

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：33920

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22965

研究課題名（和文）難治性拒絶反応克服のための抗原制御の試みと誘導性HLAに対する免疫応答の解明

研究課題名（英文）Regulation of HLA expression on grafts to control refractory antibody-mediated rejection and elucidation of immune response to inducible HLA

研究代表者

前仲 亮宏（Maenaka, Akihiro）

愛知医科大学・その他部局等・薬剤師

研究者番号：80886193

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：現在の臓器移植は良好な短期成績の一方で、慢性期では移植臓器のHLAというタンパク質、特にHLA-class IIに対する抗体が移植後、新規に産生された際には予後不良となることが多く、克服すべき課題となっている。

本期間内では、臨床で使用されている既存の薬剤の中から、炎症状態の移植臓器を想定した内皮細胞上のHLA-class IIの発現量を減少させるものを2種類同定した。またHLAの調節に関わる可能性のあるタンパク質を見出した。加えて、細胞障害性T細胞が関わる拒絶反応に進展する可能性のある反応を抑え得る結果を得た。それらの効果が、移植後の薬剤選択の基準となる研究へと繋がっていくことを期待する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、内皮細胞におけるMHC(HLA)-class IIの発現・分解メカニズムの知見は乏しい。また、移植後新規に発生した抗体による拒絶反応(ABMR)に対する既存の治療は、主にレシピエント免疫系を標的とした中で、その効果は限定的なものに留まっている。本研究成果は、ドナー抗原であるHLA-DRの発現量の減少という新たなアプローチによるABMR制御だけでなく、細胞障害性T細胞が引き起こす拒絶反応(TCMR)、またHLA-class IIの発現に関わる可能性のあるタンパク質を見出した。これらの結果は、DSA産生時の検査・薬剤選択だけでなく、内皮細胞のHLAに知見を広げることにつながると考えている。

研究成果の概要（英文）：While current organ transplantation has good short-term results, in the chronic phase, de novo donor specific HLA antibody(de novo DSA), especially against HLA-class II, resulting in a poor prognosis and that is a challenge to be overcome. Within this research period, we identified two existing drugs in clinical use that reduce the expression of HLA-class II on endothelial cells that assuming in an inflammatory state. We also found proteins that may be involved in HLA regulation. In addition, they found that one drug suppressed reactions that could progress to rejection involving cytotoxic T cells(CD8 T cells). We hope that these effects will lead to research that will serve as a basis for drug selection after transplantation.

研究分野：臓器移植

キーワード：臓器移植 拒絶反応 HLA 免疫抑制剤

1. 研究開始当初の背景

近年の臓器移植は、移植前の抗体検査法の進歩や、脱感作療法、また良質な免疫抑制剤を背景に良好な短期成績が得られてきているが、長期生着に関しては課題として残されている。その主たる原因の一つは、ドナー特異的 HLA 抗体(Donor Specific HLA Antibody; DSA)の内皮細胞障害によって引き起こされる、抗体関連型拒絶反応(Antibody-Mediated Rejection; ABMR)である。特に移植後新規に産生されるドナーHLA-class II に対する de novo DSA による ABMR は度々治療困難となり、移植臓器の廃絶を招く。臓器移植において、ドナーの HLA を取り込んだ自己の抗原提示細胞による CD4 T 細胞の活性化は、B 細胞の分化を活性化し、de novo DSA 産生に寄与すると考えられている。腎移植後に産生される de novo DSA の中でも、HLA-class II DR(HLA-DR)に対する抗体は、慢性期の ABMR と深く関連する。現在、de novo DSA の治療として、免疫抑制剤の強化・Rituximab(抗 CD20 抗体)/Bortezomib(proteasome inhibitor)等の B 細胞標的治療・抗体除去療法が行われるが、長期生着が向上した明確な報告はない。ABMR はドナー抗原とレシピエント抗体との抗原抗体反応である。しかし、現在開発されている治療はレシピエント側(抗体)の処置であり、ドナー側(抗原)に着目したものはほとんどない。

2. 研究の目的

申請者は、抗原量の減少や抗原提示能の減弱は拒絶反応克服の一助となるはずであると考えた。一般的に内皮細胞上の HLA-class II 発現は、定常状態でほぼ発現しておらず、炎症状態で誘導される。本研究では、誘導性 HLA-DR の発現抑制に加え、内皮細胞 HLA 応答性 T 細胞応答制御によるグラフト障害を軽減するための基盤研究を行う。臨床で使用されている薬剤を中心に、HLA 発現への影響とそのメカニズム解明を目指すとともに、ヒト末梢血リンパ球への薬効を解析することで、DSA 産生時の検査・薬剤選択に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

HLA の発現を抑制する薬剤探索およびメカニズムの検討では、各スクリーニング対象の薬剤存在下、IFN を投与し、HLA-class II のタンパク発現を Flow cytometry(FCM)にて測定した。スクリーニングの対象薬剤は、既存の臨床で用いられている医薬品とした。さらに実験の中で関連するタンパク質は CRISPR-Cas9 を用いたノックアウトを行った。

また、比重遠心法で採取したヒト末梢血リンパ球と、ヒト内皮細胞株を用いた混合培養系にて、内皮細胞上 HLA とヒト末梢血リンパ球の免疫応答について検討した。CFSE で染色したヒト末梢血リンパ球と、HLA-class II 発現内皮細胞を共培養し、その増殖を FCM で解析した。共培養の際のサブセット解析にはそれぞれの表面抗原を基に細胞を回収し解析に用いた。

4. 研究成果

拒絶反応はグラフト内皮細胞上のドナー抗原に対するレシピエント免疫系の反応である。既存の治療は主にレシピエント免疫系が標的であるが、本研究はグラフト内皮細胞上のドナー抗原(HLA-class II)を対象としている。これは HLA の発現抑制というアプローチによる de novo DSA 産生後の ABMR 制御だけでなく、T 細胞応答が引き起こす拒絶反応、あるいは de novo DSA の発生自体をも抑制できる可能性をも想定した。

通常、内皮細胞は IFN の刺激で、まず CIITA(Class II Transactivator)が発現上昇し、HLA-DR の転写を促進、さらに翻訳後修飾を受けて細胞膜上に発現するが、FLU は HLA-DR の mRNA を抑制する一方で、EVR はどちらの mRNA も抑制しないことから、FLU は転写に、EVR は翻訳後修飾に作用して HLA-DR の発現量を減少させると示唆している。他にも高血圧、糖尿病、心不全などの治療薬を幅広くスクリーニングしたが、同様の効果を示す薬剤は発見されず、EVR と FLU が候補薬剤となった。誘導性 HLA-class II は発現を制御できる可能性を示した。スタチンには FLU 以外にも数種類の薬剤が存在しているが、臨床においてはカルシニューリン阻害剤と併用禁忌のものは対象とせず、また併用可能な薬剤においては今後も検討が必要である。

また、HLA-class II の翻訳後修飾を担うと言われるタンパク質の一つに CD63 がある。今回、EVR により内皮細胞上の CD63 の発現量が減少した。そこで CD63 をノックアウトすると、逆に HLA-DR の発現量が増加した。これは「CD63 の発現量の減少が HLA-DR の発現量を減少させた」という仮説とは真逆の結果であるが、CD63 が HLA-class II の発現に重要な影響を与える可能性を見出した。抗原提示細胞において、細胞膜上に発現した HLA-class II は、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれて再利用される一方で、一部はエクソソームの表面タンパク質として細

胞外へ放出される。さらに CD63 はエクソソームの検出マーカーとしても知られるほど、エクソソームに高発現のタンパク質である。これらのことから、現段階では CD63 は HLA-class II の翻訳後修飾や、あるいはエクソソームとして HLA-class II を細胞外への放出制御を担うタンパク質として重要な位置付けに関連するタンパク質であると考えている。

一方、EVR 存在下で培養した内皮細胞が、T 細胞の応答に影響を与えるかの検討も行った。すると、その内皮細胞と PBMC を混合培養することで、内皮細胞の HLA-class I の発現量は低下なく、CD8 T 細胞の応答が抑制されるという結果を得た。これは EVR が内皮細胞の共刺激分子へ関与したことを示唆する。グラフト内皮細胞上の共刺激分子によって T 細胞のアロ免疫応答が変化するため、この結果は拒絶反応を克服する一策となり得ると考えている。

以上のことから、内皮細胞上の HLA 抗原は薬剤により制御できる可能性があること、HLA-class II の発現には CD63 が関わっている可能性があること、EVR は CD8 細胞の関わる拒絶反応も制御し得る可能性があることなどが判明した。本研究が次なる課題を生み出し、今後の追求を進めることで、長期生着の更なる向上や予後不良の拒絶反応の克服へ貢献できれば幸いである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------