

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08619

研究課題名(和文) 免疫抑制薬がSARS-CoV-2ゲノム複製とT細胞応答へ及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) The effects of immunosuppressive drugs on SARS-CoV-2 genome replication and T-cell responses

研究代表者

田中 友加 (Tanaka, Yuka)

広島大学・医系科学研究科(医)・准教授

研究者番号：90432666

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)：本研究は、臓器移植領域の各種免疫抑制剤が SARS-CoV-2 ゲノム複製へ与える影響について、in vitro SARS-CoV-2感染システムを用いて解析し、mTOR阻害剤や核酸合成阻害剤にはSARS-CoV-2ウイルスの増殖を抑制する効果を認めた。また術後T細胞抗ドナー応答評価の結果Covid感染による臓器移植後の抗ドナーT細胞応答に大きな影響は見られず、免疫モニタリングによって免疫抑制療法が維持できると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植後の免疫抑制療法において、ウイルス感染症を合併する場合には、拒絶反応の予防・治療目的で使用される免疫抑制剤がウイルスの複製を増長することが懸念され、必要最小限の免疫抑制療法を実施することが重要と考えられる。免疫抑制剤と抗ウイルス薬は、薬物相互作用の可能性を含むため、免疫抑制剤の減量を要することが多い。しかし、抗ドナー応答と抗ウイルス応答T細胞クローンは異なるため、不用意な免疫抑制剤の減量は拒絶反応を誘発する危険性を孕む。適切な免疫モニタリングの実施により、免疫抑制管理をされている他の疾患(自己免疫性疾患など)にも適用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the effects of various immunosuppressive agents in the field of organ transplantation on SARS-CoV-2 genome replication using an in vitro SARS-CoV-2 infection system and found that mTOR inhibitors and nucleic acid synthesis inhibitors had an inhibitory effect on SARS-CoV-2 virus replication. The results of post-operative T-cell anti-donor response evaluation in kidney transplantation showed no significant effect of Covid infection on anti-donor T-cell response after organ transplantation, suggesting that immunosuppressive therapy can be maintained through immune-monitoring.

研究分野：移植免疫学

キーワード：臓器移植 SARS-CoV-2 免疫抑制剤 T細胞応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

COVID-19 のパンデミックは、移植医療においても世界的に多大な影響を与え、免疫抑制治療を受けている臓器移植患者に SARS-CoV-2 が感染した場合、急激に重症化する危機的状況が諸外国から報告された。また、ドナー由来の SARS-CoV-2 の伝播が現時点で否定できないことから、患者管理で慎重な対応が求められている。さらに、複数の臨床報告により SARS-CoV-2 感染に伴い生体内で産生される過剰なサイトカイン (IL-6, TNF- $\alpha$  など) が重症呼吸障害に關与する可能性が指摘されている。SARS-CoV-2 に感染した移植レシピエントでは、抗ウイルス免疫応答の回復を意図して免疫抑制薬の減量・中止が行われるのが一般的である。しかし、SARS-CoV-2 感染に誘発される重症肺炎の病態が cytokine storm syndromes であることから、副腎皮質ステロイドなど炎症性サイトカイン産生を抑制する免疫抑制薬の減量はむしろ慎重であるべきとの見解もある。患者管理には慎重な対応が求められるが、免疫抑制薬による管理法や重症化のリスク因子については定まった見解がない。一方、SARS-CoV-2 感染後の重症化において、制御性 T 細胞 (Treg) における FoxP3 の誘導が阻害される場合には免疫制御が働かず、過剰免疫反応によるサイトカインストームとの関連が指摘されている。

### 2. 研究の目的

現在、臓器移植で使用される免疫抑制薬の中には、抗ウイルス効果を期待できる薬剤が存在するものの、SARS-CoV-2 のゲノム複製にいかに関与するかについては、調べる限り報告がない。これまでに、2003 年に流行した重症急性呼吸器症候群 severe acute respiratory syndrome (SARS) の病原体として同定されたコロナウイルス (SARS-CoV) のゲノム複製がイムノフィリン経路に依存することが解明され、細胞株における SARS-CoV、HCoV-NL63、および HCoV-229E の複製をカルシニューリン (CN) 阻害剤の tacrolimus が有意に抑制した報告がある。また、mTOR 阻害薬の everolimus などは mTORC1 を阻害することによってオートファジーを誘導し、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の増殖を抑制することが報告されている。そこで、本研究では、臓器移植領域の各種免疫抑制剤が SARS-CoV-2 ゲノム複製へ与える影響について、in vitro SARS-CoV-2 感染システムを用いて解明する事、SARS-CoV-2 感染患者に対して、抗ウイルス効果の観点から調整した免疫抑制療法を行う場合、免疫制御機能が移植臓器の生着に必要十分であるか否かを、我々の開発した carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 細胞質染色とマルチパラメーターフローサイトメトリーを応用したリンパ球混合試験 (MLR) を用い解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) SARS-CoV-2 培養系を用いた各種免疫抑制薬のウイルスゲノム複製に対する影響の解明

分担研究者である坂口ら(広島大学ウイルス学)は、SARS-CoV2/JP/Hi roshima-46059T/20202020 株を VeroE6/TMPRSS2 細胞株への感染させることに成功し、RNA ウイルス量を RT-qPCR で定量化、細胞内のウイルスタンパクをウエスタンブロットティング法で検出する解析法を報告した (Kitagawa H, et al. Am J Infect Control 2020)。この解析系を利用して、臓器移植後に使用する各種免疫抑制剤の カルシニューリン阻害剤 (tacrolimus, cyclosporine)、ステロイド (methylprednisolone)、プロテアソーム阻害剤 (bortezomib)、mTOR 阻害剤 (everolimus, rapamycin)、核酸合成阻害剤 (mycophenolate mofetil: MMF) について、あらかじめ細胞に免疫抑制剤について、各々臨床的有效濃度を振って添加させた後に、ウイルスを加え培養上清中に産生されたウイルス量を RT-PCR で、細胞内に存在するウイルスの N 蛋白質をウエスタンブロットティングで評価した。

#### 2) SARS-CoV-2 感染患者に対する抗ウイルス効果の観点から調整した免疫抑制療法の評価

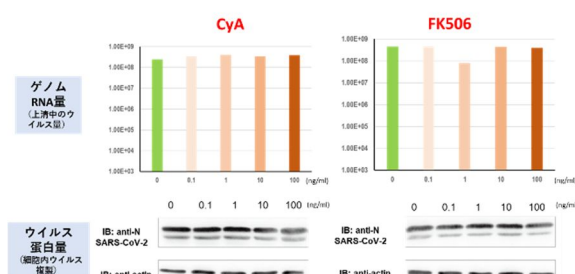
臓器移植症例において、Covid 感染症例と非感染症例における抗ドナー応答性について解析した。また、Treg のマスター遺伝子である FOXP3 遺伝子多型を同時に解析し、FOXP3 遺伝子多型との関連について評価した。

### 4. 研究成果

#### 1) SARS-CoV-2 培養系を用いた各種免疫抑制薬のウイルスゲノム複製に対する影響の解明

カルシニューリン阻害剤の結果 cyclosporine (CyA) および tacrolimus (FK506) については、免疫抑制剤を添加していないコントロールに比べ、臨床有効濃度において、ウイルスのゲノム RNA 量、タンパク量共に変化を示さず、ウイルスに対して増殖/抑制いずれも影響を認めな

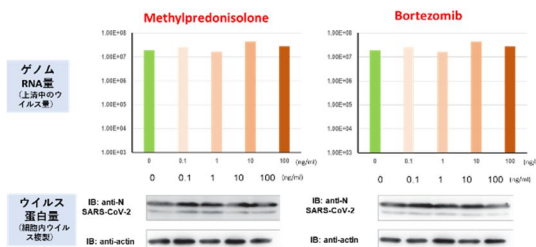
結果: CNIsにはウイルス増殖/抑制効果を認めなかった



かった。

ステロイド(methylprednisolone)、プロテアソーム阻害剤(bortezomib)の添加でも、CNIと同様にコントロールと比較して、臨床有効濃度において、ウイルスのゲノムRNA量、タンパク量共に変化を示さず、ウイルスに対して増殖/抑制いずれも影響を認めなかった。高濃度では、ウイルス量がわずかに増加する結果を認めた。

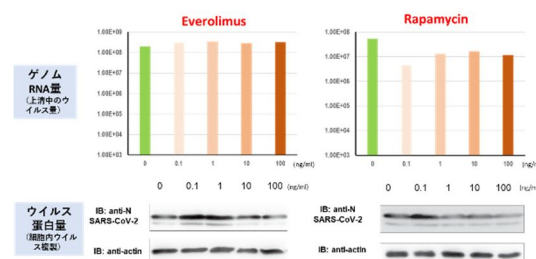
結果：Steroid/プロテアソーム阻害剤にはウイルス増殖/抑制効果を認めなかった



### mTOR 阻害剤の結果

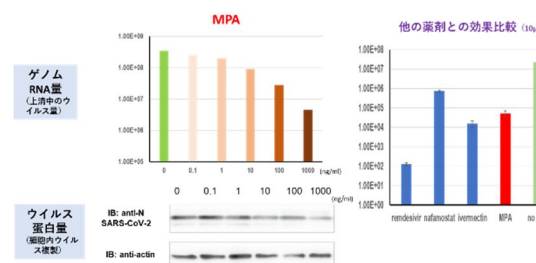
mTOR 阻害剤は、mTORC1 を阻害することによってオートファジーを誘導し、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の増殖を抑制することが報告されているが、SARS-CoV-2 培養系を用いた解析では、Everolimus は、各添加濃度において、本実験系では、ウイルス増殖/抑制において影響を認めなかった。一方、Rapamycin では、コントロールに比べ 0.1 μg/ml からウイルスゲノム RNA 量の減少を示し、軽度の抑制効果があることが示唆された。

結果：mTOR阻害剤のうちRapamycinは軽度の抑制効果 を認めた



核酸合成阻害剤である mycophenolate mofetil(MMF) では、10ng/ml から濃度依存性にウイルス増殖抑制効果を示し、1000ng/ml では強い抑制効果を認めました。なお、この MMF によるウイルス抑制効果と臨床的に COVID に対して使用されている他の薬剤と 10 μM の濃度と比較すると、レムデシベルほどの強い効果はないもののイベルメクチンやナファモスタットと同等あるいはそれよりも強い抑制効果を示していることが分かった。

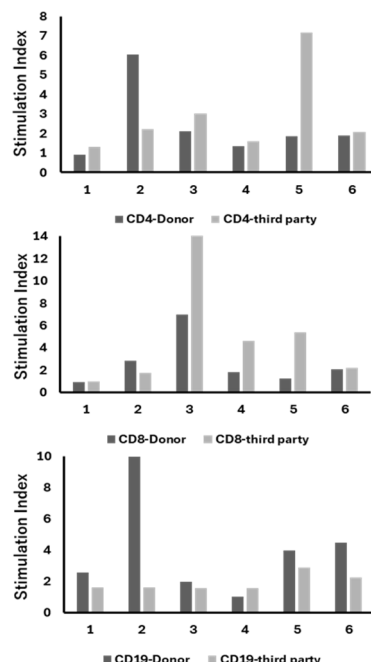
結果：MPAは濃度依存的にウイルス抑制効果を示した



以上の結果より、臓器移植に使用される免疫抑制剤において感染細胞株を用いた in vitro の検討では、MMF および mTOR 阻害剤は抗 SARS-CoV-2 抑制効果を示し、臨床における免疫抑制管理に有効である可能性が示唆された。その他の免疫抑制剤においては SARS-CoV-2 に対して増殖促進等は認めなかった。

## 2) SARS-CoV-2 感染患者に対する抗ウイルス効果の観点から調整した免疫抑制療法の評価

臓器移植後の免疫抑制療法では、患者個々の免疫応答の客観的評価の上で調整し得るプロトコールは未だ確立されていない。特にウイルス感染症を合併する場合は、拒絶反応の予防・治療目的で使用される免疫抑制剤がウイルスの複製を増長することが懸念され、必要最小限の免疫抑制療法を実施することが重要と考えられる。我々は、免疫モニタリング法として CFSE-MLR assay を臨床導入してきた。研究期間において、臓器移植後 Covid 感染となった腎臓移植 7 症例について CFSE-MLR アッセイを用いて抗ドナー応答性を解析した。術後感染を認めた 7 症例において Covid 感染前の CFSE-MLR による抗ドナー(D)および抗サードパーティ(T)に対する Stimulation Index は CD4T 細胞 (D:2.36 ± 1.86vsT:2.91 ± 2.17), CD8T 細胞 (D:2.65 ± 2.22vs4.86 ± 4.82), CD19 B 細胞 (D:4.02 ± 3.19vs1.92 ± 0.54)であり、免疫抑制状態に大きな変化は示さなかった。また、SARS-CoV-2 感染後の重症化において、制御性 T 細胞 (Treg) における FoxP3 の誘導が阻害される場合には免疫制御が働かず、過剰免疫反応によるサイトカインストームとの関連が指摘されていることから、FoxP3 の遺伝子多型 (3279 A/C) を解析したが、特徴的な所見は得られなかった。今後症例の蓄積が必要と考える。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名	Yuka Tanaka, Naoki Tanimine, Naofumi Tsukiyama, Hiroaki Yamane, Kosuke Ono, Akhmet Seidakhmetov, Hiroshi Sakai, Hiroyuki Tahara, Masahiro Ohira, Kentaro Ide, Hideki Ohdan
2. 発表標題	Development Of Immune-related Gene Polymorphism Sets For Predicting Characteristic Complications After Liver Transplantation
3. 学会等名	American Transplant Congress 2023 (国際学会)
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	Yuka Tanaka
2. 発表標題	Gender influence on acute rejection in liver transplantation: Role of FOXP3 gene variants
3. 学会等名	The 18th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST) (国際学会)
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	荒田了輔, 谷峰直樹, 別木智昭, 福原宗太郎, 今岡洸輝, 箱田啓志, 望月哲矢, 井出隆大, 築山尚史, 今岡祐輝, 田原裕之, 大平真裕, 田中友加, 井手健太郎, 大段秀樹
2. 発表標題	肝移植後のCOVID-19感染における重症化症例の経験
3. 学会等名	第40回日本肝移植学会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	福原宗太郎, 田原裕之, 今岡祐輝, 中野亮介, 坂井寛, 谷峰直樹, 黒田慎太郎, 大平真裕, 井手健太郎, 田中友加, 小林剛, 大段秀樹
2. 発表標題	臓器移植後レシピエントに発症したCOVID-19の治療経験から得た知見
3. 学会等名	第59回日本移植学会総会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 田中友加、谷峰直樹、小野紘輔、築山尚史、山根宏昭、大平真裕、田原裕之、井手健太郎、大段秀樹
2. 発表標題 Candidate Gene Analysisに基づく臓器移植後DSA発症リスクを予測する遺伝子多型
3. 学会等名 第59回日本移植学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 築山尚史、谷峰直樹、別木智昭、福原宗太郎、今岡洸輝、箱田啓志、小野紘輔、望月哲矢、井出隆太、今岡祐輝、中野亮介、坂井寛、黒田慎太郎、大平真裕、田原裕之、井手健太郎、田中友加、小林剛、大段秀樹
2. 発表標題 多段階の病態形成に関するCandidate gene approachを用いたCOVID-19重症化予測遺伝子多型の同定
3. 学会等名 第48回日本臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuka Tanaka
2. 発表標題 Monitoring for personalized immune-suppressive therapy
3. 学会等名 Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中友加、坂口剛正、大段秀樹
2. 発表標題 SARS-CoV-2感染培養システムによる免疫抑制剤のウイルス抑制効果の検討
3. 学会等名 第57回日本移植学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 築山尚史、田中友加、小野紘輔、好中久晶、Akmet Seidakhmetov、山根宏昭、今岡祐輝、谷峰直樹、Dorskali Marlen、大平真裕、田原裕之、井手健太郎、小林剛、大段秀樹
2. 発表標題 免疫学的遺伝子多型プロファイリングによる臓器移植個別化医療の可能性
3. 学会等名 第57回日本移植学会総会
4. 発表年 2021年

〔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	大段 秀樹 (Ohdan Hideki)  (10363061)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授  (15401)	
研究分担者	坂口 剛正 (Sakaguchi Takemasa)  (70196070)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授  (15401)	

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