

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19851

研究課題名(和文)肝移植後血栓性微小血管症の病態解明と治療法の確立～新しい包括的補体測定系の開発～

研究課題名(英文)Elucidation of the pathology and establishment of the therapy of thrombotic microangiopathy after liver transplantation - Development of a new complement measurement system -

研究代表者

田中 宏和 (TANAKA, Hirokazu)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：10751224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝移植後における微小循環障害の病態解明のため、最も鋭敏に反応する免疫機構である補体に着目し、その活性動態を包括的に同時計測可能な測定系の開発を行った。Multiplex assayのプロトコルでhuman/rat/mouse/porcineのC5b-9およびADAMTS13に対する抗体beadsの作成を試みた。ADAMTS13に関しては極めて信頼性の高い検定曲線を作成出来たが、他の項目に関してはbeadsに十分な抗体がbindされた事は確認できたものの、測定結果は不安定であった。抗体beadsの作製法には特に問題はなく、適切な抗体を選択すれば測定系を構築可能である事が判明した。

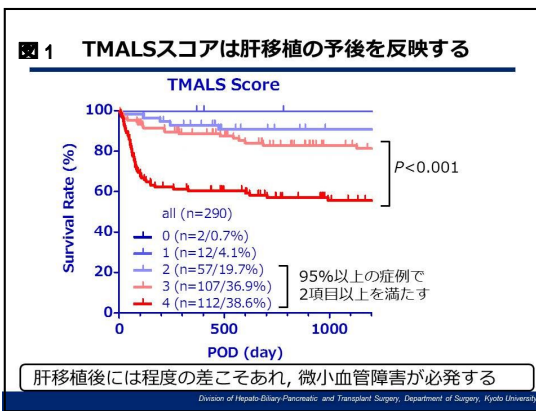
研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the pathology of thrombotic microangiopathy after liver transplantation (TMA-LTx), We focused on the complement system, which is the most sensitive and rapid innate immunity. In this study, we developed a new complement measurement system, using Multiplex Assay and Cytometric Bead Array. Regarding ADAMTS13, which is one of the parameter of TMA-LTx, we could create a highly reliable test curve, but for the other antibodies, the measurement result was unstable though sufficient antibodies were bound to the beads. There was no particular problem in the method for preparing antibody beads. It is confirmed that a complement measurement system using Multiplex can be constructed by selecting an appropriate antibody.

研究分野：肝移植

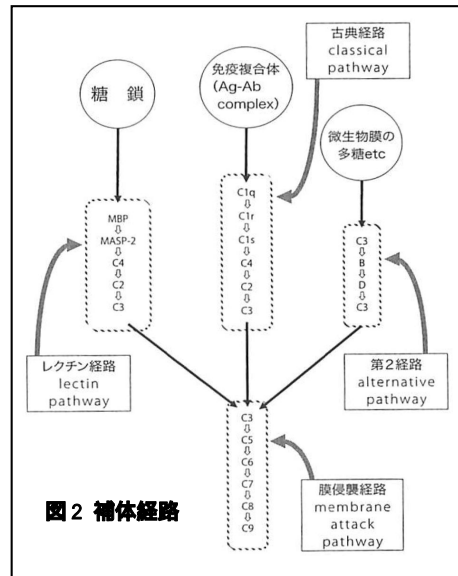
キーワード：肝移植 補体

1. 研究開始当初の背景

臓器を他者（ドナー）より摘出し患者（レシピエント）に植える、というプロセスを必ず経る実質臓器移植において、移植片（グラフト）は、程度の差こそあれ、臓器摘出後のグラフト冷保存中に生じる冷虚血およびグラフト脈管吻合時の温虚血-再灌流に伴って生じる微小血管障害（冷虚血温再灌流障害）を避ける事が出来ない。本邦の肝移植においては、圧倒的な脳死ドナー不足から生体ドナーに頼った部分肝グラフトを用いる事が多いという状況もあり、移植直後のグラフトに余力がないためこの障害が顕在化しやすい。微小血管障害を生じた際の特徴的な検査所見は、破砕赤血球の出現、溶血性貧血、消費性の血小板減少、周辺細胞壊死に伴うLDHの上昇であるが、実際、当院において2006年～2013年にかけて施行した成人部分肝移植290例を検討したところ、276例（95.2%）が60POD以内に2項目以上を、112例（38.6%）が全項目を満たしており、充足項目数が増すに従い予後が増悪した（図1）。



ここで、微小血管障害とは本来、血管内皮が傷害を受けバリア機能が破綻した際に、周辺細胞への傷害の波及を防ぐべく凝固系の亢進と白血球の活性化を生じさせる、という正常な生体防御機構が過剰に働いた結果生じる有害反応である事に留意する必要がある。この反応においてキーとなるのが、ヒトにおける最も原始的かつ迅速に反応する生体防御系である補体である。広範な微小血管障害等により前期補体系路が過剰に活性化すると、C3a や C5a といったアナフィラトキシンを産生し、血管の透過性や白血球の遊走を惹起する。更に反応が進むと終末補体系路の活性化により C5b に C6～C9 が次々に結合し、強い細胞殺傷性を持つ膜傷害性複合体 (MAC) を最終産物として大量に産生するため、時として自己の細胞に対しても傷害的に働く（図2）。しかしながら、肝移植における補体の変動に関しては長らく研究が進んでいなかった。この原因は、我が国の免疫学の関心がサイトカイン研究に置かれ、補体研究は1980年代をピー



クに下火となった事も一因ではあるが、(1) 補体をコントロール出来る薬剤が開発されていなかった、(2) そもそも補体の変動を測定可能な系が存在していなかった事にある。

(1) に関しては2009年に C1-inactivator、2010年に抗補体 C5 抗体エクリズマブが相次いで臨床応用され、特にエクリズマブは TMA の一種である PNH や aHUS (非典型溶血性尿毒症症候群) に著効を示しており、肝移植後 TMA にも臨床応用が期待出来る。一方、(2) に関しては、一般臨床で測定可能な補体系の項目は現時点でも C1q、C3、C4、CH50 のわずか4項目しか存在せず、研究を進展させる上での大きな障害となっている。特に CH50 の測定原理は溶血反応を指標としており測定時間、分解能共に満足のものとは言い難い。また補体系は試験管内でも容易に反応が進むため一回の凍結融解により測定値が大きく変動する。すなわち補体系の変動を網羅的に解析するためには、単回で多項目を測定可能な系を新たに立ち上げる必要がある。今回、我々は、フローサイトメトリーを用いたビーズアッセイ法を補体系の測定に応用出来るのではないかと考え、本研究を立案した。確立した新規測定法を用いる事で、肝移植に限らず TMA における補体系の変動を明らかにする事が可能になると期待している。

2. 研究の目的

【平成27年度】(新しい補体測定系の確立) 補体系の活性を網羅的に解析する新しい手法を確立するために、ヒトおよびマウス/ラットの血液検体を用いて、以下の実験を計画する。

補体系因子を測定し得る適切な抗体を選別、フローサイトメトリー用のビーズを作成し、極少量の検体で複数の補体系因子を同時測定可能な定量測定法を確立する。

ザイモザンなどの補体活性化物質を用いて試験管内で検体内の補体を活性化させ、補体カスケードの最終産物である MAC (膜侵襲複合体) や C9 neoantigen などの産生速度をフローサイトメトリーで計測することにより、補体の定量のみならず活性も同時に確認出来る測定系を確立する。既存の補体活性測定法である CH50 (もしくは ACH50) との相関を解析し、その特性を確認する。

【平成 28 年度】

(肝移植周術期における補体系の動態解明と臨床応用へ向けた取り組み)

前年度で確立した測定系を用いて肝移植領域における補体系制御の意義を検討する。

補体活性がダイナミックに変化する、肝移植後患者の検体を用いて、本測定法の有効性を検証、肝移植周術期における補体系の動態を解明する。

抗補体 C5 抗体投与モデルマウス/ラットにおける抗炎症効果と補体系の活性動態との相関を解析し、抗補体 C5 抗体の臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

ヒトおよびマウス/ラットにおける補体因子タンパクの効果的な蛋白定量法の確立

先に述べた 35 種の補体系因子のうち、C3a、C4a および C5a の 3 種に関しては既に市販のビーズが存在する。今回新しく、補体系の活性化によって生成される活性化フラグメントである iC3b、MAC および C9 neoantigen、制御因子である C1-INAH、H、I および S protein、C5 および C5 転換酵素である C4b2a3b および C3b2Bb に対するヒトおよびマウス/ラット抗体のビーズを作成する。

フローサイトメトリー法を応用した、新しい補体活性測定法の確立

補体系の活性化経路としては古典経路、第 2 経路およびレクチン経路の 3 経路が存在するが、全て補体系の中心成分である C3 を活性化することで後期補体系が活性化し、最終補体産物である MAC を生成する。そこで、細菌の細胞壁成分であるザイモザンを検体に添加することで補体系を ex vivo で活性化し、MAC をはじめとする補体産物の生成速度を計測することで、フローサイトメトリー法による補体活性の測定を行う。

肝移植後血管内皮障害 (DIC、TMA 等) と補体活性との相関解析

肝移植周術期は、術前の肝硬変/肝機能低下により大部分の補体産生が低下していることに加えて、移植直後の低肝機能、虚血再灌流や感染、拒絶に伴う血管内皮障害により補体系が活性化するため、補体系は複雑かつダイナミックに変動していることが予想される。肝移植後の検体を経時的に測定することは、本測定法の有用性を実証するのみならず、臨床免疫学における補体の重要性を再認識することにも繋がる。

肝移植時の補体変動を詳細に観察した報

告は存在しないため、比較研究により本測定法の有用性を実証することは容易ではない。しかしながら当院では以前より肝移植時の補体の動態に着目し、特に AB0 不適合拒絶において肝内に C4d の沈着を認めることなどを報告してきた 3)。既存の測定項目である C3、C4 および CH50 や、これまで蓄積した病理所見を基に、これまで隠れていた各因子の相関をつまびらかにし、肝移植の様な複雑に補体の変動するモデルにおいても本測定法で病態を説明し得ることを実証する。

マウス/ラットを用いた、補体欠損モデルおよび抗補体抗体投与モデルによる血管内皮障害抑制効果の実証

上述の を実証するためには動物モデルによる基礎研究が必要不可欠である。肝移植、虚血再灌流、肝切除後 LPS 投与といった、補体系が活性化するマウス/ラットモデルを作成し、これらにおける補体系因子の変動を比較検討する。

更に、C5 欠損マウスや C6 欠損ラットを用いた各種疾患モデルや、C1 あるいは C5 に対する抗補体抗体を投与したモデルを作成し、これらにおける障害抑制効果を示すことで、抗補体抗体の可能性を追求する。

4. 研究成果

初年度は BD 社 Cytometric Bead Array (CBA) を用いて C3a、C4a、C5a、および補体系の活性化によって生成される活性化フラグメントである iC3b、C5b-9、制御因子である C1-INAH、H、I および S protein、C5 および C5 転換酵素である C4b2a3b および C3b2Bb に対するヒトおよびマウス/ラット抗体のビーズを作成した (図 3)。

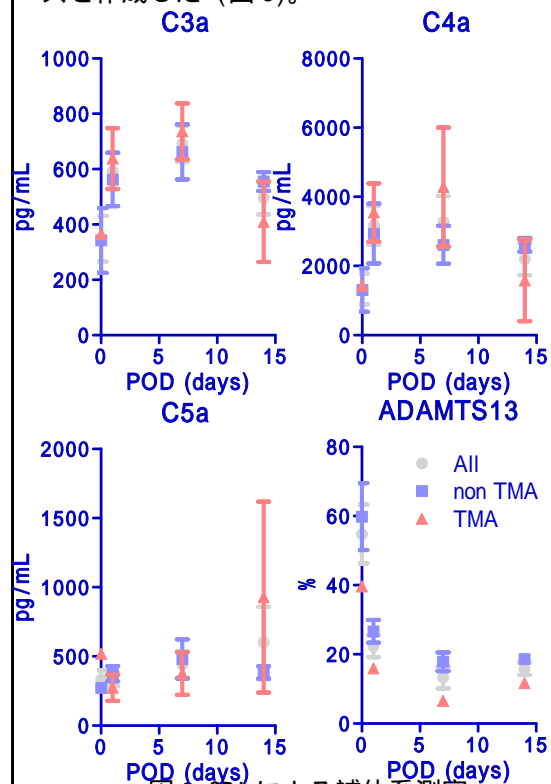


図 3 CBA による補体系測定

各種ビーズを作成後、肝移植後検体を用いて、TMA および non TMA における経時的变化を測定した。既存のビーズである C3a、C4a、C5a に関しては問題なく測定可能であったが、新しく作成したビーズに関しては十分な感度を得る事が出来なかった。本法ではビーズの作成に際し、予め抗体に PE を標識しておく必要があるが、対象とする抗体で PE 標識されたものを確認出来なかったため、今回、非標識の抗体を購入し、PE 標識キットを用いて PE を付加した抗体でビーズを作成した。PE 標識化の過程で抗体の濃度が減少し、ビーズに十分な抗体を付着させる事が出来なかった可能性が考えられた。

そこで次年度は PE 標識化を必要としない、Multiplex 法でビーズを作成する方針とした。実験開始当初は補体系のビーズを購入可能なのは CBA 法のみであったが、本研究中に補体系の包括的測定を希求する現状からヒト補体系の 15 項目 (C2、C4b、C5、C5a、C9、MBL、Factor I、C1q、C3、C3b/iC3b、C4、Factor B、Properdin、Factor H) を測定可能なビーズキットが市販された。これらと重複しない項目である C5b-9 と ADAMTS13 に絞ってビーズを作成する方針とし、同時に、臨床ではなく、マウス、ラット、ブタといった動物実験においても補体動態を観察可能とすべく、多種に交叉耐性を持つ汎用ビーズの作成を試みた (下表)。

| ADAMTS13 (ng/ml) | 蛍光カウント(MFI) | | |
|---------------------|-------------|--------|------|
| | 抗体 1 | 抗体 2 | 抗体 3 |
| 100.00 | 2718.5 | 7756.5 | 10.5 |
| 33.00 | 828.5 | 1086.5 | 10.0 |
| 11.00 | 207.5 | 670.5 | 9.0 |
| 3.70 | 60.0 | 178.0 | 9.0 |
| 1.23 | 24.5 | 60.5 | 10.0 |
| 0.41 | 14.0 | 26.0 | 9.5 |
| 0.13 | 11.0 | 14.0 | 9.5 |
| 0 (Blank) | 8.0 | 9.5 | 9.0 |

| C5b-9 (pg/ml) | 蛍光カウント(MFI) | |
|------------------|-------------|------|
| | 抗体 1 | 抗体 2 |
| 1000.0 | 17.0 | 77.0 |
| 333.0 | 15.0 | 84.5 |
| 111.0 | 18.0 | 86.0 |
| 37.0 | 17.5 | 86.0 |
| 12.3 | 17.5 | 88.0 |
| 4.1 | 17.0 | 80.0 |
| 1.3 | 16.0 | 93.0 |
| 0 (Blank) | 19.0 | 80.0 |

ADAMTS13 においては、購入した 3 種の二次抗体のうち 2 種において良好な検定曲線を作

成する事が可能であった。一方、C5b-9 に関しては、十分量の二次抗体がビーズに吸着した事は確認できたものの、ヒト抗体、汎用抗体いずれにおいても、検定曲線を作成可能な反応を得る事は出来なかった。

良好に反応する抗体ビーズを作成出来た以上、その作成過程には特に問題はなく、適切な抗体を選択すれば、本測定系を構築可能である事が判明した。

本研究期間中に、補体系がドラスティックに変化すると考えられる、肝移植、虚血再灌流および肝切除後 LPS 投与のマウスもしくはラットモデルを作成し、血液および組織検体を採取済である。今後も適切な抗体を検索しつつ、ヒトのみならずラット・マウス・ブタを用いた動物実験においても包括的な補体測定系を構築すべく研究を続ける予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Okamura Y, Tanaka H, Hata K, et al, Impact of Subnormothermic Machine Perfusion Preservation in Severely Steatotic Rat Livers: A Detailed Assessment in an Isolated Setting, 査読有、Am J Transplant. 2017 May;17(5):1204-1215

Kubota T, Hata K, Tanaka H, et al, Impact of Donor Age on Recipient Survival in Adult-to-adult Living-donor Liver Transplantation, 査読有、Ann Surg. 2017 Mar 10

[学会発表](計 1 件)

Tanaka H, Tolba R, et al, Efficacy of the novel Preservation Solution, Ecosol, in a rat liver transplantation model, 52nd International Meeting of the European Society for Surgical Research, 2017.6.16、アムステルダム (オランダ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 宏和 (TANAKA, Hirokazu)
京都大学・大学院医学研究科・非常勤講師
研究者番号：10751224

(2) 研究分担者

特になし

(3) 連携研究者

特になし

(4)研究協力者
特になし