

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09573

研究課題名(和文) ABO血液型不適合腎移植における免疫学的順応と制御性T/B細胞・共刺激分子

研究課題名(英文) Immunological accommodation, Treg/Breg and co-stimulatory signal in ABO-incompatible kidney transplantation

研究代表者

齋藤 和英 (Saito, Kazuhide)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：20262438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ球をIn VitroでT cellはConA/LPS、B cellはCpG培地で3日間刺激培養・解析した。健康者CD3(+)T cell PD-1は57.27%、PD-L1 39.31%と増加したが、PD-L2 0.68%であった。CD19(+)B cell PD-1は10.60%、PD-L1は68.01%、PD-L2は7.9%と増加した。拒絶反応患者のリンパ球ではCD3(+)T cell PD-1 47.27%、PD-L1 68.81%、PD-L2 53.22%と増加、CD19(+)B cell PD-1 20.20%、PD-L1 48.64%、PD-L2 15.9%と増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ABO血液型不適合腎移植においては術前脱感作療法を適切に行うことで抗体関連型拒絶反応を回避し、抗血液型抗体価が低値のまま安定し拒絶反応が起こらない免疫学的順応が誘導される。本研究では患者リンパ球培養系においてはT cell、B cellともにPD-1、PD-L1、PD-L2などの共刺激分子が健康対照に比して増加傾向にある可能性を示唆する結果が示された。機器故障により十分な検体数を持ってその確実性を証明することなく研究は終了せざるを得なかったが、ABO不適合移植の免疫学的順応に共刺激分子が関与している可能性を示唆する最初の結果であり今後の研究進展に資する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We intended to confirm the role and of co-stimulatory signal in immunological accommodation induction in ABO-incompatible kidney transplantation. We extracted and cultured T/B cells from healthy volunteer and kidney transplant recipients. In healthy control, PD-1 and PD-L1 on CD3(+) T cells increased up to 57.27%, 39.31%, respectively, however PD-L2 was 0.68%. PD-1 and PD-L1 on CD19(+) B cell increased up to 10.60% and 68.01%, respectively, and PD-L2 also increased to 7.9%.

On the other hand, in ABO-incompatible kidney transplant recipients who experienced graft rejection, PD-1, PD-L1 and PD-L2 on CD3(+) T cells increased up to 47.27%, 68.81% and 53.22%, respectively, PD-1, PD-L1 and PD-L2 on CD19(+) B cells increased up to 20.20%, 48.64% and 15.9%, respectively.

研究分野：腎移植学

キーワード：ABO血液型不適合腎移植 免疫学的順応 共刺激分子

## 1. 研究開始当初の背景

われわれは「免疫学的禁忌」であった「ABO 血液型不適合腎移植」を初めて実施し、その成績を「標準治療」にまで押し上げる「脱感作療法」を開発・導入し全国に普及させた。

さらに、その成功の鍵を握る「免疫学的順応」成立・維持機構の解明に心血を注いできた。近年の免疫学の進歩により、共刺激分子応答の制御が悪性腫瘍に対する宿主免疫からの攻撃回避に関与していることが明らかになり、この制御を解除する PD-L1 抗体による治療法や、制御性 T 細胞、制御性 B 細胞による治療が脚光を浴びている。

移植免疫と腫瘍免疫・感染免疫は表裏一体の関係にあり、ABO 血液型不適合腎移植の免疫学的順応誘導機構に制御性 T/B 細胞や共刺激分子が関与していることを想定し、今回の研究を着想した。移植免疫領域においては共刺激阻害により免疫寛容を誘導する試みが以前から行われてきた。齧歯類における CTLA-4Ig、B7/B86 による免疫寛容誘導モデルは多数開発されたが、大動物での免疫寛容誘導は困難であり、実用化に至っていない。ヒトの実臨床においては CTLA-4Ig 製剤である Belatacept が実用化（海外でのみ承認）されているが、その効果は限定的であり、免疫抑制薬カルシニューリン阻害薬の減量・節約効果が確認されているに過ぎない。

臓器移植領域において共刺激分子の中でも PD-L1、PD-1 に着目した研究はまだ極めて少なく、数篇のみであるが、PD-L1 を発現する細胞が多数存在していると、移植臓器に T リンパ球浸潤が見られても拒絶反応が起こらないことが報告され、さらに制御性 T/B 細胞の役割にも注目が集まっている。

一方、ABO 血液型不適合腎移植の免疫学的順応の誘導・維持機構における共刺激分子の役割に関する検討報告はない。また、血液型糖鎖抗原に対する B 細胞性免疫応答抑制では B1a 細胞の関与が報告されているが、形質細胞への分化増殖に T 細胞が関与しているかは未だ不明である。T reg、B reg、共刺激分子の関与を包括的に検討した研究は内外ともに皆無であり、学術的にも極めて大きな課題への挑戦的研究として価値があると考え研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究においては、ABO 血液型不適合腎移植における「免疫学的順応」の成立・維持機構に制御性 T 細胞・B 細胞と共刺激分子応答機構が関与している可能性について検討し解明に近づくことを目的とする。

## 3. 研究の方法

ABO 血液型不適合腎移植の移植腎浸潤細胞における共刺激分子の発現状態の免疫組織学的検討（齋藤和英）

目的：ABO 不適合腎移植の腎生検組織浸潤リンパ球と共刺激分子を解析する。

対象：新潟大学医歯学総合病院泌尿器科において ABO 血液型不適合腎移植を受けた患者 84 名。

方法：当科で ABO 血液型不適合腎移植を受けた患者の 0 時間、1 時間、1 ヶ月の各ポイントで行われたプロトコール腎生検ならびに急性拒絶反応などの臨床的イベント発症時に行われた腎生検標本における浸潤細胞を免疫染色する。

Effector T 細胞 marker として CD3、CD4、CD8、CTLA4、CD28、PD-1、制御性 T 細胞 marker として CD25、Foxp3、macrophage marker として PD-L1、CD86、SLAMF8、ADAMDEC1、B 細胞 marker として CD5、CD19、CD20、CD72、BTLA を、さらに制御性 B 細胞 marker としては CD5+CD1dhi B cells and T-cell Ig and mucin domain protein 1 (TIM-1+) + IL-10 産生能を指標として免疫染色

しその発現と局在を検討する。これらの生検標本では既に通常の移植腎生検で行う光学顕微鏡標本（HE、PAS、PAM）、蛍光抗体による免疫染色法（IgA、IgM、IgG、C3c、C4d、Fbg）、必要に応じて電子顕微鏡標本を作成、評価しており、移植腎病理診断基準である Banff 分類に従って診断を行い、上記との関連を検討する。

ABO血液型不適合腎移植後抗ドナー血液型特異的抗体産生抑制と共刺激分子との関連ならびに制御性T/B細胞の関与に関する検討（田崎正行）

目的：ABO 血液型不適合腎移植後の抗ドナー血液型特異的抗体産生抑制状態に及ぼす共刺激分子の関与、さらに制御性 T/B 細胞の関与の有無を明らかにする。

対象：新潟大学医歯学総合病院泌尿器科で ABO 血液型不適合腎移植後、安定生着している患者ならびに血液型一致移植後安定生着している患者。

コントロールとして各血液型の成人ボランティア数名。

方法：われわれは、PBMC（末梢血単核球）培養系を用いて、ABO 血液型不適合腎移植後安定期の患者でドナー血液型に対する抗体産生が特異的に抑制されている状態を見いだした。

本研究ではわれわれが確立した培養系を用いて、T 細胞、B 細胞サブセット・共刺激分子発現と抗体産生抑制について検討する。

既にわれわれは安定生着している ABO 血液型不適合腎移植後患者においては、ドナー血液型に対する抗体産生が特異的に抑制されていることを確認しているが、この抗体産生抑制にどのような細胞が関与しているかについては未知である。

本研究においては、この培養系を用い、リンパ球サブセットを詳細に解析することにより、その解明を目指す。

(1) In vitro における抗血液型抗体産生定量モデルにおけるリンパ球サブセットの解析  
患者並びにコントロールから末梢血を採血し 1 well  $5 \times 10^5$  個の細胞を 2.5% ヒト AB 型血清、CpG oligonucleotide 2006、r IL2 (2ng/ml)、r IL15 (50ng/ml) を加えた AIM-V medium で培養し、抗血液型抗体の産生を ELISA 法にて、細胞のサブセット解析をフローサイトメトリー法を用いて解析する。

フローサイトメトリーでは、CD3、CD4、CD8 を T 細胞 marker とし、CD19、CD20、を B 細胞 marker、CD38、CD138 を形質細胞 marker とする。さらに PD-1、PD-2、PD-L1、PD-L2、CTLA4 を共刺激因子 marker として、CD25、Fox3 を制御性 T 細胞 marker、IL-10、CD5 CD1dhi、T-cell Ig and mucin domain protein 1 (TIM-1) に IL-10 産生能を制御性 B 細胞 marker として、ドナー血液型特異的抗体産生抑制系における T-cell、B-cell サブセットとその役割を解析する。

(2) 特異的抗体産生抑制に関与する可能性がある細胞集団の同定とその解析

本培養系において患者群でコントロール群と比して特異的な細胞集団の存在が検出されれば、その役割をさらに解析するために Cell sorter を用いてこれらの細胞を分離し、Transfer 実験により抗体産生抑制効果の増強あるいは減弱を確認し役割を明確化することも検討する。

#### 4. 研究成果

(1) In vitro における抗血液型抗体産生定量モデルにおけるリンパ球サブセットの解析

健常者の全血 5ml を採取、抗体マーカーは T cell : CD3、CD4、CD8、B cell : CD19 を用い、T cell/B cell 上の PD-1、PD-L1、PD-L2 を Whole blood FACS にて解析した。

PD-1 は CD3 陽性 T cell の 5.89% に、CD19 陽性 B cell の 2.82% に発現、していたが、PD-L1、PD-L2 はどちらの細胞にもほとんど発現していなかった。

以上より、健常者・定常状態の T/B リンパ球には PD-1 は数%発現しているが、PD-L1/L2 は発現していないことが判明した。一方、腎移植患者では、ドナー腎からの抗原刺激が加わり、免疫抑制薬も投与されているので末梢血全血での解析は不適と判断、採取リンパ球を In Vitro で刺激して解析を行うことにした。

T cell は培地として AIMV、ConA もしくは LPS、FCS を用いて刺激、B cell は AIMV、IL-2、IL-10、IL-15、FCS、CpG 培地で刺激、3 日間培養したのち FACS 解析を行った。

健常者検体では、CD3 陽性 T cell 上の PD-1 は 57.27%と培養前と比較し増加した。PD-L1 も同様に培養前と比較し 39.31%と増加したが、PD-L2 は刺激培養しても 0.68%とほとんど増加がみられなかった。CD19 陽性 B cell 上の PD-1 は 10.60%と培養前よりも増加した。PD-L1 は 68.01%、PD-L2 は 7.9%とともに増加した。

次に、拒絶反応を起こした患者のリンパ球を同様の方法で刺激培養した。

CD3 陽性 T cell 上の PD-1 は 47.27%と培養前と比較し増加した。PD-L1 も同様に培養前と比較し 68.81%と増加、PD-L2 は培養前と比較し 53.22%と大きく増加した。

CD19 陽性 B cell 上の PD-1 は 20.20%と培養前よりも増加した。PD-L1 は 48.64%、PD-L2 は 15.9%と増加していた。

上記より解析検体数を増やし、健常者と移植患者における比較検討を計画していたが、ここで大きな問題が発生した。当研究室で以前から保有し本研究を実施・遂行する大前提となっていたフローサイトメーターの故障が頻回に発生した。その都度、相当な時間並びに費用をかけて専門業者における修繕とメンテナンスを実施したが、短期間で故障を繰り返してしまい、研究の遂行が何度も中断した。その対応のため、研究期限を 1 年間延長申請したが、最終的に機器修繕が不可能（部品供給不可、代替機器新規購入が必須）な状況であることが研究最終年度に判明した。新規にフローサイトメーターを購入するためには別途 1000 万円規模の購入予算が必要となり、本研究費では賄えないことが明らかとなった。現在当研究室において新規にフローサイトメーターを新調・購入する予算の目処が全く立っていないことから、非常に残念ながら本研究の継続は困難であると判断せざるを得ず、上記の Preliminary な結果を持って本研究は終了となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Masayuki Tasaki, Hiroaki Tateno, Takashi Sato, Hisashi Narimatsu, Kazuhide Saito, Yuki Nakagawa, Toshinari Aoki, Masami Kamimura, Takashi Ushiki, Kota Takahashi, Yoshihiko Tomita	4. 巻 27
2. 論文標題 Hypersensitiveness against donor's ABO antigens of renal grafts after ABO-incompatible kidney transplantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 89-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-022-02280-3	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 Masayuki Tasaki, Hiroaki Tateno, Takashi Sato, Azusa Tomioka, Hiroyuki Kaji, Hisashi Narimatsu, Kazuhide Saito, Yuki Nakagawa, Toshinari Aoki, Masami Kamimura, Takashi Ushiki, Manabu Okada, Yuko Miwa, Kiyohiko Hotta, Yutaka Yoshida, Kota Takahashi and Yoshihiko Tomita	4. 巻 35
2. 論文標題 A Novel Method of CD31-Combined ABO Carbohydrate Antigen Microarray Predicts Acute Antibody-Mediated Rejection in ABO-Incompatible Kidney Transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplantation International	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/ti.2022.10248	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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	田崎 正行  (TASAKI Masayuki)  (40571906)	新潟大学・医歯学総合病院・助教   (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------