

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10518

研究課題名(和文) ICFA法による移植臓器組織中抗ドナー特異的HLA抗体の測定法の開発と臨床検討

研究課題名(英文) Establishment and Clinical Investigations of Graft Immunocomplex Capture Fluorescence Analysis to detect Donor-Specific Antibodies and HLA Antigen Complexes in the Allograft.

研究代表者

吉村 了勇 (Yoshimura, Norio)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：00191643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：臓器移植における抗体関連拒絶の制御は不十分で現行の免疫抑制剤では完全な制御は難しく長期成績は十分では無い。生検組織から臓器内の抗体の存在を同定することで、早期に正確な診断を実施することで治療介入を可能とすることを目標とした。抗体と反応する抗原を同時に捕捉することで移植臓器から抗体同定を可能とした(immunocomplex capture fluorescence analysis (ICFA)法)。主な研究成果として、本手法を用いることで1.正診率の向上の寄与、2.早期発見への貢献、3.複数存在する場合に問題となる抗体の同定、4.治療時の改善指標となる、5.治療介入効果予想が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植後、生検組織を用いimmunocomplex capture fluorescence analysis (ICFA)法を実施することで 1. 正診率の向上の寄与、2.早期発見への貢献、3.複数存在する場合に問題となる抗体の同定、4.治療時の改善指標となる、5.治療介入効果予想が可能となり、抗体関連拒絶が大きな臓器移植生着率低下の原因となる臓器移植での移植臓器生着率への向上、患者生存への寄与が期待される意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Antibody-mediated rejection (AMR) has recently been paid much. The antibodies involved are usually referred to as donor-specific anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies (DSA). The detection of DSA in serum (s-DSA) is generally required as a criterion for the diagnosis of AMR. However, there are sometimes problems with s-DSA. Thus, we applied the novel assessment of intra graft DSA (g-DSA) from biopsy samples that seems to have an advantage over the assessment of s-DSA.

The followings are our main findings 1. accurate diagnosis of AMR, 2. early detection of AMR, 3. detection of responsible DSA, 4. an indicator of complete recovery from, 5. g-DSA can be a marker that implies histological and clinical reversibility of AMR. Timely and adequate anti-humoral intervention might reverse the early phase of AMR with complete clearance of g-DSA. graft ICFA routinely will lead to logical decision-making in therapeutic modalities and improved long-term graft survival.

研究分野：臓器移植

キーワード：臓器移植 拒絶反応 抗体関連拒絶反応

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臓器移植分野において急性期の成績は免疫抑制剤の発展により細胞性拒絶の制御により比較的良好で満足できるものとなったが、抗体関連拒絶(AMR)の制御は未だ不十分で、抗ドナー特異的 HLA 抗体(DSA)による急性期の AMR、また移植後遠隔期に生じる抗体関連慢性拒絶は現行の免疫抑制剤では効果不十分で長期成績は満足できるものではない。したがって臓器移植分野において抗体関連拒絶の正確な早期診断は主要な研究テーマの一つである。現在、血清中の DSA(s-DSA)及び病理学的な変化から診断法を用いて抗体関連拒絶の診断を行う事が主流であるが、DSA 産生が少量である場合は、移植臓器への抗体付着により血清中には検出されない例があり、また病理学的所見は軽微な場合や、他病変の混在により診断困難例も存在する。さらに病理学的に慢性的な変化の生じたグラフト機能は種々の治療に対しても抵抗性でそのグラフト生存率は低い事が明らかになっている(Cooper, J.E.et al. Transplantation, 2014; 12: 1253-1259.)。従って、移植臓器内の DSA(g-DSA)の正確な同定は早期でかつ正確な診断を可能にし、臓器移植のグラフト生存率向上に非常に有益であると考えられる。そこで生検組織を融解し、HLA 抗原からも解離させ抗体のみを分離し既存の Single Antigen Bead Assay 法で同定することを少数の報告ではあるが試みられている。g-DSA 同定は非常に有用であることが予想されるが、この方法は抗体を抗原から解離させ、再度抗原抗体反応を生じさせるため、正確な DSA 同定が困難な事や、またグラフト血管内の遊離抗体を補足する可能性があり、s-DSA と g-DSA の区別が難しく、行程の長さ、費用の面からも普及には至っていない。

2. 研究の目的

免疫抑制剤の発展は臓器移植において主に細胞性拒絶の制御を可能とし、移植臓器(グラフト)の生着期間延長をもたらした。AMR 発生抑制、早期治療介入による根治が現在の大きな課題であり、それに貢献することを大きな目的とする。そのため、g-DSA を臨床現場で正確に速やかに実施するため、今回我々は、s-DSA 測定に用いる immunocomplex capture fluorescence analysis(ICFA)法を g-DSA 測定に応用し、移植臓器組織と反応した DSA の同定を行なった。この新規手法によって、抗体関連拒絶の診断をより早期に確実に行う事ができ早期治療が可能となる。さらにこの方法で組織障害性の高い DSA と低い DSA の差異を明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

ICFA 法を移植臓器組織へ応用する。当手法は従来ドナー白血球細胞とレシピエント血清を反応させることで生じる HLA と DSA 複合体を Luminex ビーズ上に固定した抗 HLA モノクローナル抗体により捕捉することで、抗 HLA 抗体を特異的に抗原とともに検出する方法である。これを臓器移植レシピエントの生検時に得られた微量移植組織片を対象に ICFA 法を実施するグラフト ICFA 法を用いる。

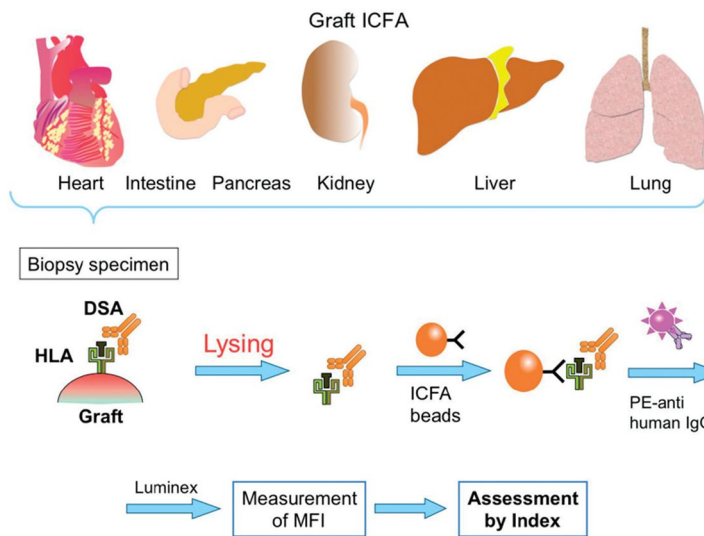


図1. グラフト ICFA 法の概念図
Nakamura, T, Yoshimura, N. et al. (2019). Donor Specific anti-HLA Antibodies in Organ Transplantation -transition from serum DSA to intra-graft DSA-. Croatia, Intech.より引用

対象患者は腎移植、肝移植双方において、1974年01月01日以降から京都府立医科大学移植再生外科学にて術後フォローアップ中に移植臓器生検を実施する患者で腎、肝移植患者（性別年齢を問わない）。g-DSA測定は上記記載でのグラフトICFA法（図1）にて実施し、Luminex解析結果のMFI値を算出する。g-DSAを次の式からindexとして算出する。Index = $(X_{HLA} - (N_{HLA} - N_{BB})X_{BB} / N_{BB}) / X_{BB}$ X_{HLA} : サンプル検体平均MFI; X_{BB} , サンプル検体ブランクビーズ平均MFI; N_{HLA} , 陰性検体平均MFI; N_{BB} , 陰性検体ブランクビーズ平均MFI.

s-DSA は LABScreen Singles Antigen HLA Class I/II beads を用いて Single Antigen Beads Assay を Luminex にて施行し MFI を算出する。

病理学的評価として、生検検体を 10% 中性緩衝ホルマリンにて保存、パラフィン固定を実施し、hematoxylin eosin (H&E), C4d 染色, Masson trichrome 染色, periodic acid-schiff 染色, 及び periodic acid-methenamine silver 染色を実施、Banff 分類にて評価を実施した。

主に以下の目的に分けて研究した。

- 【目的1】臨床診断、s-DSA、g-DSA、g-DSA-C3d の相関性
- 【目的2】g-DSA と病理学的変化の相関性
- 【目的3】移植前 s-DSA 陽性症例での g-DSA の変動評価：治療介入必要因子の検討
- 【目的4】*de novo* g-DSA 発生のリスク因子
- 【目的5】組織障害性の高い g-DSA の特徴の検討
- 【目的6】g-DSA と移植後移植臓器生存率の検討
- 【目的7】DSA による抗体関連拒絶に対する治療後の g-DSA 検討 (1) 移植前 s-DSA 陽性症例、(2)*de novo* DSA 陽性症例を明らかにする。

4. 研究成果

【目的1】臨床診断、s-DSA、g-DSA、g-DSA-C3dの相関性：フォローアップ生検患者において血液生化学検査、s-DSA、g-DSA及びg-DSA-C3d値結果を検討した。

Linear regression analysis（統計解析）での結果、s-DSA、g-DSA間には有意な相関は認めず、一方、抗体関連拒絶罹患期間とg-DSA間に正の相関関係を認め、またg-DSA値が低いほど治療効果を認めることが明らかとなった。g-DSA-C3d及び補体活性については報告時現在、検討中である。

【目的2】g-DSAと病理学的変化の相関性：腎移植においてg-DSAの値とBanff分類に基づいた病理学的変化との相関性を検討した。以下、ptc, g, cg, C4dスコアと有意に相関を認め、g + ptc (microvascular inflammation), g + cg + ptc (microvascular lesions)スコアはg-DSAと有意に正相関を示した。慢性拒絶を示す cg + mm (microvascular deterioration)スコアはg-DSA>10群で有意に高値を示した。さらにBanff分類では不完全AMRとされ診断が困難な症例に対しても確実な診断が可能であった。

現在の標準的診断方法である病理学的AMR診断と本手法のAMR診断感度・特異度を検討した結果、100% 感度 (n=12/12), 92.9% 特異度 (n=26/28)の高精度で診断可能であった。

【目的3】移植前s-DSA陽性症例でのg-DSAの変動評価：治療介入必要因子の検討
術前減感作療法としてRituximab (200 mg)投与と血漿交換療法にてDSA MFI < 2500とした移植症例において一過性にg-DSAは上昇を示すが、経時的に下降を示した。これらの症例においては術前減感作成功例と判断し治療介入は不要と判断することができると結論した。

【目的4】*de novo* g-DSA 発生のリスク因子：腎移植、肝移植ともにカルシニューリン阻害剤の血中濃度の低値と *de novo* g-DSA 発生について相関を示した。また、腎移植においてはステロイド剤中止症例で *de novo* g-DSA 発生が高い傾向にあった。

【目的5】組織障害性の高い g-DSA の特徴の検討：現在まで s-DSA 陽性症例で組織学的及び臨床的にグラフト機能障害を認めるもとの認めないものがあった。グラフト機能障害を認めるものではその多くが g-DSA 陽性となる一方、認めないものは g-DSA 陰性であった g-DSA+/s-DSA±の状態となり得る g-DSA が高組織障害性であると結論した。現在、さらに補体活性との関連性について検討中である。

【目的6】g-DSA と移植後移植臓器生存率の検討：腎移植において、g-DSA 存在が一年後のグラフト機能低下と有意に相関を示した。また、index の絶対値と悪化程度は相関を示した。

【目的7】DSA による抗体関連拒絶に対する治療後の g-DSA 検討：index の絶対値が治療介入余地を示すことが明らかとなり、g-DSA index により治療選択を実施することが望まれる結果であった。

以上、1.正診率の向上の寄与、2.早期発見への貢献、3.複数存在する場合に問題となる抗体の同定、4.治療時の改善指標となる、5.治療介入効果予想が可能となった。特に重要な結果として、グラフトICFA法を用いることでAMRの兆候はあるがs-DSA陰性の患者において、g-DSA陽性(移植臓器組織中DSA存在 = AMR)の患者を識別可能であること、g-DSA-/s-DSA+については経過観察で良いこと、また治療介入効果の高い慢性活動性AMRを判定することが可能である。これらの成果からグラフトICFA法を積極的に用いることで臓器移植長期生着に大きく貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura, T., Shirouzu, T., Nakata, K., Yoshimura, N., Ushigome, H.	4. 巻 20
2. 論文標題 The Role of Major Histocompatibility Complex in Organ Transplantation - Donor Specific Anti-Major Histocompatibility Complex Antibodies Analysis Goes to the Next Stage -	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4544-4565
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20184544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura, T., Yoshimura, N., Akioka, K., Shirouzu, T., Kawai, S., Imanishi, Y	4. 巻 51
2. 論文標題 Clearance of Intra-graft Donor Specific Anti-HLA Antibodies in the Early Stage of Antibody-Mediated Rejection following Rituximab and Apheresis Therapy in Renal Transplantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transplant Proceedings	6. 最初と最後の頁 1365-1370
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2019.01.126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura, T., Shirouzu, T., Kawai, S., Imanishi, Y., Matsuyama, T., Harada, S. et al.	4. 巻 51
2. 論文標題 Detection of Intra-Graft Anti-Blood Group A/B Antibodies following Renal Transplantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transplant Proceedings	6. 最初と最後の頁 1371-1377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2019.01.128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura, T., Shirouzu, T., Kawai, S., Matsuyama, T., Harada, S., Nobori, S	4. 巻 51
2. 論文標題 Graft Immunocomplex capture fluorescence analysis can detect intra-graft anti MHC antibodies in mice cardiac transplantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transplant Proceedings	6. 最初と最後の頁 1531-1535
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2019.01.114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura, T., Ushigome, H., Watabe, K., Imanishi, Y., Masuda, K., Matsuyama, T. et al.	4. 巻 46
2. 論文標題 Graft Immunocomplex Capture Fluorescence Analysis to Detect Donor Specific Antibodies and HLA antigen complexes in the Allograft	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Immunological Investigations	6. 最初と最後の頁 295-304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08820139.2016.1258711	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura, T., Ushigome, H., Watabe, K., Imanishi, Y., Masuda, K., Matsuyama, T. et al.	4. 巻 49
2. 論文標題 Influences of Preformed Donor-Specific anti-HLA Antibodies in Living-Donor Renal Transplantation: Results with Graft Immunocomplex Capture Fluorescence Analysis. '	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Transplant Proceedings	6. 最初と最後の頁 955-958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2017.03.013.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Nakamura, T., Yoshimura, N., Akioka, K., Shirouzu, T., Kawai, S., Imanishi, Y. et al.
2. 発表標題 Clearance of Intra-graft Donor Specific Anti-HLA Antibodies in the Early Stage of Antibody-Mediated Rejection following Rituximab and Apheresis Therapy in Renal Transplantation.
3. 学会等名 Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 3.Nakamura, T., Shirouzu, T., Kawai, S., Imanishi, Y., Matsuyama, T., Harada, S. et al.
2. 発表標題 Detection of Intra-Graft Anti-Blood Group A/B Antibodies following Renal Transplantation.
3. 学会等名 Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Nakamura, T., Yoshimura, N., Shirouzu, T., Kawai, S., Imanishi, Y., Matsuyama, T., et al.
2. 発表標題 Graft Immunocomplex capture fluorescence analysis can detect intra-graft anti MHC antibodies in mice cardiac transplantation.
3. 学会等名 The 12th Korea Japan Transplantation Forum (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Nakamura, T., Yoshimura N et al.
2. 発表標題 Graft Immunocomplex Capture Fluorescence Analysis to Detect Donor Specific Antibodies and HLA Antigen Complexes in the Renal Allograft.
3. 学会等名 American Transplant Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村緑佐、吉村了勇
2. 発表標題 グラフトICFA法による移植臓器内ドナー特異的HLA抗体の検出.
3. 学会等名 第53回日本移植学会総会.
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakamura, T., Yoshimura N et al.
2. 発表標題 Graft Immunocomplex Capture Fluorescence Analysis can detect intra-graft anti A/B antibodies.
3. 学会等名 American Transplant Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 中村緑佐
2. 発表標題 グラフトICFA法によるグラフト内ドナー特異的抗HLA抗体検出の有用性
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 中村緑佐
2. 発表標題 DSAに対する新たな取り組み～血清DSAからグラフト内DSA検出へ～
3. 学会等名 第35回腎移植血管外科研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nakamura, T., Ushigome, H., Shirouzu, T., Yoshimura, N.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 19
3. 書名 Human Leukocyte Antigen (HLA)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中村 緑佐 (Nakamura Tsukasa) (30777959)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	