

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591517

研究課題名（和文）

薬力学・免疫学・分子生物学的解析を用いた免疫抑制療法の個別化

研究課題名（英文） Individualization of Immunosuppressive Therapy Using Pharmacodynamics, Immunology and Molecular Biology

研究代表者

葛谷 孝文 (KUZUYA TAKAFUMI)

名古屋大学・医学部附属病院・副部長

研究者番号：00444406

研究成果の概要（和文）：

個々の患者に対して適切な免疫抑制療法を実施するうえで多くのバイオマーカーが提案されてきた。しかし、臨床結果に繋がる有用な方法はいまだに得られていない。そこで我々ははじめにカルシニューリンインヒビターによるIL-2の阻害効果について個々の患者でIL-2のmRNAをRT-PCRによりモニターした。次に各種免疫抑制剤（シクロスポリン、タクロリムス、ミコフェノール酸、プレドニゾロン）を用い個々のT細胞の増殖抑制効果をCFSEでラベルしたフローサイトメトリー法により解析した。その結果シクロスポリンに対し感受性の高い患者ではウイルスの再活性化が起きやすいことを明らかにした。これらの結果から移植前の薬力学的解析により免疫抑制療法の適正な使用に有用な情報を提供できる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To optimize immunosuppressive treatment in individual patients, many biomarkers have been proposed, but there has been very little information about association to clinical outcome data. The most effective immunosuppressive strategies in organ transplantation are based on the inhibition of IL-2 signal by calcineurin inhibitors and we first evaluated the inhibition of IL-2 mRNA production for each patient by using RT-PCR method. Then we examined individual T-cell sensitivity to each immunosuppressive agent (cyclosporine, tacrolimus, mycophenolic acid, prednisolone) using flow cytometry with CFSE labeling. Patients with high sensitivity to cyclosporine tended to experience viral reactivation. Pretransplant pharmacodynamics could provide useful information on optimal and safe immunosuppressive therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：免疫抑制薬、薬力学、IL-2、細胞増殖抑制効果

### 1. 研究開始当初の背景

臓器移植後の患者状態は不安定であり適正な免疫抑制療法を施行しうるかどうか、移植の成否の鍵となっている。免疫機能の解明が目覚ましく進んでいる中で、種々の免疫抑制剤が開発されてきた。これらの免疫抑制剤は副作用も強力であり、治療域が狭いため、カルシニューリンインヒビター（CNI: cyclosporine, tacrolimus）では血中濃度測定により投与量を決定している。しかし、同じ濃度でも薬効の発現には個人差があること、臓器移植後の免疫抑制療法では多剤併用が一般的であり個々の薬剤濃度情報だけでは総合的な免疫抑制状態の判断が難しいことから、薬力学を用いた新たなモニタリング方法の開発が望まれている。さらに、移植後安定期には、薬剤の長期使用による副作用（腎毒性、糖尿病、悪性腫瘍など）を考慮し、ドナー特異的免疫寛容の鑑別と免疫抑制療法の安全な軽減・中止が課題となっている。このように移植医療においても、画一的な治療から個々の患者に最適の免疫抑制療法を提供する個別化医療への変革が必要とされている。

### 2. 研究の目的

(1) 移植後の免疫抑制療法にとって最も重要な薬剤であるCNIの作用点であるインターロイキン2（IL-2）の産生抑制作用に着目し、そのmRNAの産生抑制が個々でどの程度異なり、薬力学的なパラメーターとして有用であるか検討する。

(2) CNI以外の免疫抑制剤ではIL-2の

産生は抑制しない。そこで末梢血単核球を試料として免疫抑制剤によるTリンパ球の増殖抑制効果をcarboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)を用いたフローサイトメトリー法により解析した。

(3) 移植後の慢性拒絶反応では抗体型拒絶が問題になっている。そこでBリンパ球における免疫抑制剤の効果に関して検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 健常人および腎移植予定患者の全血を試料として刺激剤phorbol 12-myristate 13-acetateとcalcium ionophoreをcyclosporine (CSA ; 0,100,250,400,600,800ng/mL)とともに添加後4時間培養し、mRNAを抽出した。その後IL-2のmRNAをreal-time RT-PCR法によりβ-actinを内部標準物質として定量し、CSAの添加濃度に対するIL-2のmRNA量をプロットし、inhibitory sigmoid Emaxモデルに当てはめ各薬力学的パラメーターを算出した。各薬力学的パラメーターはIL-2 mRNAの産生を50%抑制するCSAの濃度（IC50値）およびIL-2のmRNA量を最大に抑制したときのCSAの濃度（Bottom値）とした。

(2) 腎移植患者の末梢血から末梢血単核球（PBMC）を分離し、CFSEにより染色後各種免疫抑制剤（CSA、タクロリムス;TAC、ミコフェノール酸モフェチル;MPA、プレドニゾロン;PRD）を加えた

。その後phytohemagglutinin (PHA)を加え3日間培養後フローサイトメトリーによりT-リンパ球数を測定した。

(3) 健常人より得られた末梢血からPBMCを分取し、CSAを加えCFSEにより染色後抗IgM抗体またはCD40リガンドによりB-リンパ球を刺激した。その後3日間培養後フローサイトメトリーによりB-リンパ球数を測定した。

なお、これらの研究は名古屋大学医学部倫理委員会および名古屋第二赤十字病院治験委員会の承認後行い、血液提供者には文書による同意を得た後に実施した。

#### 4. 研究成果

(1) 対象は健常人5名と免疫抑制薬服用前の腎移植予定患者22名で実施した。健常人5名から間隔を置き繰り返し4回採血して全血から得られたIL-2のmRNAをreal-time RT-PCR法により解析し、添加したCSA濃度とmRNA量をプロットしたところ各薬力学的パラメーター(IC50値、Bottom値)は良好な再現性を示し、かつ個々で特徴ある値を示した(一元配置分散分析で有意差有)。また、患者22名において同様な解析を行った結果、薬力学的パラメーターに健常人で見られたように個々で大きなバラツキが認められた。

(2) 腎移植予定患者32名のPBMCより以下の4薬剤におけるCFSEを用いたフローサイトメトリー法による薬剤感受性試験を実施した。いずれの薬剤も添加した薬剤の濃度依存的に細胞増殖の抑制が認められた。(図1)他の免疫抑制剤に比較しMPAでは濃度に対する細

胞増殖抑制効果の薬力学的な個人差が小さい傾向を示した。また、CSAのbottom値が<25%の患者群(高感受性群)では8名中5名でウイルス再活性化が認められたのに対し25%以上の患者群では10名中1名のみであった。これらの結果から移植前のフローサイトメトリー法を用いた細胞増殖抑制効果を指標としたパラメーターは免疫抑制剤による過剰に免疫を抑制する患者群を予測できる可能性が示唆された。

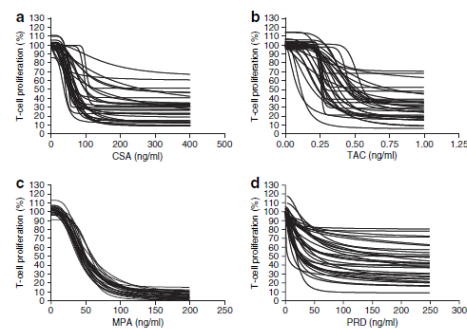


図1 PBMCに各種薬剤を添加後3日間培養しフローサイトメトリー法によりT-リンパ球の増殖抑制効果を評価した。a: cyclosporine (CSA); b: tacrolimus (TAC); c: mycophenolic acid (MPA); d: prednisolone (PRD)。

(3) Bリンパ球に対する免疫抑制剤の感受性試験では健常人において腎移植患者で用いたPBMCと同様な方法でB細胞に対する薬剤感受性を調べたところCSAではT細胞よりも低濃度で増殖抑制効果が観察できた。しかし、刺激の方法によりその抑制効果は異なり、抗IgM抗体による刺激に対しては十分な抑制効果を発揮したがCD40リガンドを用いた刺激に対しては十分な増殖抑制効果は得られなかった。

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 6 件)

① Takafumi Kuzuya, Takaaki Kobayashi, Akio Katayama, Takaharu Nagasaka, Yuko Miwa, Kazuharu Uchida, Akimasa Nalao, Evaluation of IL-2 mRNA in Whole Blood as a Parameter for Monitoring Cyclosporine Pharmacodynamics, Biological Pharmaceutical Bulletin, 査読有、32、2009、604-608

② Misao Niwa, Yuko Miwa, Takafumi Kuzuya, Kenta Iwasaki, Masataka Haneda, Tsuneo Ueki, Akio Katayama, Takahisa Hiramitsu, Norihiko Goto, Takaharu Nagasaka, Yoshihiko Watarai, Kazuharu Uchida, Akimasa Nakao, Takaaki Kobayashi, Stimulation Index for PCNA mRNA in Peripheral Blood as Immune Function Monitoring after Renal Transplantation, Transplantation, 査読有、87、2009、1411-1414

③ Yoko Kurata, Marina Kato, Takafumi Kuzuya, Yuko Miwa, Kenta Iwasaki, Masataka Haneda, Katsuo Amioka, Yoshihiko Watarai, Kazuharu Uchida, Akimasa Nakao, Takaaki Kobayashi, Pretransplant Pharmacodynamic Analysis of Immunosuppressive Agents using CFSE-based T Cell Proliferation Assay, Clinical Pharmacology & Therapeutics, 査読有、86、2009、285-289

④ 水谷加代子、葛谷孝文、加藤真梨奈、倉田洋子、岩崎研太、野田幸裕、網岡克雄、山田清文、小林孝彰、Pharmacodynamics を用いた代謝拮抗薬およびmTOR 阻害薬の薬効評価、愛知県病院薬剤師会雑誌、査読有、36、2009、

2-7

⑤ 葛谷孝文、加藤真梨奈、倉田洋子、片山昭男、打田和治、丹羽操、三輪祐子、岩崎研太、羽根田正隆、小林孝彰、腎移植後の免疫抑制療法の個別化、Organ Biology、査読無、16、2009、5-11

⑥ 倉田洋子、網岡克雄、加藤真梨奈、野田幸裕、葛谷孝文、羽根田正隆、長坂隆治、打田和治、中尾昭公、岩崎研太、小林孝彰、免疫抑制薬の分子論的解析と臨床応用可能な PD モニタリングの開発、今日の移植、査読無、21、2008、602-604

[学会発表] (計 15 件)

① 平林彩、岩崎研太、加藤真梨奈、葛谷孝文、野田幸裕、三輪祐子、羽根田正隆、小林孝彰、日本移植学会総会、2010年10月21日-22日、京都

② Kuzuya T., Kato M., Iwasaki K., Haneda M., Miwa Y., Kobayashi T., Uchida K., Yamada K, Pharmacodynamic Evaluation of Cyclosporine in B-Cell, International Congress of The Transplantation Society、2010年8月15日-19日、Vancouver (Canada)

③ 加藤真梨奈、倉田洋子、葛谷孝文、羽根田正隆、岩崎研太、野田幸裕、小林孝彰、B細胞を用いた免疫抑制剤の薬力学的解析：シクロスポリンはB細胞を抑制するか？、日本移植学会総会、2009年9月16日-18日、東京

④ 丹羽操、馬亮、三輪祐子、岩崎研太、羽根田正隆、渡井至彦、打田和治、片山昭男、小林孝彰、細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現レベルによる腎移植後の免疫抑制状態の評価、日本移植学会総会、2009年9月16日-18日、東京

⑤ 加藤真梨奈、倉田洋子、葛谷孝文、羽

根田正隆、岩崎研太、小林孝彰、野田幸裕、リンパ球を用いた免疫抑制薬のPD解析方法の確立、日本薬学東海支部大会、2009年7月11日、名古屋

⑥ 倉田洋子、加藤真梨奈、葛谷孝文、岩崎研太、羽根田正隆、打田和治、中尾昭公、小林孝彰、網岡克雄、免疫抑制療法におけるT cell proliferationを指標としたPD assayの有用性、日本薬学会第129年会、2009年3月26日-28日、京都

⑦ 葛谷孝文、加藤真梨奈、倉田洋子、片山昭男、打田和治、丹羽操、三輪祐子、岩崎研太、羽根田正隆、小林孝彰、腎移植患者を対象とした免疫抑制薬の薬力学的解析、日本臨床腎移植学会、2009年1月28日-30日、千葉

⑧ 小林孝彰、丹羽操、馬亮、三輪祐子、岩崎研太、中尾昭公、羽根田正隆、葛谷孝文、植木常雄、片山昭男、平光高久、佐藤哲彦、後藤憲彦、長坂隆治、渡井至彦、打田和治、移植後の免疫機能モニタリング、日本臨床腎移植学会、2009年1月28日-30日、千葉

⑨ 葛谷孝文、加藤真梨奈、倉田洋子、片山昭男、打田和治、丹羽操、三輪祐子、岩崎研太、羽根田正隆、小林孝彰、腎移植後の免疫抑制療法個別化プロジェクト、日本臓器保存生物医学学会、2008年11月22日-23日、東京

⑩ 倉田洋子、加藤真梨奈、葛谷孝文、中尾昭公、打田和治、小林孝彰、網岡克雄、Cell proliferationを指標としたPD assayの開発、日本移植学会総会、2008年9月19日-21日、大阪

⑪ 加藤真梨奈、倉田洋子、葛谷孝文、打田和治、野田幸裕、小林孝彰、免疫抑制薬の薬力学的モニタリングの開発とその有用性の検討、日本移植学会総会、2

008年9月19日-21日、大阪

⑫ 丹羽操、馬亮、三輪祐子、岩崎研太、片山昭男、打田和治、中尾昭公、小林孝彰、PCNA mRNAを指標とした免疫機能モニタリングによる腎移植後の過剰免疫抑制の判定、日本移植学会総会、2008年9月19日-21日、大阪

⑬ 水谷加代子、倉田洋子、加藤真梨奈、葛谷孝文、野田幸裕、小林孝彰、Pharmacodynamics (PD) を用いた代謝拮抗薬の薬効評価と個人差の解析、日本移植学会総会、2008年9月19日-21日、大阪

⑭ Kuzuya T.、Kobayashi A.、Katayama Y.、Miwa T.、Nagasaka K.、Uchida K.、Yamada K.、Pharmacodynamic Characteristics of Renal Transplant Resipients, International Congress Transplantation of The Society、2008年8月10日-14日、Sydney (Australia)

⑮ Kobayashi T.、Niwa M.、Miwa Y.、Katayama A.、Haneda M.、Kuzuya T.、Nagasaka T.、Ueki T.、Uchida K.、Nakao A.、Stimulation Index for PCNA mRNA Expression in Peripheral Blood as a Predictive Indicator of Over Immunosuppression, International Congress Transplantation of The Society、2008年8月10日-14日、Sydney (Australia)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/tx-immunology/TOP.html/TOP.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

葛谷 孝文 (KUZUYA TAKAFUMI)  
名古屋大学・医学部附属病院・副部長  
研究者番号：00444406

### (2) 研究分担者

小林 孝彰 (KOBAYASHI TAKAAKI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：70314010  
羽根田 正隆 (HANEDA MASATAKA)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：50436995  
小寺 泰弘 (KODERA YASUHIRO)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：10345879  
岩崎 研太 (IWASAKI KENTA)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：10508881

### (3) 連携研究者

なし