

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17564

研究課題名(和文)免疫チェックポイント蛋白に着目した腎移植における新規免疫抑制療法の提案

研究課題名(英文) New immunosuppressive strategy focused on check point protein in kidney transplantation

研究代表者

富田 祐介 (TOMITA, YUSUKE)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：50622263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：TregsやPD1の発現が、腎移植後の長期生着に関わるとされる抗ドナー特異的抗体の新規形成(dnDSA形成)の関連因子となりうるのかについて検討した。dnDSA陽性群でTregsの発現は低値であり、その中でも特に活性型のactivated Tregsの発現頻度が有意に低く、強い関連性が示された。また、免疫抑制療法の違いによりTregsやPD1の発現が異なるのかについて検討した。エベロリムス(EVR)使用群と非使用群における末梢血リンパ球の解析では、全Tregsは変化がなかったものの、aTregsの割合は使用群で有意に高値であり、EVR併用療法は移植腎保護に有利である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植医療は末期臓器不全を根治するための唯一の治療法である。一方で、免疫抑制剤の持続的な使用については、拒絶反応を予防するためには必要不可欠であるものの、重症感染症を発症したり、移植臓器に毒性を起したりすることが知られており、長期的な生着率に影響を与えている。マウスと同様にヒトにおいてもTregsやPD1はドナー抗原に特異的な免疫抑制反応に関与していた。また、免疫抑制プロトコールによりその発現が異なることを示せたことは、移植患者にとって貢献度の高い研究成果であると考えられる。今後は、本研究で得られた結果に基づき、横断的な解析に発展させ応用を測る。

研究成果の概要(英文)：We investigated the clinical association of Treg cell and PD1+ cell subsets in kidney transplant recipients (KTRs). We confirmed that PD1+ cells in CD4+ T, CD8+ T cells, and B cells had a similar baseline in PBMCs from KTRs and healthy volunteers. Next, we analyzed whether Tregs and PD1+ cells correlate with dnDSA formation. Compared to dnDSA negative patients, the frequency of Tregs, as well as the dominant population CD45RA- activated Tregs (aTregs), were significantly lower in dnDSA positive patients. Finally, we evaluate the effect of mTOR inhibitors on aTregs and PD1+ cells in KTRs. aTreg cell frequency was associated with EVR administration. These results suggest that mTOR inhibitor benefits long-term kidney graft function and aTreg expansion in KTRs.

研究分野：腎移植、移植免疫

キーワード：腎移植 制御性T細胞 活動性制御性T細胞 免疫チェックポイント蛋白 免疫寛容

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 臓器移植は、末期臓器不全の患者にとって唯一の根治的治療法である。免疫抑制剤の永続的な服用は臓器を拒絶反応から守るために必須であるが、移植した腎臓に有害であり、20年以上の長期生着率に影響を及ぼしているのが現状である。

(2) 近年、手術前後に短期的、集中的な導入治療を加えることで、免疫抑制剤を漸減、中止する免疫寛容プロトコールが米国で試みられており、成果を上げている。

2. 研究の目的

(1) ヒトの腎移植において制御性T細胞(Tregs)、制御性サイトカイン、免疫チェックポイント蛋白(PD1)の発現や動態の意義を解明し、これらが長期的な移植腎機能の保護に影響するのかについて調べる。

(2) これらの結果から臨床的に長期的な移植腎保護を目指すための新たな免疫抑制プロトコールを提唱する。

3. 研究の方法

(1) ヒトTregs、PD1の特性を解析し、マウスとの相違を明らかにする。

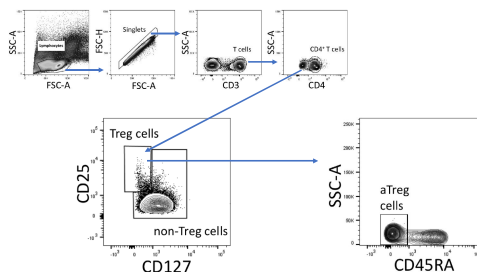
全血の採血を行い、末梢血単核球および血清を分離する。移植後のレシピエントから採取するとともに、コントロールとして健常人、ドナーからも採取を行う。分離し保存した末梢血単核球を用いて、フローサイトメトリーで解析する。マウスでの予備実験により、Tregs、PD1の発現は認められたが、ヒトでも同様なのか否かについて健常人の末梢血単核球を用いて明らかにする。また、これらの発現の程度が健常人、腎移植後のレシピエントで異なるのかについて調べる。

(2) ヒトTregs、PD1の発現や動態が移植腎機能の保護に影響するのかについて明らかにする。

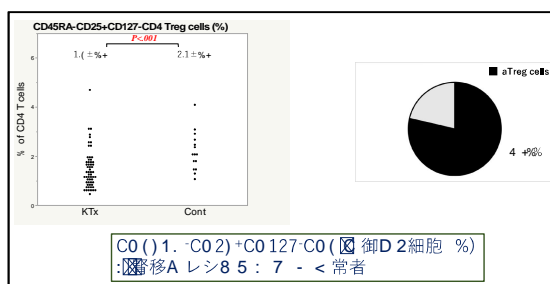
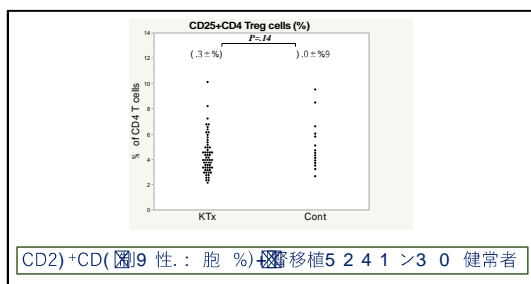
マウスの心移植モデルを用いた予備実験により、免疫寛容を導入したレシピエントにおいてTregs、PD1の発現が高いという結果を得た。そこで、ヒトの腎移植において、免疫抑制療法の違いにより末梢血単核球中のTregs、PD1の発現頻度に差があるのかについて調べる。また、TregsとPD1の動態と移植腎機能(クレアチニン・糸球体濾過量)、拒絶反応やその他の因子の関連性について調べる。

4. 研究成果

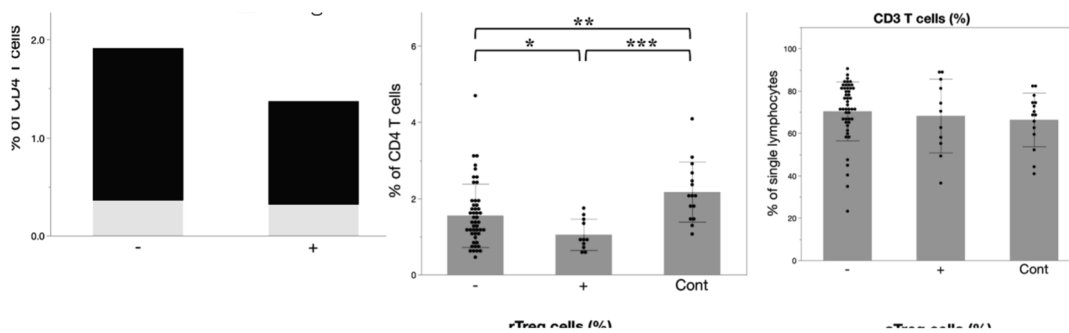
(1) 末梢血中に存在する活動性のある activated Tregs(CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T細胞)を同定するために、フローサイトメトリーのゲーティングは右図のように行った。全CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T細胞、PD1<sup>+</sup>細胞は腎移植レシピエント(KTx)群と健常人(Cont)群で差は認めなかった。



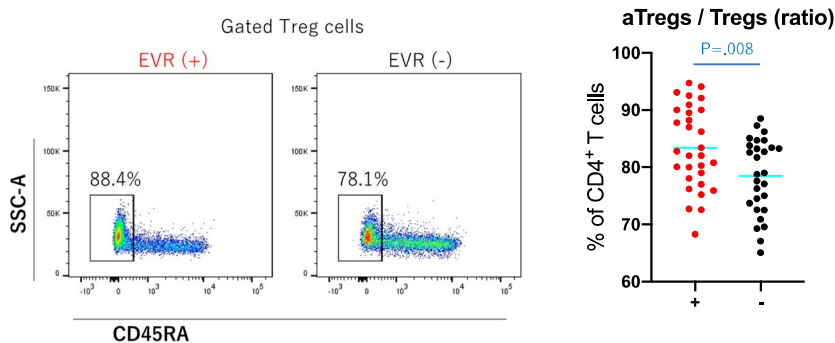
(2) 全Tregs(CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T細胞)は両群で差を認めなかったが(左図)、activated Tregs(aTregs)は腎移植レシピエントで有意に低値であった (P<0.001)。また、aTregsは全Tregsの約8割を占めていた(右図)。



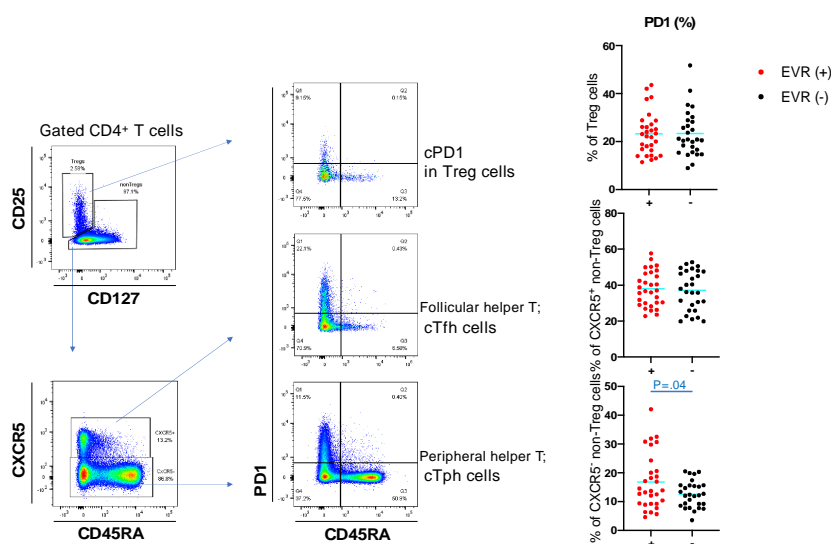
(3) de novoのドナー特異的抗体(donor-specific antibody; dnDSA)の形成は、拒絶反応や長期的な腎機能に影響を与える因子として報告されている<sup>2</sup>。そこで、腎移植レシピエント群をdnDSA陽性群(+)と陰性群(-)に分けてTregs、aTregsの発現率の検討を進めた。CD4<sup>+</sup> T細胞は両群で差を認めなかった。全Tregs(左図)およびaTregs(中央図)の発現率はdnDSA陽性群で有意に低値であった。よって、TregsとaTregsの発現率の高さはdnDSA形成を抑制する因子である可能性が示唆された。さらに、Tregsの発現率とdnDSA MFI値の間には負の関係があることが示された(右図) (\*P < .05, \*\*P < .01, \*\*\*P < .001)。



(4) 腎移植レシピエントに行っている維持免疫抑制剤の種類の違いにより Tregs, aTregs の発現が異なるのかについて検討した。mTOR 阻害薬は、in-vitro で Tregs を導入することが報告されている<sup>3</sup>。そこで、mTOR 阻害薬であるエベロリムスを使用している群(EVR+)と使用していない群(EVR-)で比較した。全 Tregs は両群で差は認めなかったが、aTregs の発現率は EVR+群で有意に高い結果であった (P=0.008)。



PD1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T細胞についても検討を行った。全 PD1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T細胞の発現に差は認めなかった。そこで、Tregs および non-Tregs 中の PD1<sup>+</sup>細胞サブセットについて解析を進めた。Tregs 中の PD1<sup>+</sup>細胞、non-Tregs 中の濾胞性ヘルパーT細胞の発現は同等であった(上図、中央図)。しかし、non-Tregs 中の末梢性ヘルパーT細胞(下図)の発現率は EVR+群で有意に上昇していた (P=0.04)。以上の結果から、EVR を使用することで aTregs を導入し、移植腎予後を延長できる可能性が示された。



## 5. 参考文献

- 1) Kawai T et al, Immune Tolerance N. HLA- mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. N Engl J Med (2013) 368:1850-2.
- 2) Wiebe C et al. Rates and determinants of progression to graft failure in kidney allograft recipients with de novo donor-specific antibody. Am J Transplant. 2015; 15(11):2921-30.
- 3) Sabbatini M et al. Oscillatory mTOR inhibition and Treg increase in kidney transplantation. Clin Exp Immunol 2015;182:230-40.

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 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomita Y, Ishida H, Uehara S, Takiguchi S, Sato T, Nakamura M	4. 巻 97
2. 論文標題 CD45RA - CD25 high CD127 - CD4 + activated regulatory T cells are correlated with de novo donor-specific anti-HLA antibody formation after kidney transplantation in standard immunosuppression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Immunopharmacol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.intimp.2021.107661	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 該当する

1. 著者名 富田祐介、中村道郎	4. 巻 37 (4)
2. 論文標題 腎移植レシピエントに対する副甲状腺機能亢進症の 手術適応と課題	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 内分泌外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 242-246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------