

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20074

研究課題名(和文)腎血管内皮細胞と赤血球における血液型糖鎖抗原の特異性の解析と移植への応用

研究課題名(英文)The analysis of the differences in antibody reaction against ABO antigen between red blood cells and renal endothelium

研究代表者

田崎 正行(Tasaki, Masayuki)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：40571906

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)： ABO血液型不適合移植において、「抗ドナー血液型抗体が血液中に存在しても拒絶反応が起こらない、Accommodation(免疫学的順応)が成立する、という事実」が明らかになったが、その誘導・成立メカニズムは未だ謎につつまれている。

よりヒト腎血管内皮細胞のABO糖鎖抗原を模倣した糖タンパクアレイを開発し、赤血球のABO糖鎖抗原に対する反応(凝集反応)と腎血管内皮細胞のABO糖タンパク抗原に対する反応が必ずしも一致しないことが確認できた。本研究により、ABO不適合腎移植後には腎血管内皮細胞に発現するABO糖鎖抗原に対しては、抗体産生が特異的に抑制される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Despite the presence of antigens on the graft's vascular endothelium and the presence of antibodies in recipients' blood, clinical rejection does not always occur in ABO incompatible kidney transplantation. This phenomenon is called as accommodation. However, the mechanisms are undefined.

We developed glycoconjugate microarray which is mimicked ABO blood group antigens expressed on human renal endothelium. In this study, we compared anti-A and anti-B antibodies reaction between red blood cells and renal endothelium. We found that antibodies production against donor blood group antigens of renal endothelium specifically inhibited after ABO incompatible kidney transplantation. This may be the mechanism of accommodation.

研究分野：移植免疫学

キーワード：腎移植 ABO血液型抗原 抗体

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の透析患者は、2013年12月現在31万人に達し、毎年約6,000人増加している。その医療費は約1兆4千億円で医療経済を圧迫しており腎移植の普及は時代の要請でもある。しかし腎移植は、1964年より2011年までに26,200例、2012年は年間約1,600例と充分とはいえない。わが国ではとくに献腎提供が少ないので、我々は生体腎移植の適応を拡大する目的で、1989年に初めてABO血液型不適合腎移植の長期生着に成功した (American J Transplantation. 2004)。2004年には脾摘を行わない脱感作療法を開発・導入し、画期的な手術侵襲の軽減と成績の向上に貢献してきた (Xeno-transplantation. 2006)。以来わが国では通算2,500例が実施され、年間症例数は約300例、生体腎移植の25%を占めるに至り、献腎移植数を凌駕している。その成績は血液型適合例と遜色なく、名実ともに末期腎不全患者のQOLの高い根治的治療法として確立している。

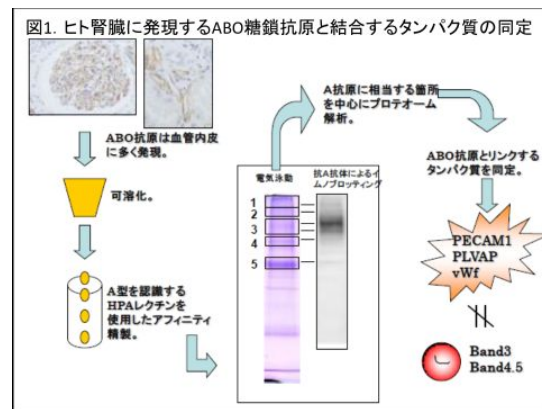
ABO血液型不適合腎移植を成功させる秘訣は、「ドナー移植腎血管内皮細胞に発現する血液型抗原に対する抗A抗B抗体が引き起こす抗体関連型拒絶反応 (AMR) を如何に制御するか」にある。現在、抗ドナー血液型抗体の力価は赤血球凝集反応を用いて評価されている。しかし、抗体価が高くても拒絶反応が起きない症例がある一方、同様の抗体価でも拒絶反応を発症する症例も存在するなど、臨床経過との相違が問題になっていた。また、多くの症例では移植後一定期間を過ぎると、抗体が存在するにも拘らず、AMR が起こらない、免疫学的順応 (Accommodation) が誘導されることも明らかになったが、その誘導・成立のメカニズムも未だ謎に包まれたままである。これらの現象を解き明かすためには腎血管内皮細胞と赤血球の血液型抗原の構造の相違を明らかにし、これらに対応する特異的な抗体を検出する方法の開発が喫緊の課題であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、『ABO不適合腎移植におけるABO血液型抗原と抗ドナー血液型抗体の多様性について解析し、抗原と抗体が共存できるメカニズムを追究する』ことである。

## 3. 研究の方法

今まで腎血管内皮細胞特異的なABO糖鎖抗原に対する患者血清の反応を評価する方法はなかった。しかし、我々はヒト腎血管内皮細胞に発現しているABO抗原結合タンパク質を網羅的に同定している (図1. Tasaki M, et al. Transplantation. 2009)。



腎血管内皮細胞特異的なABO糖鎖抗原に対する抗体の反応を測定するために、我々が同定した腎血管内皮細胞特異的なタンパク質の糖鎖結合領域を発現ベクターにクローニングし、プラスミドを作成する (研究協力者の産業技術総合研究所の創薬基盤研究部門により作成)。ABO抗原が発現したHEK293にトランスフェクションさせ、目的のタンパク質にABO抗原が発現させたものを利用した、糖タンパクアレイを作成する (図2. 腎血管内皮細胞のABO抗原を模倣したアレイ)。これを用いて、ヒト血清による赤血球と腎血管内皮細胞のABO抗原への反応を比較検討した。

ABO糖鎖抗原にはType1から4のcore structureが存在するが、抗A抗体、抗B抗体のcore structure特異的な抗体の解析はほとんど行われておらず、ABO不適合腎移植前後の解

析は今までにない。ABO糖鎖抗原をType1から4のcore structure特異的な糖鎖アレイを使用し、腎移植患者の血清の反応を確認した。

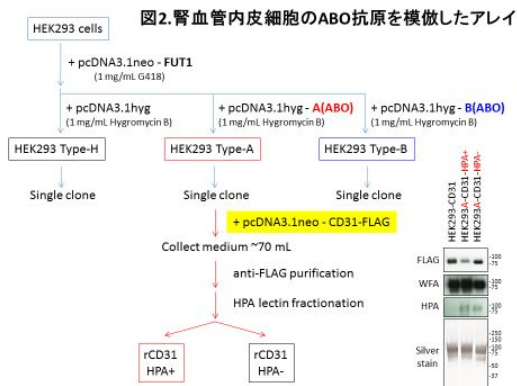


図2.腎血管内皮細胞のABO抗原を模倣したアレイ

#### 4. 研究成果

健常者血清、腎移植患者血清を用いて、開発した糖タンパクアレイの抗A抗体、抗B抗体検出の特異性を検討した。我々の開発した糖タンパクアレイは抗A抗体、抗B抗体の検出に関して、感度もよく特異性も問題がないことが分かった(図3)。次に、赤血球の凝集反応と比較した。我々の抗A抗体、抗B抗体を検出するための糖タンパクアレイの反応と赤血球の凝集反応には相関性が認められた。

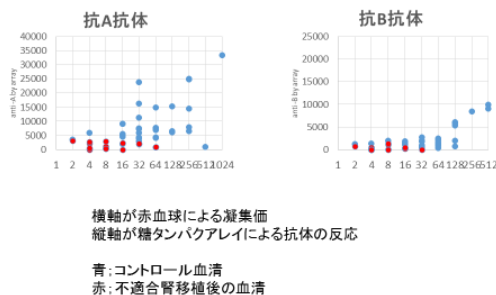
図3.糖タンパクアレイを用いた抗A抗体の検出



ABO不適合腎移植後の患者保存血清を利用し、ABO不適合腎移植後の抗A抗体、抗B抗体の反応を赤血球と糖タンパクアレイで比較検討した(図4)。ABO不適合腎移植後の血清は、我々の開発した糖タンパクアレイに対しドナー血液型特異的に低反応であることが分かった。それらの血清の中には赤血球に

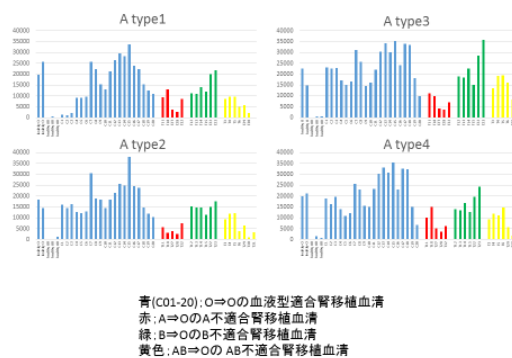
凝集反応を示すものも含まれていた。つまり、ABO不適合腎移植後は、腎臓の血管内皮細胞のABO抗原には抗体が反応しなくなる(もしくは、腎血管内皮細胞特異的に抗体産生がされなくなる)こと示唆された。これが、ABO不適合腎移植後に起こるAccommodationのメカニズムであると考えられた。

図4.赤血球凝集反応と糖タンパクアレイによる抗A・B抗体の比較



また、ヒト血清中に存在する抗A抗体、抗B抗体を、ABO糖鎖抗原のType1から4のcore structure別に解析を行った。ヒトはABO糖鎖抗原のType1から4のcore structureそれぞれに抗体を持つことが分かった。さらに、ABO不適合腎移植後はType2に対する抗体が弱くなる傾向があった(図5)。

図5.糖鎖アレイを用いたType1-4別抗A抗体の測定



実際のヒト腎血管内皮細胞を免疫染色法で解析すると、ヒト腎血管内皮細胞上にあるABO抗原はType2が多く含まれていることが分かった。ABO不適合腎移植後にドナーABO血液型抗原のType2に対する抗体が抑制されることが、拒絶反応を制御することに関連している可能性が示唆された。

## 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 1 件)

Tasaki M, Saito K, Nakagawa Y, Imai N, Ito Y, Aoki T, Kamimura M, Narita I, Tomita Y, Takahashi K. Acquired Downregulation of Donor-Specific Antibody Production After ABO-Incompatible Kidney Transplantation. Am J Transplant. 2017 Jan;17(1):115-128.

査読有

[学会発表](計 1 件)

Tasaki M, Saito K, Nakagawa Y, Imai N, Takahashi K, Tomita Y, . Acquired Downregulation of Donor-Specific Antibody Production After ABO-Incompatible Kidney Transplantation. American Transplant Congress. USA (Boston), 2016/6/14 (Poster 発表).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

田崎 正行 (TASAKI, Masayuki)  
新潟大学・医歯学総合病院・助教  
研究者番号：40571906

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

研究者番号：( )

(4)研究協力者  
( )