

拒絶反応の組織学的マーカー

Immunohistochemical markers in human renal allograft rejection

神崎 剛 清水 章

Go KANZAKI and Akira SHIMIZU

はじめに

臨床腎移植の機能低下の原因は多岐にわたり、その確定には移植腎生検による病理診断が欠かせない。その病理診断は、国際的に標準化が進められている移植腎病理診断国際基準(Banff 分類)が用いられている。Banff 分類は、1991年にカナダの Banff で行われた Banff 会議を基に、Solez らにより 1993 年に発表された。その後も Banff 会議は隔年で開催され、そのつど分類の改訂が進められている。現在の Banff 分類は 1997 年の改訂分類を基に、2009 年の改訂が加わったものが基本になっている¹⁾。この分類の優れた点は、移植腎障害を免疫学的機序と非免疫学的機序に区別したことと、拒絶反応をその機序を考慮して、抗体関連型拒絶反応(antibody-mediated rejection)と T 細胞関連型拒絶反応(T cell-mediated rejection)とに大別し、それぞれを病理所見により急性と慢性に分類したことにある。移植腎の障害機序を明確にしたことで、治療に直結する病理分類になっている。

Banff 分類に使用されている組織学的マーカーは C4d のみである。特殊染色や免疫染色を行い、組織学的マーカーを同定することで診断の精度を向上させる研究は数多く行われているが、診断のために実用化されているものは限られている。十分な組織学的マーカーが揃っていないとは言えないが、本稿では Banff 分類に使用されている組織学的マーカーである C4d を中心に、移植腎の拒絶反応の病理診断のために用いられている組織学的マーカーについて概説する。さまざまな組織学的マーカーが存在するが、それらを、拒絶反応の免疫機序を評価するためのマーカー、拒絶反応により生じた細胞障害の程度や誘導されている炎症の

程度を評価するためのマーカー、腎臓の構成細胞や器官を同定することで組織学的評価の質を向上させるためのマーカー、の 3 つに分けて整理すると理解しやすい。それぞれについて解説を行う。

拒絶反応の免疫機序を評価するための組織学的マーカー

拒絶反応はその免疫学的機序により、T 細胞関連型拒絶反応と抗体関連型拒絶反応の 2 つに大別されている。細胞表面に存在する major histocompatibility complex (MHC) 抗原を標的とした抗ドナー抗体(donor specific antibody)が主因の抗体関連型拒絶反応と、抗原提示細胞によって活性化された T 細胞が主因の T 細胞関連型拒絶反応である。拒絶反応の存在を認めた場合には、その機序を病理像から評価することが重要である。典型例では、炎症細胞の種類や浸潤部位、組織障害の様式により光顕のみによる診断も可能であるが、実際には、両者が類似した病理像を示したり、両者が混在することもしばしばあり、抗体関連型拒絶反応と T 細胞関連型拒絶反応を明確に鑑別することは難しい。そこで拒絶反応の免疫機序を評価するための組織学的マーカーが必要となる。

1. 抗体関連型拒絶反応

抗体関連型拒絶反応は、主に抗ドナー抗体の存在から抗原抗体複合体を介した補体の活性化とそれに伴った炎症細胞浸潤に特徴づけられる。補体の活性化には、古典的経路(classical pathway)、レクチン経路(lectin pathway)、第二経路(alternative pathway)の 3 つの経路がある。古典的経路は、補体成分 C1q が抗原抗体複合体、病原体表面物質や C 反応性蛋白に結合することで始まる。レクチン経路は、病原体表面上の糖鎖に血清中の糖鎖結合性蛋白(マンノース結合

レクチンやフィコリン)が結合することで、第二経路は自然に活性化されている血漿中の補体系因子 C3 が病原体表面へ結合することで開始される。活性化された補体は、病原体のオプソニン化、炎症細胞動員、病原体への直接傷害を誘導する。移植腎にみられる抗体関連型拒絶反応は、血管内皮細胞に抗ドナー抗体が結合することで、古典的経路を介して補体が活性化され進展する。そのため、IgM や IgG の抗体や C1q, C3 や C4 の補体の沈着を蛍光抗体法により確認する。しかし、超急性拒絶反応や強烈な抗体関連型拒絶反応の場合を除いて、血管内皮にこれらの免疫グロブリンや補体の沈着を確認できることは少ない。これは、有核細胞では免疫グロブリンが容易に shedding により除去されることと、活性化補体成分は補体制御因子によって迅速に処理されることによるものと考えられている²⁾。ただし、非活性化型補体成分である C4d は長期にわたり局所に残存するため、抗体関連型拒絶反応の有用な組織学的診断マーカーとなっている。

1) 傍尿細管毛細血管(PTC)への C4d の沈着

抗体関連型拒絶反応の診断は、血清の抗ドナー抗体の検出の精度が向上したこと、補体の活性化の証拠を組織学的に C4d の沈着により同定することが可能になったこと、病理学的に抗体関連型拒絶反応の特徴が明らかになったことにより確立された。Banff 分類では、C4d の沈着を傍尿細管毛細血管(peritubular capillary : PTC)に認めることが抗体関連型拒絶反応の診断に必須となっている。抗体に結合して活性化された C1q は C1 複合体の構成成分である C1s を活性化し、活性化型セリンプロテアーゼが生成され、C4 から不安定なエステル基を持った C4b が分解される。C4b はさらに C4c と C4d に分解され、C4d はそのエステル基により内皮細胞に共有結合するが、その結合は補体の活性化により強く保持される。そのため、C4d は補体活性化の存在を示す“foot print”として用いられている³⁾。

C4d は正常腎でも糸球体メサンギウムへの沈着を認める。糸球体腎炎では免疫複合体に一致して沈着をみるが、いずれも PTC への沈着は認めない⁴⁾。唯一の例外はループス腎炎で、疾患活動性や血栓性微小血管障害症(thrombotic microangiopathy)と相関して PTC に沈着することがある^{5,6)}。移植腎の C4d の沈着は Feucht らにより最初に報告され、Collins や Colvin らにより抗体関連型拒絶反応の診断に必要不可欠な組織学的マーカーとして確立された^{7,8)}。2003 年には Banff 分類に PTC への C4d 沈着が抗体関連型拒絶反応の診断基準として追加され、実際の急性ならびに慢性の抗体関連型拒絶反応の診断に C4d の染色が用いら

れるようになった。症例を重ねるうちにいくつかの注意点も知られるようになった。

2) C4d の評価のための注意点

PTC への C4d 沈着は主観的な評価にならざるをえない。C4d の沈着の程度は、移植後 1 年間は血中の抗ドナー抗体のレベルと相関し PTC にびまん性の陽性像を呈する。慢性の症例では巣状に沈着する症例も出現するため、沈着の程度を“absent, minimal(1~10%), focal(10~50%), diffuse(50%~)”に区分し、focal 以上の症例を陽性として扱っている⁹⁾。また C4d の染色はパラフィン切片を用いた酵素抗体法でも行うことができるが、凍結切片を用いた蛍光抗体法よりも感度が低く¹⁰⁾、パラフィン切片による C4d 陽性度の評価には注意が必要である。パラフィン切片による C4d 染色のための工夫も施されている¹¹⁾。

3) 慢性抗体関連型拒絶反応にみられる C4d の沈着

慢性拒絶反応には transplant glomerulopathy を主とする慢性抗体関連型拒絶反応(chronic active antibody-mediated rejection)と慢性移植血管症を呈する慢性 T 細胞関連型拒絶反応(chronic active T cell-mediated rejection)がある。transplant glomerulopathy は糸球体係蹄壁のびまん性の二重化を、慢性移植血管症は単核球系炎症細胞浸潤を伴う動脈内膜の線維性肥厚を特徴とする。本来、C4d は超急性期や急性期の拒絶反応で陽性になるが、transplant glomerulopathy を呈する慢性抗体関連型拒絶反応でも糸球体や PTC に陽性になる¹²⁾。また、移植後の protocol 生検で C4d 所見が変動する subclinical antibody-mediated rejection の存在も知られている¹³⁾。そのため、2007 年の Banff 会議で、慢性抗体関連型拒絶反応の診断基準が明確にされ、①慢性障害を示す組織所見(transplant glomerulopathy, PTC 基底膜の多層化、間質線維化/尿細管萎縮、動脈内膜の線維性肥厚)、② C4d 陽性、③抗ドナー抗体の存在、の 3 つが揃った場合と規定された。

4) Accomodation にみられる C4d の沈着

ABO 血液型不適合腎移植後の移植腎生検では、約 30~90%に抗体関連型拒絶反応と関連のない C4d の沈着を認めている¹⁴⁾。組織障害を伴わない C4d の沈着は、慢性拒絶反応への移行や移植腎予後とも相関していない¹⁵⁾。ただし、糸球体毛細血管に diffuse global pattern に強く沈着するものは急性抗体関連型拒絶反応を呈することも示され¹⁶⁾、ABO 血液型不適合腎移植後の C4d 沈着の評価が難しいものとなっている。液性免疫に対する耐性獲得、いわゆる“accommodation”の状態を反映している病態とも考えられている¹⁷⁾。

5) C4d 陰性の抗体関連型拒絶反応

最近、典型的な transplant glomerulopathy を認め、オーミクス (OMICS) で内皮細胞の活性化が確認された慢性抗体関連型拒絶反応で、C4d の陰性例が報告された¹⁸⁾。non-HLA 抗体による抗体関連型拒絶反応でも C4d の陰性例が報告され¹⁹⁾、C4d 陰性の抗体関連型拒絶反応が想像以上に存在することが示された。この機序として補体非依存性抗体関連型拒絶反応の存在が想定されている。*in vitro* の研究からは、抗ドナー抗体が直接内皮細胞の形質を変化させ、炎症性サイトカイン、成長因子や接着分子の発現を増加させ抗体関連型拒絶反応を誘導することが示唆された²⁰⁾。C4d の診断価値に対する疑問も投げかけられ、C4d の沈着にかかわらず組織学的な microcirculation inflammation [glomerulitis (g) や peritubular capillaritis (ptc)] score に重きを置く診断も提唱されている²¹⁾。また、慢性抗体関連型拒絶反応では、移植腎の糸球体内や PTC 内に CD56 陽性 NK 細胞の浸潤を認め²²⁾、補体を介さず NK 細胞に依存して発症する実験報告もあり²³⁾、C4d 陰性の抗体関連型拒絶反応の主因の一つに NK 細胞の関与が浮上している。しかし、NK 細胞は活性化により CD56 が消失するため、CD16 と T-bet の両者を用いるなど組織内での活性化の同定は困難で、現在のところ NK 細胞に特異的マーカーも存在せず、新たな分子マーカーの開発が望まれている。

6) エクリズマブ (eculizumab) の治療と C4d

エクリズマブ (eculizumab, 商品名: ソリリス®) は、C5 を直接阻害する薬剤である。発作性夜間血色素尿症における安全性と効果が認められ、本邦でも 2010 年 6 月に承認を受けている。Stegall らは、腎移植にエクリズマブを使用し抗体関連型拒絶反応の発症を制御したことを報告した²⁴⁾。当然のことながら、エクリズマブ投与群では血中抗ドナー抗体が陽性で、組織で C4d が陽性であっても、移植腎機能障害と組織障害が阻止され、抗体関連型拒絶反応が抑制されている。今後、薬剤開発に応じた新しい診断基準も求められている。

2. T 細胞関連型拒絶反応

T 細胞関連型拒絶反応は、CD8 陽性 T 細胞が主体となった炎症細胞浸潤に特徴づけられる。これは、抗原提示細胞によって提示された抗原をナイーブ T 細胞が認識し、Th1 に分化した CD4 陽性 T 細胞が CD8 陽性 T 細胞をより活性化しながら進展する。T 細胞関連型拒絶反応では移植腎内に炎症細胞浸潤をみるものの、一般染色では、それらの種類、活性化の程度、組織障害の程度を評価することは困難なことが多い。そこで、組織学的マーカーを用いて、浸

潤細胞の種類、活性化、組織障害の程度についての検討が進められている^{25,26)}。拒絶反応にみられる浸潤細胞は T 細胞が主体であることから、CD3 陽性 T 細胞、CD4 陽性ヘルパー T 細胞、CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞の染色を行う。T 細胞の活性化は CD25 で確認するが、パラフィン標本での染色は難しい。移植腎局所の T 細胞の増生は MIB-1 や proliferating cell nuclear antigen (PCNA) を用いる。さらに、細胞傷害性 T 細胞の確認には perforin や granzyme B の染色も行うが、抗体の質が良いことから、TIA-1 の免疫染色で細胞質内の細胞傷害顆粒の確認を行う。細胞傷害性 T 細胞や補体による組織障害の程度は TUNEL 染色を用いて評価する²⁷⁾。また、好中球やマクロファージが主体の炎症細胞浸潤は抗体関連型拒絶反応も考慮するため、その鑑別のためにも MPO 陽性の好中球 (顆粒球) や CD68 陽性のマクロファージの同定を行う²⁸⁾。Plasmacytes-rich 細胞性拒絶反応の形質細胞の同定には CD38 や CD138 を用いる。移植腎に大型のリンパ球の浸潤を認める場合には、高度の拒絶反応による活性化 T 細胞の浸潤であるのか、移植後リンパ増殖性疾患による異型リンパ球の浸潤であるのかの鑑別が必要になる。組織での *in situ* hybridization を用いた EB virus-encoded RNA (EBER) による EB ウイルスの確認と、CD20 や CD79a による B 細胞リンパ腫の確認を含む異型リンパ球の確認を行う。ウイルス感染による間質性腎炎にも B 細胞が多く含まれることが知られている。

近年、CD4 陽性 T 細胞に制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) や Th17 細胞などの新しい T cell サブセットが同定された。Treg は CD4+CD25+FOXP3+T 細胞群であり、胸腺内で制御機能を持つように規定されている内在性制御性 T 細胞 (natural Treg) と、末梢組織でその組織特異的な環境でナイーブ T 細胞から分化する誘導性制御性 T 細胞 (induced Treg) に大別される。Treg は T 細胞の活性化をせず、免疫応答に制限をかけて自己免疫反応を防ぐ細胞群であり、IL-10 や TGF- β などの抑制性サイトカインを産生する。Th17 細胞は、適応免疫応答の初期に局所の上皮細胞や間質細胞に作用して好中球の動員を促すケモカインを産生する。また、炎症性サイトカイン IL-17 の産生細胞であり、自己免疫疾患の病態形成に密接に関与している。移植腎領域でもこれらの細胞に関する知見が集積されている。Treg は移植臓器に対する宿主免疫応答を抑制し²⁹⁾、移植腎病理においてもその浸潤程度は移植腎予後と相関している^{30,31)}。しかし T 細胞関連型拒絶反応では、逆に浸潤程度が移植腎予後と相関せず予後不良因子であることも示され³²⁾、エフェクター細胞の細胞傷害性に対する代償性の増

加とする考えもある。一方、Th17細胞に関しては、Loverreらは移植腎において抗体関連型拒絶反応時に尿細管上皮でのIL-17発現上昇を報告している³³⁾。Th17細胞はTregと共通の前駆細胞から誘導され、局所環境によってTregがIL-17産生細胞に変換されることから、IL-17とTregには免疫機構の調節に重要な相互関係がある。T細胞関連型拒絶反応におけるFOXP3/IL-17比が移植腎予後の有用な指標となりうることも示されており³⁴⁾、移植腎におけるTregおよびTh17の動態について注目していく必要がある。

拒絶反応により生じた細胞障害の程度や誘導されている炎症の程度を評価するためのマーカー

免疫学的機序により移植腎は障害されるが、その障害により引き起こされる細胞の形質変化や炎症そのものの程度を評価する試みがなされている。

1. カベオラ(Caveolae)

Caveolaeは血管内皮細胞に存在する直径50~100nmの細胞膜陥入構造である。コレステロールやスフィンゴ脂質の富むラフトの一部で、NO産生、カルシウム濃度制御、シグナル伝達、コレステロール輸送、癌化抑制などに関与する。またcaveolaeは外界刺激に伴い細胞内の局在変化や構造変化を起こし、内皮細胞の適応機構として重要な役割を担っている。Yamamotoらは、移植腎の慢性拒絶反応でのcaveolaeの動態に着目し、その構造分子であるplasmalemmal vesicle-associated protein-1(PV-1)とカベオリン-1(CAV-1)の発現の変化を検討している。移植腎の慢性拒絶反応では、PV-1は糸球体毛細血管内皮にも発現³⁵⁾、CAV-1はPTCでの発現の上昇を認め³⁶⁾、拒絶反応による内皮細胞の形質変化を報告している。今後もcaveolaeを含め移植後の内皮細胞の動態が明らかになることが望まれる。興味深いことに、最近、CAV-1遺伝子変異と腎移植転帰との関連について、腎移植ドナーのCAV-1 rs4730751 SNPの遺伝子型がAAの場合、同種移植片生着不全リスクが増大することが示唆されている³⁷⁾。

2. Pentraxin 3(PTX-3)

PTX-3は、IL-1やTNF- α などの炎症性サイトカインの刺激により血管内皮細胞、樹状細胞、マクロファージ、線維芽細胞、血管平滑筋細胞、脂肪細胞など、さまざまな細胞で産生される炎症反応性蛋白である。局所的な感染や炎症に反応する鋭敏なバイオマーカーであり³⁸⁾、すでにIgA腎症では腎組織内でPTX3が発現していることが報告され

ている³⁹⁾。移植腎ではImaiらが、拒絶反応時には腎間質のPTX-3の発現が増加することを報告し、急性拒絶反応の組織学的な指標になる可能性を示している⁴⁰⁾。

3. 主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex : MHC)

MHC(HLA)分子には、class IとIIが存在する。ヒトのMHC class II分子にはHLA-DR, HLA-DQ, HLA-DPがある。MHC class IIは、樹状細胞、B細胞、単球・マクロファージなどの抗原提示細胞に発現がみられる。T細胞、NK細胞、造血系前駆細胞、ならびに一部の上皮細胞(尿細管上皮細胞など)でも活性化によりMHC class II分子の発現が増強する。移植病理においてMHC class II分子は急性拒絶反応時に強い発現を示し、抗原提示能が増強すると考えられている。移植腎病理では、拒絶反応時に毛細血管係蹄や尿細管上皮でのMHC class II、特にHLA-DR抗原の発現増強を認めることから⁴¹⁾、拒絶反応や細胞障害、活性化の組織学的マーカーとして用いている。

移植に際して強い拒絶反応を誘導する抗ドナー抗体の主要なものはMHC class I分子やclass II分子に対する抗体である。抗MHC class II抗体の意義は定まっていないところもあるが、MHC分子に対する抗体(抗MHC抗体)は血管内皮の直接傷害作用、補体活性化作用、Fcレセプターを介した炎症細胞の動員など拒絶反応における重要な病因となっている。抗ドナー抗体には、抗MHC抗体のほかに、抗Non-MHC(HLA)抗体、抗血液型抗体による拒絶反応が知られている。抗Non-MHC抗体にはいくつかの抗体が存在するが、その一つの、内皮細胞、樹状細胞、線維細胞や上皮細胞に存在するMHC class I-related chain A(MICA)抗原に対する抗MICA抗体も、移植腎予後のリスク因子として報告されている⁴²⁾。MICA抗原は、免疫組織学的に、正常腎ではpodocyteに発現を認めるが、移植腎の急性拒絶反応では糸球体毛細血管やPTC、浸潤細胞にも発現の増強を認めることも示されている⁴³⁾。

4. その他

拒絶反応の尿細管間質性障害に着目し、急性腎障害で注目されているkidney injury molecule-1(KIM-1)⁴⁴⁾、liver type fatty acid binding protein(L-FABP)⁴⁵⁾、虚血再灌流障害を反映してのToll-like receptor 2⁴⁶⁾や腎臓の虚血状態を反映するhypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)の発現を示した研究もある⁴⁷⁾。

表 移植腎病診断に有用な組織学的マーカー

抗体名もしくは染色名	認識分子	意義	移植腎病理診断での用途
●拒絶反応の免疫機序を評価するためのマーカー			
C4d	補体 C4d	古典経路の活性化の指標	抗体関連拒絶反応時に PTC への沈着を認める。※正常腎でもメサンギウムに沈着を認める。
CD3/CD4/CD8 CD68/CD56	細胞膜糖蛋白 (CD3 は T 細胞受容体)	CD3 (T 細胞), CD4 (ヘルパー T 細胞), CD8 (細胞傷害性 T 細胞) を同定する。 CD68 (マクロファージ/単球) を同定する。 CD56 (NK 細胞) を同定する。	T 細胞関連型拒絶反応時に浸潤が多く見られる。 拒絶反応時に浸潤が多く見られる。 動態は不明確だが抗体関連型拒絶反応時に浸潤を認める。T 細胞関連型拒絶反応でも？
CD25	IL-2 receptor α chain (Tac 抗原)	活性化リンパ球を同定する。	T 細胞関連型拒絶反応時の活性化型 T 細胞を同定する。
MIB-1 PCNA	Ki-67 antigen 細胞増生関連蛋白	細胞周期中の細胞増殖および DNA 合成の程度に相関する。	細胞増生の確認、傷害後の再生や、移植では CD3 と合わせ T 細胞の局所での増生
Perforin Granzyme B TIA-1	細胞傷害性顆粒	細胞傷害性 T 細胞, NK 細胞を同定する。	T 細胞関連型拒絶反応時の細胞傷害性 T 細胞の細胞質内に見られる。
CD38/CD138 (syndecan-1)	細胞膜糖蛋白	形質細胞を同定する。	Plasmacytes-rich 細胞型拒絶反応時に認める。ウイルス関連間質性腎炎にも認める。
CD20/CD79a	細胞膜糖蛋白	B 細胞を同定する。	主に移植では拒絶反応と移植後リンパ増殖性疾患による異型リンパ球の鑑別に用いる。
Myeloperoxidase (MPO)	myeloperoxidase	顆粒球系細胞 (主に好中球) を同定する。	抗体関連型拒絶反応時に浸潤が多く見られる。
FOXP3	Treg の転写因子	Treg を同定する。	免疫寛容や抗拒絶反応に関連するが、臨床での動態の詳細はいまだ不明
IL-17	Th17 細胞産生サイトカイン	Th17 細胞を同定する。	拒絶反応時に発現上昇を認める。
●拒絶反応により生じた細胞障害の程度や誘導されている炎症の程度を評価するためのマーカー			
TUNEL 染色	断片化 DNA	アポトーシスに陥った細胞を同定する。補体依存性細胞傷害にも用いる。	T 細胞関連型や抗体関連型の拒絶反応による細胞傷害の程度を評価する。
Cav-1 PV-1 (PAL-E)	caveolae 関連蛋白	内皮細胞障害を反映する。	慢性拒絶反応時に PTC への発現上昇を認める。
Pentraxin3	炎症反応性蛋白	早期の炎症マーカー	慢性拒絶反応時に糸球体毛細血管への発現上昇を認める。
HLA-DR	MHC class II 分子	抗原提示分子	拒絶反応時に尿細管間質領域に発現上昇を認める。
MICA	MHC class I 関連 A 鎖	感染および炎症時に発現が上昇する	拒絶反応時に毛細血管係蹄や尿細管上皮での発現上昇を認める。
KIM-1 L-FABP	近位尿細管細胞の局在蛋白	尿細管障害の早期マーカー	拒絶反応時に糸球体毛細血管や PTC、浸潤細胞に発現上昇を認める。
TLR-2	Toll 様受容体-2	自然免疫の応答受容体。虚血再灌流障害に関与する。	移植後早期の無機能腎や拒絶反応時の尿細管障害の評価
HIF-1 α	低酸素誘導因子	腎臓の慢性虚血状態や低酸素状態を反映する。	急性拒絶反応時に血管内皮, 尿細管上皮, 炎症細胞内に発現上昇を認める。
●腎臓の構成細胞や器官を同定することで組織学的評価の質を向上させるためのマーカー			
α SMA	α actin のアイソフォーム	筋原性マーカーとして血管平滑筋, 毛細血管の周皮細胞, 筋線維芽細胞を同定	毛細血管の同定, 早期線維化の筋線維芽細胞, 慢性移植血管症の内臓内への移動中膜平滑筋や、慢性糸球体症の活性化メサンギウムを評価する。
typeIV collagen	基底膜構成コラーゲン	基底膜を同定する。	尿細管基底膜の断裂や尿細管構造, 糸球体基底膜やメサンギウム基底膜などを評価する。
CD34 CD31	細胞膜糖蛋白	血管内皮細胞を同定する。	PTC の同定, 拒絶反応時の PTC 炎の評価, 糸球体毛細血管の同定や動脈内膜炎の内皮細胞の同定に用いる。
D2-40	細胞膜糖蛋白	リンパ管内皮細胞を同定する。	リンパ管内皮細胞を同定, PTC との鑑別や、拒絶反応時のリンパ管増生など

腎臓の構成細胞や器官を同定することで組織学的評価の質を向上させるためのマーカー

拒絶反応を評価するにあたって、血管や尿細管の詳細な組織像が必要になることが多く、腎構成細胞を同定することで組織学的評価を補助するマーカーも必要になる。特異な血管病変の確認、尿細管や PTC を同定して、炎症細胞浸潤との関連や障害像、その慢性化を確認する。

1. 慢性移植血管症(chronic allograft arteriopathy)

慢性移植血管症は慢性拒絶反応に特異的な所見である。慢性 T 細胞関連型拒絶反応では炎症細胞を伴うが、慢性抗体関連型拒絶反応にもみられる病態である。線維性内膜肥厚とそれによる内腔狭窄が特徴で、肥厚した内膜には弾性線維の増加を伴うことはない。早期の肥厚内膜は浮腫性で、中膜平滑筋細胞(血流中からの幹細胞も関連する)が増生している。内膜の性状を評価するために弾性線維染色を行う。 α -Smooth Muscle Actin(α -SMA)の免疫染色も使用する⁴⁸⁾。

2. 尿細管炎(tubulitis)

急性/活動性のスコアリングの一つとして、Banff 分類では Tubulitis (“t”) スコアがある。尿細管の横断面に認められる単核球数によって t0~t3 までスコアリングされる。t3 については尿細管基底膜の破壊像を確認する場合もあり、PAS 染色や PAM 染色による基底膜の評価に加え、type IV コラーゲンの免疫染色も必要になることがある⁴⁹⁾。また尿細管基底膜内の CD3 陽性細胞を確認し、尿細管内への T 細胞の浸潤を同定すると tubulitis の確認が容易になる。

3. 傍尿細管毛細血管(PTC)炎

PTC 炎の評価には Banff 分類の peritubular capillaritis (“ptc”)スコアがある。PTC 内の炎症細胞数によって ptc0~ptc3 までスコアリングされるが、炎症細胞の組成まで評価することが望ましく、好中球(エラスターゼ染色/MPO 染色)、T 細胞(CD3 染色)、マクロファージ(CD68 染色)の同定を行う。PTC 炎の評価は皮質領域のみで行い、厳密にはリンパ管内へのリンパ球浸潤との混同を避ける必要があるため、CD34 や CD31 の血管内皮マーカーと D2-40 のリンパ管内皮マーカーを用いて血管とリンパ管の鑑別を行う場合もある^{50,51)}。

4. 間質の線維化と α -SMA

間質の線維化には、陳旧性の完成された不可逆性の線維化と進展過程の可逆性の線維化がある。早期の可逆性の線維化には間質の浮腫が目立ち、 α -SMA 陽性の筋線維芽細胞の増生を認めるが、古い不可逆性の線維化には浮腫性変

化は消失し、 α -SMA 陽性細胞の増生も認めない。間質の線維化の進行と α -SMA 陽性細胞の経時的な変化には関連性があり、病期を推定する補助に役立つ。

5. 髓放線

慢性カルシニューリン阻害薬や血管型拒絶による虚血によって生じる間質の縞状線維化が髓放線領域に局限して起こる medullary ray injury を受け⁵²⁾、腎皮質における髓放線領域と尿細管迷路の鑑別が早期病変の確認には必要になっている。髓放線は集合管とヘンレの下行脚および上行脚により構成されていることや、近位や遠位、集合管など尿細管のセグメントを免疫染色で確認しておくことで、尿細管を観察するための知識の整理につながる。

おわりに

今までに報告されてきた免疫組織学的マーカーをまとめてみると表のようになる。腎生検で行う一般的な組織学的マーカーは腎生検病理アトラスにもまとめられている⁵³⁾。最近の移植免疫学および移植医療の進歩に伴い、今後も新たな病理診断に役立つ組織学的マーカーの開発が望まれる。また、免疫染色による組織学的名マーカーばかりではなく、ゲノミクス(genomics: gene+omics)からの連想で、トランスクリプトミクス(transcriptomics: transcript+omics)、プロテオミクス(proteomics: protein+omics)、メタボロミクス(metabolomics: metabolite+omics)などさまざまなオーミクス(OMICS)に基づく新しい移植腎病理診断法の導入も必要である。Solez らも分子的機序に基づいた病態解析“Pathomics”の重要性を提唱している⁵⁴⁾。今後の移植腎病理に課された課題として、免疫組織学的マーカーや電子顕微鏡解析による移植腎病理解析などのいわゆる形態的病理診断と OMICS に代表される新たな分子病理学的解析との融合も重要である。これらの発展により臨床腎移植の分野で病理診断の精度がさらに向上し、病態の理解、治療選択や予後推定に役立つことが望まれる。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. Am J Transplant 2010; 10: 464-471.
2. Shimizu A, Colvin RB. Pathological features of antibody-mediated rejection. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord 2005; 5: 199-214.

3. Cohen D, Colvin RB, Daha MR, et al. Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney Int* 2012 ; 81 : 628-639.
4. Zwirner J, Felber E, Herzog V, et al. Classical pathway of complement activation in normal and diseased human glomeruli. *Kidney Int* 1989 ; 36 : 1069-1077.
5. Li SJ, Liu ZH, Zen CH, et al. Peritubular capillary C4d deposition in lupus nephritis different from antibody-mediated renal rejection. *Lupus* 2007 ; 16 : 875-880.
6. Cohen D, Koopmans M, Kremer Hovinga IC, et al. Potential for glomerular C4d as an indicator of thrombotic microangiopathy in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2008 ; 58 : 2460-2469.
7. Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, et al. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol* 1991 ; 86 : 464-470.
8. Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection : diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 1999 ; 10 : 2208-2214.
9. Loupy A, Hill GS, Suberbielle C, et al. Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). *Am J Transplant* 2011 ; 11 : 56-65.
10. Seemayer CA, Gaspert A, Nicleleit V, et al. C4d staining of renal allograft biopsies : a comparative analysis of different staining techniques. *Nephrol Dial Transplant* 2007 ; 22 : 568-576.
11. Suzuki T, Horita S, Kadoya K, et al. C4d immunohistochemistry in glomerulonephritis with different antibodies. *Clin Exp Nephrol* 2007 ; 11 : 287-291.
12. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, et al. Chronic humoral rejection : identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001 ; 12 : 574-582.
13. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, et al. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am J Transplant* 2009 ; 9 : 2561-2570.
14. Kanetsuna Y, Yamaguchi Y, Horita S, et al. C4d and/or immunoglobulins deposition in peritubular capillaries in perioperative graft biopsies in ABO-incompatible renal transplantation. *Clin Transplant* 2004 ; 18 : 13-17.
15. Haas M, Segev DL, Racusen LC, et al. C4d deposition without rejection correlates with reduced early scarring in ABO-incompatible renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 2009 ; 20 : 197-204.
16. Sekijima M, Shimizu A, Ishii Y, et al. Early humoral-mediated graft injuries in ABO-incompatible kidney transplantation in human beings. *Transplant Proc* 2010 ; 42 : 789-790.
17. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection : diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2007 ; 18 : 1046-1056.
18. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, et al. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 2009 ; 9 : 2312-2323.
19. Dragun D, Müller DN, Bräsen JH, et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 2005 ; 352 : 558-569.
20. Zhang X, Reed EF. Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant* 2009 ; 9 : 2459-2465.
21. Sis B, Jhangri GS, Riopel J, et al. A new diagnostic algorithm for antibody-mediated microcirculation inflammation in kidney transplants. *Am J Transplant* 2012 ; 12(5) : 1168-1179.
22. Hidalgo LG, Sis B, Sellares J, et al. NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies : evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2010 ; 10 : 1812-1822.
23. Hirohashi T, Chase CM, Della Pelle P, et al. A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. *Am J Transplant* 2012 ; 12 : 313-321.
24. Stegall MD, Diwan T, Raghavaiah S, et al. Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2011 ; 11 : 2405-2413.
25. Chatenoud L, Chkoff N, Kreis H, et al. Interest in and limitations of monoclonal anti-T-cell antibodies for the follow-up of renal transplant patients. *Transplantation* 1983 ; 36 : 45-50.
26. Bishop GA, Hall BM, Duggin GG, et al. Immunopathology of renal allograft rejection analyzed with monoclonal antibodies to mononuclear cell markers. *Kidney Int* 1986 ; 29 : 708-717.
27. Shimizu A, Masuda Y, Kitamura H, et al. Complement-mediated killing of mesangial cells in experimental glomerulonephritis : cell death by a combination of apoptosis and necrosis. *Nephron* 2000 ; 86 : 152-160.
28. Fahim T, Böhmig GA, Exner M, et al. The cellular lesion of humoral rejection : predominant recruitment of monocytes to peritubular and glomerular capillaries. *Am J Transplant* 2007 ; 7 : 385-393.
29. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003 ; 4 : 330-336.
30. Bestard O, Cruzado JM, Rama I, et al. Presence of FoxP3+ regulatory T cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 2008 ; 19 : 2020-2026.
31. Zuber J, Brodin-Sartorius A, Lapidus N, et al. FOXP3-enriched infiltrates associated with better outcome in renal allografts with inflamed fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2009 ; 24 : 3847-3854.
32. Bunnag S, Allanach K, Jhangri GS, et al. FOXP3 expression in human kidney transplant biopsies is associated with rejection and time post transplant but not with favorable outcomes. *Am J Transplant* 2008 ; 8 : 1423-1433.
33. Loverre A, Tataranni T, Castellano G, et al. IL-17 expression by tubular epithelial cells in renal transplant recipients with

- acute antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2011 ; 11 : 1248-1259.
34. Chung BH, Oh HJ, Piao SG, et al. Clinical significance of the ratio between FOXP3 positive regulatory T cell and interleukin-17 secreting cell in renal allograft biopsies with acute T-cell-mediated rejection. *Immunology* 2012 ; 136 : 344-351.
 35. Yamamoto I, Horita S, Takahashi T, et al. Glomerular expression of plasmalemmal vesicle-associated protein-1 in patients with transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* 2007 ; 7 : 1954-1960.
 36. Yamamoto I, Horita S, Takahashi T, et al. Caveolin-1 expression is a distinct feature of chronic rejection-induced transplant capillaropathy. *Am J Transplant* 2008 ; 8 : 2627-2635.
 37. Moore J, McKnight AJ, Simmonds MJ, et al. Association of caveolin-1 gene polymorphism with kidney transplant fibrosis and allograft failure. *JAMA* 2010 ; 303 : 1282-1287.
 38. Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B. Pentraxin 3, a non-redundant soluble pattern recognition receptor involved in innate immunity. *Vaccine* 2003 ; 21 : S43-47.
 39. Bussolati B, Peri G, Salvidio G, et al. The long pentraxin PTX3 is synthesized in IgA glomerulonephritis and activates mesangial cells. *J Immunol* 2003 ; 170 : 1466-1472.
 40. Imai N, Nishi S, Yoshita K, et al. Pentraxin-3 expression in acute renal allograft rejection. *Clin Transplant* 2012 ; 26 : 25-31.
 41. Hall BM, Bishop GA, Duggin GG, et al. Increased expression of HLA-DR antigens on renal tubular cells in renal transplants : relevance to the rejection response. *Lancet* 1984 ; 2 : 247-251.
 42. Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med* 2007 ; 357 : 1293-1300.
 43. Li L, Chen A, Chaudhuri A, et al. Compartmental localization and clinical relevance of MICA antibodies after renal transplantation. *Transplantation* 2010 ; 89 : 312-319.
 44. Zhang PL, Rothblum LI, Han WK, et al. Kidney injury molecule-1 expression in transplant biopsies is a sensitive measure of cell injury. *Kidney Int* 2008 ; 73 : 608-614.
 45. Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, et al. Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2007 ; 18 : 2894-2902.
 46. Hoffmann U, Bergler T, Rihm M, et al. Impact of Toll-like receptor 2 expression in renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2011 ; 26 : 1080-1087.
 47. Yu TM, Wen MC, Li CY, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in infiltrating inflammatory cells is associated with chronic allograft dysfunction and predicts long-term graft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2012, in press [Epub ahead of print]
 48. Ishii Y, Sawada T, Kubota K, et al. Injury and progressive loss of peritubular capillaries in the development of chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2005 ; 67 : 321-332.
 49. Utsumi K, Shimizu A, Yamato M, et al. Alteration of collagen IV in acutely deteriorated renal allografts. *Transplantation* 2001 ; 71 : 1757-1765.
 50. Shimizu A, Colvin RB, Yamanaka N. Rejection of peritubular capillaries in renal allo- and xeno-graft. *Clin Transplant* 2000 ; 14 : 6-14.
 51. Yamamoto I, Yamaguchi Y, Yamamoto H, et al. A pathological analysis of lymphatic vessels in early renal allograft. *Transplant Proc* 2006 ; 38 : 3300-3303.
 52. Kobayashi A, Yamamoto I, Ito S, et al. Medullary ray injury in renal allografts. *Pathol Int* 2010 ; 60 : 744-749.
 53. 小川弥生, 上田善彦. 免疫抗体法の所見と捉え方. 日本腎臓学会・腎病理診断標準化委員会, 日本腎病理協会(編). 腎生検病理診断アトラス, 腎生検病理診断標準化への指針, 病理改訂版, 東京: 東京医学社, 2010 : 43-55.
 54. Solez K, Racusen LC. The Banff classification revisited. *Kidney Int* 2012, in press [Epub ahead of print]