *in vitro* will reflect the protease activation induced by drugs *in vivo*.

Arginine vasopressin (AVP) and oxytocin (OT) are cyclic nonapeptides whose actions are mediated by stimulation of specific G protein-coupled receptors classified into V_{1a} (vascular), V_{1b} (pituitary), and V₂ (renal) receptors and OT receptors (16, 18). All members of the family have been cloned, and the affinity of cloned AVP and/or OT receptors for [deamino-Cys¹,D-Arg⁸]-vasopressin (dDAVP) and other ligands is well described (19, 36). AVP directly elicits the contraction of smooth muscle preparation via V₁ receptor activation. On the other hand, V₂ receptors in renal tubular cells promote the reabsorption of water (4). It has also been reported that, in canine basilar artery, AVP causes an endothelium-dependent relaxation via the V_{1a} receptor (9) and that, in experimental animals (28) or humans (6), 4-valine-8-D-arginine vasopressin or dDAVP causes a decrease in blood pressure that is not mediated by prostaglandins (13, 16). In rat aortic strips, dDAVP evokes endothelium-dependent vasorelaxation (40), not via the authentic V₂ receptor but rather via the endothelial V₁-like receptors, which may be functionally different from the V₁ receptor in smooth muscle cells. OT is another posterior pituitary hormone whose primary action is to stimulate uterus contraction or milk ejection function via OT receptors (35). In myometrium, binding of OT to high-affinity receptors stimulates various biological responses, including inositol-triphosphate turnover and Ca²⁺ influx, similar to those induced by the binding of AVP to the V_{1a} receptors. Interestingly, the uterus contains not only OT receptors but also V_{1a} receptors of approximately fivefold higher density in nonpregnant conditions (2). OT has also been reported to enhance glomerular filtration rate and to have a natriuretic effect (3). In addition, OT has either diuretic or antidiuretic osmoregulatory effects depending on the presence or absence of vasopressin, which may be explained by the ability of OT to bind to the adenylate cyclase-stimulating V₂ receptor in distal tubules and collecting ducts (5, 15). Because some of the organs or cells express different subtypes of AVP/OT receptors, the cross-talk between them may be involved in various unknown physiological events.

dDAVP is known to be an agonist for one of the three types of AVP receptors, namely V₂ (16, 18). It was reported that a marked increase of fibrinolytic activity in plasma is observed when dDAVP is infused in humans (17). This increase paral-

* Y. Yamaguchi and K. Yamada contributed equally to this study.

Address for reprint requests and other correspondence: N. Suzuki, Dept. of Environmental Biochemistry, Graduate School of Medicine, Chiba Univ., Chiba 260-8670, Japan (E-mail: nobuo@faculty.chiba-u.jp).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

leled that of immunoreactive tissue-type plasminogen activator (tPA), which is partly derived from vascular endothelial cells (12). It was also demonstrated that dDAVP induces the release of two coagulation factors, factor VIII and von Willebrand factor, from the vascular endothelium through the activation of a vasculoendothelial V_2 -like receptor (11, 16, 26). However, the mechanism by which dDAVP causes the increase of fibrinolytic activity in plasma remains unclarified.

Human peripheral lymphocytes possess binding sites for dDAVP (38), although the expression of the receptor for binding dDAVP has not been determined. In addition, neither the role of V_2 receptor in lymphocytes nor the action of V_2 receptor agonist in peripheral blood lymphocytes has been documented until now.

In the present study, we determined the expression of mRNA species of AVP/OT receptors that can bind to dDAVP in human peripheral lymphocytes. Then, we examined whether peripheral lymphocytes obtained from human subjects with dDAVP infusion have the ability to increase plasminogen-dependent fibrinolytic protease activity and whether lymphocytes release the proteases when incubated with dDAVP *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Agents. dDAVP and AVP were purchased from Ferring Pharmaceuticals (Copenhagen, Denmark). [β -Mercapto- β , β -cyclopentamethylenepropionyl¹,O-Me-Tyr²,Arg⁸]-vasopressin, [Adamantaneacetyl¹,O-Et-D-Tyr²,Val⁴,Aminobutyryl⁶,Arg^{8,9}]-vasopressin, and fibrinogen were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO). [¹²⁵I]Na (100 mCi/ml, 17 mCi/mg) was purchased from New England Nuclear (Boston, MA).

Infusion study. dDAVP was diluted with saline to allow for the intravenous delivery of 0.4 μ g/kg in 100 ml over 10 min (6). Two milliliters of whole blood samples were withdrawn from cubital veins of 12 volunteers (6 males and 6 females from 40 to 60 yr old, mean age 47.3), with EDTA as an anticoagulant, every 10 min after dDAVP infusion. As a control, samples were taken from 12 age-matched volunteers (6 males and 6 females) without dDAVP infusion. Informed consent was obtained from all of the volunteers, and this study was approved by the Human Research Committee of Sakura National Hospital.

Preparation of lymphocyte samples. Lymphocytes were prepared from peripheral blood of volunteers principally according to the method described previously (32). Briefly, each (2-ml) blood sample was diluted with the same volume of phosphate-buffered saline [PBS; 10 mM sodium phosphate (pH 7.4) containing 135 mM NaCl] and put on 7 ml of Ficoll. The samples were centrifuged at 240 *g* for 20 min at room temperature. After centrifugation, the thin white layer of the lymphocyte fraction, termed "buffy coat," was collected and mixed with a fivefold volume of PBS. Then, it was centrifuged at 240 *g* for 10 min. The pellet was suspended in RPMI 1640 medium and incubated in a 60-mm dish for 20 min at 37°C for platelet attachment. Flow cytometric analysis (FACS) with anti-CD2 antibodies proved that the lymphocyte samples we used in this study contained ~95% T cells (39). Contaminations by B cells and monocytes were negligible in this separation procedure by FACS that used anti-CD13, -CD14, -CD16, and -CD17 antibodies. The lymphocyte samples were diluted with RPMI 1640 medium to make solutions containing appropriate numbers of cells (10^4 to 10^6 cells/ml).

RNA isolation and RT-PCR. Total RNA was isolated from lymphocyte samples, MCF-7 human breast cancer cells, and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) by use of TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. MCF-7 cells and HUVEC were used as positive controls for expres-

sion of the three AVP receptors (V_{1a} , V_{1b} , and V_2) and the OT receptor, respectively (23, 37). After treatment with deoxyribonuclease I (Invitrogen) to eliminate possible DNA contamination, the first-strand cDNA synthesis was carried out by use of SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) with 2 μ g of total RNA and 0.5 μ g of oligo(dT). Thereafter, a 1- μ l aliquot of the first-strand cDNA was used together with 200 nM of each specific primer, PCR buffer (in mM: 10 Tris·HCl, pH 8.3, 50 KCl, and 1.5 MgCl₂), and 1 unit of recombinant *Taq* DNA polymerase (TaKaRa, Kyoto, Japan) to a total volume of 25 μ l. The PCR primer sequences for AVP/OT receptors used in this study were exercised according to a previous report by Thibonnier et al. (37), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase was used as a positive control for each RNA preparation. The amplification was performed in a TaKaRa thermal cycler (model TP-400) with the following steps: initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles: 95°C for 30 s, 56°C for 1 min, 72°C for 1 min, and an additional extension at 72°C for 5 min. The PCR products were visualized after electrophoresis in a 2.0% agarose gel with ethidium bromide staining.

***In vitro* incubation of lymphocytes with or without drugs.** Lymphocyte samples were incubated in RPMI 1640 medium with various concentrations of dDAVP or AVP for 20 min at 37°C *in vitro*. After the incubation, supernatants were obtained by centrifugation of samples for 5 min at 300 *g* and used for further analysis.

Preincubation of lymphocyte samples (10^6 cells/ml) with receptor antagonists was performed for 20 min at 37°C. After the preincubation, samples were further incubated with or without dDAVP (10^{-8} M) for another 20 min at 37°C and then centrifuged at 300 *g* for 5 min. The supernatant was used for the protease assay.

Assay of fibrinolytic activity. Fibrinogen was labeled with [¹²⁵I]Na by the chloramine-T method (7) and then used for preparing polystyrene tubes coated with [¹²⁵I]-labeled fibrin (29). [¹²⁵I]-labeled fibrinogen had a specific radioactivity of 1.0 mCi/mg protein.

The lymphocyte samples and RPMI 1640 medium without lymphocytes (as a control) were incubated in [¹²⁵I]-fibrin-coated tubes at 37°C for 20 min in the presence of plasminogen. The released radioactivity (counts/min or cpm) of [¹²⁵I] was counted as described previously (29). The radioactivity increased linearly during the incubation for 1 h.

Measurement of tPA, urokinase-type plasminogen activator, and plasminogen activator inhibitor-1 concentrations. The concentrations of tPA, pro-urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA), and plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in the supernatant of the samples after *in vitro* incubation of lymphocytes were measured using the corresponding assay kits, Chromolize tPA Assay Kit, Chromolize uPA Assay Kit, and Imulyse PAI-1, respectively (all from Biopool International, Ventura, CA). The uPA assay was performed using AngioMax Human Urokinase (uPA) ELISA Kit (Angiopharm, O'Fallon, MO). The reaction was carried out at room temperature throughout the assay.

Statistical analysis. Values are presented as means \pm SD. Statistical analysis was performed by Student's *t*-test with StatView software (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTS

Expression of AVP/OT receptors in human lymphocytes. In the beginning of the study, the mRNA expression of specific AVP/OT receptors in human lymphocytes from peripheral blood was determined by RT-PCR analysis (Fig. 1). Expression of V_{1a} , V_2 , and OT receptors was observed in all lymphocytes of four independent donors. On the other hand, we could not detect the expression of the V_{1b} receptor either in human lymphocytes or in MCF-7 cells (data not shown). Two amplified DNA bands were detected from lymphocytes as well as from MCF-7 cells when we analyzed the expression of V_2