

平成 21 年 3 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591496

研究課題名（和文） 血液型不適合移植における Accommodation の機序の解明

研究課題名（英文） The analysis of the mechanism for accommodation in ABO incompatible transplantations

研究代表者

石田 英樹（ISHIDA HIDEKI）

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60246543

研究成果の概要：血液型を間違えた輸血（異型輸血）を施行すると溶血を起こし死にまで至る。1989 年から当大学当科では血液型の異なる腎臓移植を施行してきた。1990 年代後半より開発された免疫抑制剤はいまやこのような難解な移植をもほぼ 100%近い成績にまで達成させている。しかし今も昔もどのようにしてこれらの血液型の異なる腎臓がレシピエントに許容され長い間優れた腎臓の機能を発揮させることができるのか、不明な点は少なくない。この研究は血液型不適合移植における免疫的な機序の解明を目的とした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、外科学一般

キーワード：腎移植、血液型不適合、Accommodation、免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

腎臓移植は本邦にて 1969 年に筑波大学で開始された。以来全国各地で施行されてきたにもかかわらず、2006 年によややく 1000 例に到達した。1000 例の内訳は今昔 8 割は生体腎であり、献腎は残り 2 割に満たない。欧米の症例数年間 15000 例に比較して約 10 分の 1 以下であり、移植分野においては日本は世界から大きく立ち遅れているといわざるを得ない。その一方で欧米各国の移植臓器不足も深刻化している。15000 例のうち約 4 割が生体腎にて占められるようになってきており生体腎対献腎の割合は逆転

しつつある。そのような意味において移植腎臓をいかに長期生着させるかが重要なカギとなってきている。腎臓移植が慢性腎不全患者の確立した治療法となってから約 50 年が経過した。この間目覚ましいほどの免疫抑制剤の改良および臨床への応用は確実に移植腎の生着率の向上に寄与した。代表的なものとしては 1990 年代前半のシクロスポリンの開発と臨床への登場、1990 年代中盤のプログラフの登場、そしてセルセプトの 1990 年代後半の登場である。特に後者 2 剤（セルセプトおよびプログラフ）の登場は、今までの免疫抑制剤の使

用にとって画期的なものとなり劇的にステロイドを減量できたことによって移植術直後の合併症を減らすことで患者生着率を改善しウイルス感染の減少に寄与した。

血液型の異なる移植すなわち血液型不適合移植は当科にて 1989 年に最初に施行された。血液型抗体を移植直前に充分量除去し、移植の術中に免疫臓器である脾臓を摘出することによって血液型適合移植と遜色ない成績をおさめている。血液型抗体がレシピエント内に存在するにもかかわらず移植腎臓が拒絶を受けずに生着する詳しい機序については判明していない。免疫学的にこの現象は Accommodation と呼ばれている。可能性のある機序としては、血液型抗体の質的な変化によって抗原に対する攻撃性を失活するようになる、抗原性が、免疫原性を失うようになる、抗原抗体反応の強度が変化するようになる、補体制御因子 (DAF, など) がこれらの抗原抗体反応を抑制する方向に作動する、などである。

血液型不適合移植は最初に成功例を収めたのは Alexandre らであり今から遡ること 30 年前になる。戦略として、血漿交換による抗血液型抗体の除去、免疫抑制剤の長期投与、ならびに脾臓の摘出などがあり、そのプロトコールに従ってわれわれも同移植を施行してきた。近年、脾臓の摘出の代替手段として抗 CD 抗体の利用が開始になった。同薬 (リツキシマブ) はマウスとのキメラ抗体であり CD20 を主に発現する B リンパ球を選択的に除去することで 1990 年代の前半に開発され、臨床応用された。適応は現在も非ホジキンのリンパ腫瘍である。適応外の応用としてスウェーデンで移植分野特に血液型不適合移植における脾臓摘出の代替手段として注目を浴びた。免疫学的に未熟である小児などにとって免疫臓器である脾臓の摘出は将来的に免疫不全を惹起する可能性も憂慮されたため、同薬の登場は 2000 年以降の移植に大きな転機となったといえる。我々の施設においても 2005 年の 1 月より同薬を血液型不適合移植および抗 HLA 抗体が陽性に検出される患者において適用している。現時点では 30 例以上に使用を行い脾臓を摘出しなくてもこのような免疫学的にハイリスクな患者の腎臓移植が十分可能になったといえる。

血液型不適合移植時に障害となる免疫学的因子は抗血液型抗体の存在である。血液型抗体は 10 歳までの間に大腸菌などの体内細菌に反応して作られる自然

抗体である。すなわち抗体のサブクラスとしては I g M に属するといわれる。既存抗体として生まれながらにしてヒトはこの抗体を有しているために血液型を超えた臓器移植時には抗体関連を伴うはげしい拒絶反応に見舞われる。すなわちこのような移植を施行する際には移植前にできるだけ低抗体価まで下げておくことが必要である。

移植前に低値にまで下げられた抗血液型抗体は移植時には再上昇を続ける。上昇後の値が本来の値以上にまで上昇しても一度機能を開始した移植腎臓は拒絶反応を起こすこともなく良好な腎機能を発揮し続ける。抗体が血漿中に大量に存在しているにも関わらず腎臓がどうして機能を維持できうるのか、不明である。そこで移植後の免疫抑制剤投与下に産生され続ける抗血液型抗体の存在の意義についてまた抗体の質的量的変化について解析していくことが他の抗体たとえば抗 H L A 抗体への免疫学的寛容への応用につながるのではないかという着想するにいたった。

2. 研究の目的

前述のように抗血液型抗体は基本的に I g M サブクラスに属すると考えられている。しかし同時に I g G の存在は明らかであり特に血液型 O 型のレシピエントの体内に存在する血液型抗体はそのほとんどは I g G サブクラスである。(逆に A 型 B 型レシピエントの血液型抗体は I g M である) われわれは独自の抗血液型抗体の分析の結果、以上の結果を再確認するにいたった。

そこで血液型不適合移植を施行した後に産生される抗血液型抗体の種類を再度解析することによって抗体別による拒絶反応との関連性、さらにこのような抗体を産生するリンパ球の種類を分析しレシピエント対内に起こる免疫反応、免疫抑制剤の寄与を解析することを目指した。

3. 研究の方法

研究方法は東京女子医大泌尿器科にて 1990 年から 2006 年の間に血液型不適合移植の施行された 140 例である。特に 1990 年代に施行され拒絶反応から移植腎喪失にまで至った患者血清 28 例および生着に成功した患者血清中 87 例の抗体の解析を試みた。

拒絶反応群および非拒絶反応群に大別することによって両血清中の抗体についてまたリンパ球をフローサイトメト

リーで解析しこれらの抗体を産生するBリンパ球についても解析を行った。特にELISAを用いて抗体サブクラスについても測定法を確立した。フロー・サイトメトリーではBリンパ球のマーカーとしてCD19, CD20, CD5を用いた。3チャンネルのフローサイトメトリーを用いて各種リンパ球を解析した。ELISA法では各種の血液型抗原をELISAプレートに固相化し各患者血清及び2次抗体を専用リーダーで吸光度を読み込むことによって行った。

4. 研究成果

血液型不適合移植後に拒絶反応をおこし移植腎にまで至る患者および起こさないで成功生着に至る患者では全く異なる液性の免疫反応が起こっていることが判明した。

これにより、拒絶反応群に産生するリンパ球はCD5陰性CD19陽性である通常のBリンパ球で産生される抗体はIgG1を主体とする。一方生着した患者血清にはIgMおよびIgG2サブタイプの抗体が主体でありこれを産生するBリンパ球はCD5陽性CD19陰性の細胞であった。われわれはこの結果を昨年、今年の論文に発表し大きな反響を得られた。

臓器移植で問題になる免疫学的障害はヒトの場合は血液型抗体と抗HLA抗体である。免疫抑制剤の進歩や免疫抑制療法の発展によって血液型抗体は完全に克服できたものの抗HLA抗体の克服にはまだ乗り越えなければならない障害が多く残されている。前述のような比較的理解しやすい血液型抗原と抗体の拒絶反応時の機序の解明より最終的にはさらなる抗HLA抗体の解明へとつながることが期待される。

今後はHLA抗原と抗HLA抗体について解明を進める。HLA抗原は蛋白であり抗体との結合を調べる上で塩基配列が重要である。現在われわれはその塩基配列から作成されたCREG(交差反応)解析を基にどの程度の範囲までの抗HLA抗体がHLA抗原に反応できるのか、知り得ているが詳細に関しては未だであり、臨床の場においても予想外に激しい拒絶反応に見舞われることが少なくない。塩基配列をさらに明らかにして抗原抗体反応の結合の場である塩基相補部位(CVR)を基に反応しやすい抗原及び抗体の構造を明らかにしたい。

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 7 件)

石田英樹、田邊一成、Efficacy of dexoxyspergualine for antibody mediated rejection and proteinuria after kidney transplantation. Ther Clin Risk Manag. 4(3).641~644.2008、査読有

Li X、石田英樹、田邊一成、他4名、Poor graft outcome in recipients with de novo donor specific antibody after living related kidney transplantation. Transpl Int. 13. 432~436. 2008、査読有

石田英樹、尾本和也、田邊一成、他4名、Usefulness of splenectomy for chronic active antibody mediated rejection after renal transplantation. Transpl Int. 11, 602~604, 2008、査読有

宮本直志、石田英樹、田邊一成、他5名、Immunological status in three patients, thirty years after living related renal transplantation; antibody production in long term survivors. Transplant Immunology, 18(4), 368~372, 2008、査読有

瀬戸口誠、石田英樹、田邊一成、他6名、Analysis of renal transplant protocol biopsies in ABO-incompatible kidney transplantation. Am J Transplant. 18(4), 86~94, 2008、査読有

田中俊明、石田英樹、田邊一成、他4名、Renal transplantation after myeloablative and non-myeloablative hematopoietic cell transplantation from the same donor. Int J Urol. 14(11), 1044~1045, 2007、査読有

石田英樹、宮本直志、田邊一成、他4名、Evaluation of immunosuppressive regimens in ABO-incompatible living related kidney transplantation-single centre analysis-Am J Transplant. 7(4), 825~831, 2007、査読有

[学会発表](計 5 件)

石田英樹、サテライトシンポジウム、既存抗体陽性腎移植における新戦略、第44回日本移植学会、2008.9.19~21、大阪

石田英樹、腎移植における基本手技(レシピエント)、第96回日本泌尿器学会総会、2008.4.25~27、横浜

石田英樹、シンポジウム、リツキシマブ

の光と影、第 14 回腎移植血管外科研究会、2007.6.29～30、岩手花巻
石田英樹、シンポジウム、血液型不適合移植と抗体関連型拒絶反応対策の進歩、第 50 回日本腎臓学会、2007.5/25～27、浜松
石田英樹、シンポジウム、腎移植最近の話題、第 95 回日本泌尿器科学会総会、2007.4.14～17、神戸

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石田 英樹 (ISHIDA HIDEKI)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号 ; 60246543

(2)研究分担者

田邊 一成 (TANABE KAZUNARI)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号 ; 80188359

(3)連携研究者

なし