

## 公募助成「CKD（慢性腎臓病）病態研究助成」研究サマリー

研究名	腎性貧血における造血支持細胞の解析
所属機関	筑波大学医学医療系 医療科学（血液学）・血液内科
氏名	小原 直
<p><b>背景：</b>Epo 抵抗性の腎性貧血には様々な要因が考えられるが、尿毒症物質や炎症に伴う造血障害の病態については十分に解明されていない。近年、非血液細胞が構成する造血微小環境の重要性が明らかになってきている。一方で、腎性貧血における造血微小環境の以上についてはほとんど解析されていない。</p> <p><b>目的：</b>Epo 抵抗性腎性貧血患者の造血障害には造血支持細胞や炎症性ケモカインの関与があると仮定し、解析を行う。</p> <p><b>方法：</b>正常腎不全患者の骨髄検体を CD34/CD31/ Osterics/Nestin/GFAP/NGFR/Mac1 など造血支持細胞のマーカーを用いて免疫染色を行う。共焦点顕微鏡を用いて、蛍光強度の定量的解析も行う。</p> <p><b>結果：</b>コントロール骨髄及び腎不全患者由来骨髄における、Nestin および GFAP 陽性細胞の解剖学的解析をおこなった。正常コントロールは9例、腎不全患者骨髄は8例解析できた。腎不全患者の骨髄検体では、形態異常や染色体異常がないことを確認し、骨髄異形成症候群（MDS）の可能性を否定した検体を選択した。コントロール骨髄（骨髄浸潤のない悪性リンパ腫患者）骨髄および腎不全患者では、既報通り、少数の紡錘形を呈する細胞が Nestin および GFAP 陽性細胞として同定された。Nestin 陽性細胞は、血管壁を構成細胞として描出されたが、CD34 あるいは CD31 陽性の血管内皮細胞とは明確に異なり、血管内皮細胞と隣接して血管壁を構成している様子が観察された。一方、一部の腎不全患者骨髄では、血管壁構成とは関連しない Nestin 陽性細胞が目立つ検体が認められた。Nestin 陽性細胞が増加している症例では、ほぼ全例 GFAP 陽性細胞も増加していた。腎不全検体の中でも Nestin 陽性細胞が増加している検体と、増加していない検体があることが明らかとなったため、さらに解析を進めたところ、貧血が強い検体（Hb 8 未満、N=4）で増加傾向を認めていた。一方、貧血が軽度の検体（Hb 8g/dl 以上、N= 3）では明確な Nestin 陽性細胞の増加は1例のみで、しかも軽度であった。共焦点顕微鏡による定量システムで骨髄サンプルの面積当たりの Nestin と GFAP の蛍光強度を定量した。検討症例が少なく、統計学的に有意差を検出することはできなかったが、貧血の強い症例の骨髄検体では Nestin や GFAP の陽性細胞数が多く、面積当たりの蛍光強度が高い傾向が認められた。我々の以前の解析で、Nestin 陽性細胞が増加している MDS 症例では骨髄線維化との関連が指摘されていることから、鍍銀染色を行ったところ、Nesrin 陽性細胞が増加している4症例中3症例では軽度の線維化を認めた（MF1-2）。一方で、骨芽細胞関連のマーカーとして Osterics の免疫染色を行ったが、腎不全患者サンプルとコントロールで検鏡上大きな差はなかった。蛍光強度の定量も行ったが有意差は認めなかった。造血支持細胞が腎不全に及ぼす影響を遺伝子発現の面から解析するために、正常コントロール骨髄、貧血の強い腎不全骨髄、ほぼ貧血のない腎不全骨髄の非造血細胞を分取し、RNA シークエンスを用いて網羅的に遺伝子解析を行った（各々2例ずつ）。それぞれの群で発現パターンに有意差は認められなかった。</p> <p><b>考察：</b>貧血の強い腎不全において、一部の検体では Nestin 陽性細胞・GFAP 陽性細胞が増加していることが観察された。HE 染色などから軽度の骨髄線維化が関与していると考えられる。これまでの MDS with fibrosis の解析と比較し、造血支持細胞の異常が関与している可能性は否定できないが、RNA シークエンスなどからは明確に遺伝子発現異常は検出できなかった。今回は骨髄穿刺から得た細胞のうち、非造血細胞を分取して解析を試みたが、得られた RNA 量がごくわずかであったために十分に解析ができていない可能性はある。ヒト骨髄を用いているため、自由にサンプルを採取することが困難なことが子の解析に関する制約として最も大きい。遺伝子発現の解析方法に関しては今後も検討する必要があると考えられた。腎不全における貧血の要因として、エリスロポエチン産生の低下以外にも造血支持細胞の異常を尿毒症などによってきたし、それによって造血が低下している可能性もある。従来、腎不全患者における貧血の要因の一部として尿毒症物質による造血の直接的な障害が示唆されているが、造血細胞のみならず、造血支持細胞も障害されている可能性がある。これらの症例はそもそも MDS などの血液疾患の可能性を常に考慮する必要性はあり、今後の追跡と多数例での解析が必要である。</p>	