

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591407

研究課題名（和文） 臓器移植における抗体関連型拒絶反応の機序解明と制御に関する研究

研究課題名（英文） Measuring human complement activation for antibody mediated rejection

研究代表者

渡邊 常太 (Watanabe Jota)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40403802

研究成果の概要（和文）：

移植医療における超急性拒絶反応は、移植片に対して反応する既存抗体が補体を活性化し細胞障害を引き起こすと考えられている。今回、移植ドナー患者のリンパ球による補体成分の活性化を、フローサイトメトリーを用いて直接計測する方法を検討した。当研究の結果、通常の仮説に反し CDC test、結合 IgG 量、IgG サブクラスは補体活性化の予測因子としては精度が低いことが示された。また HLA 抗体の補体活性化を計測するために最も適したパラメータは C3b であり、精度の高い新たな移植患者選択システムとして使用可能である。IVIg は HLA 抗体により活性化された補体系を抑制することが示され、免疫感作患者に対する移植医療を進歩させる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

In transplantation, various antibodies cause antibody mediated rejection. The clinical significance of HLA antibodies depends on their ability to activate complement (C). The requirements of HLA antibodies to activate human C are not known. Direct C3b measurement on target cells may be a better indication of the ability of HLA antibodies to activate human C than standard cytotoxicity. Human C3b deposition was influenced more by the particular serum/cell combination under study than by the amount of IgG, with some combinations showing high IgG and low C3b and others showing low IgG and high C3b. IVIG produced significant dose-dependent complement inhibition. Measuring human C component may improve the assessment of donor-recipient compatibility. IVIG is useful for reducing antibody mediated rejection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：臓器移植、抗体関連型拒絶反応、補体、 γ -グロブリン

1. 研究開始当初の背景

臓器移植における免疫抑制療法は、主にTリンパ球による細胞性免疫をターゲットにしてこれまで発展してきた。抗体関連型拒絶反応は移植片に対して反応する既存抗体があるときに起こり、補体と結合した抗体が細胞傷害を惹起すると考えられている。しかし様々な補体成分の活性化と既存抗体の関連は未だ明らかでなく、液性免疫による抗体関連型拒絶反応のメカニズムも未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

現在、移植医療におけるドナー・レシピエント選択検査は、主に Complement Dependent Cytotoxicity (以下 CDC) test とフローサイトメトリによる IgG 量の測定が行われている。しかし CDC test は補体反応の最終段階である溶血、溶菌反応しか検出できず、ウサギ血清を補体成分として用いているため偽陽性となりやすいという欠点が存在する。一方フローサイトメトリは CDC test よりも高い感受性をもつが、抗ドナー HLA 抗体によるリンパ球の反応をみているのみであり、直接的に補体活性をみている訳ではないという欠点が存在する。そこで我々は液性免疫による抗体関連型拒絶反応のメカニズムを明らかにし、補体活性化測定システムを用いた新たな移植患者選択システムの開発を行うため、CDC test と IgG フローサイトメトリとの比較を行い、さらにヒト抗ドナー HLA 抗体による補体成分の活性化をフローサイトメトリを用い、直接計測する方法を確立を目指す。

近年、Intravenous Immunoglobulin(免疫グロブリン、以下 IVIG)は抗 HLA 抗体による拒絶反応によって惹起される細胞障害を阻害する効果があり、使用上の簡便性や副作用が少ないことにより、临床上の有用性が注目されているが、補体活性化の観点からの詳細な検討はない。我々は、この IVIG による細胞障害抑制効果の

メカニズムに関しても新たな補体活性化測定システムを用いて検討する。これにより臓器移植における抗体関連型拒絶反応の機序解明と制御に関する研究を行う。

3. 研究の方法

(1) CDC test

CDC test は Amos 法による標準的な検査法を用いた (洗浄 1 回)。レシピエント血清とドナーリンパ球を反応させ、補体活性化にはウサギ血清 (Pel-Freez, Brown Deer, WI USA) を用い、アクリジンオレンジとエチジウムブロマイドを各トレイに加えた。蛍光顕微鏡で各ウェルの溶血、融解した死細胞の割合を計測しスコア化した。

(2) IgG フローサイトメトリ

標準抗体として CD52 に対するモノクローナル抗体である Campath 1H (Berlex Laboratories, Richmond, CA USA) を用いた。また PRA (panel reactive antibodies) 60% 以上の抗 HLA 抗体を持つ移植待機患者の血清を同意を得て使用した。患者血清は 56 度で 30 分インキュベートし補体活性を除去した後、この血清を抗体とし 2×10^5 個の標的リンパ球を混合し活性化させた。さらに緑色蛍光 (FITC) を付着させた IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA USA) と赤色蛍光 (PE) を付着させた CD3 または CD20 抗体 (どちらも BD Biosciences) を付加し、T リンパ球と B リンパ球を区別した。これらにより染色されたリンパ球をフローサイトメータにて測定した。すべての実験においてコントロールとして Normal human Serum (NABI, Miami, FL USA) を測定し、これとの比率において検討した。

3. 活性化ガンマグロブリンの測定

フローサイトメトリを用い標準抗体にて活性化されたリンパ球の活性化ガンマグロブリンを計測した。IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA USA) および IgM 抗体 (BD Biosciences, San Jose, CA USA) を用いた。

4. 補体活性化測定

補体成分を測定するためにフローサイトメトリの基礎設定を行った。血漿中の補体成分はボランティアより採取した血清をただちに凍結し、補体成分として保存した。同意を得て末梢血液より抽出されたリンパ球を抗 HLA 抗体患者血清により感作後、補体成分の含まれたヒト血清 ($20 \mu\text{l}$) を付加し、15 分間、37 度でインキュベートした。まず代表的な補

体成分とされる C3b を計測する 11) ため、FITC 付着 C3c ポリクローナル抗体 (Dako Corporation, Carpinteria, CA USA) を付加した。赤色蛍光 (PE) を付着させた CD3 または CD20 抗体を付加し、染色されたリンパ球をフローサイトメトリにて測定し、コントロールとの比率において検討した。さらに C1q 抗体 (Dako Corporation, Carpinteria, CA USA) および iC3b, C3d, C4d, C5, C5b-9 (すべて Quidel, San Diego, CA USA) を用い、各種補体成分の活性化を計測した。

5. IVIG による補体抑制効果の測定

IVIG は臨床で行われている大量ガンマグロブリン療法 (2g/kg、川崎病の急性期使用量) に準じ、最大 32mg/ml 使用した。PBS と IVIG (Panglobulin, ZLB Bioplasma AG, Wasshington DC) を付加し、抗体により活性化された T リンパ球の結合 IgG 量をフローサイトメトリにて計測した。また補体因子 (C3b) 測定のため、補体成分として健康人の新鮮血清を付加後、PBS と IVIG を付加し、活性化 C3b 量をフローサイトメトリにて計測した。

4. 研究成果

(1) CDC test とフローサイトメトリー (IgG) との関連性

抗 HLA 抗体をもつ移植待機患者 8 人の血清を順次希釈し (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32)、これらの血清をドナーリンパ球と反応させ、ウサギ血清を付加し CDC test を施行した。CDC が始めて陰性となった希釈値 (first negative) と最後の陽性の希釈値 (last positive) を選択し、これらの血清と target cell との結合 IgG 量をフローサイトメトリにて計測した。target cell として 3 種の異なったリンパ球を用いた。この結果、CDC positive 群と CDC negative 群は大部分においてオーバーラップしていた。通常、IgG フローサイトメトリでは Ratio 2.0 以下を陰性と判定している。しかし CDC Negative 群の IgG フローサイトメトリ平均値は 6.12 であり、CDC test の結果と IgG フローサイトメトリの結果の解離が明らかとなった。ドナー・レシピエント選択検査として用いられている CDC test と IgG フローサイトメトリの結果は一致しない可能性があることが明らかとなった。

(2) IgG サブクラスの検討

次いで抗 HLA 抗体により活性化される免疫グロブリンのサブクラスを検討した。抗 IgM 抗体陽性患者は除いた 10 人の抗 HLA 抗体陽性患者血清を用い、同一人のドナーよりのリンパ球を活性化させた。その後、抗 IgG 抗体、抗 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 抗体を用い、活

性化 IgG 量をフローサイトメトリにて検討した。この結果、すべての患者血清において優位な IgG サブクラスは IgG1 であり、わずかなではあるが IgG3 も反応していた。IgG2, IgG4 は確認できなかった。

(3) 結合 IgG 量と補体 (C3b) 活性化との関連性

フローサイトメトリを用いヒト補体活性化を直接計測する方法を検討した。21 人の抗 HLA 抗体陽性患者血清を 3 種類のリンパ球と反応させ (n=48)、補体因子 (C3b) 測定のため補体成分としてボランティアより採取した健康人の新鮮血清を付加した。抗 C3b 抗体を用い、結合 C3b 量をフローサイトメトリにて計測した。またコントロールとして抗 HLA 抗体を含まない血清 (n=10) を抗体として使用した。コントロールの結合 C3b 量比は 0.96 ± 0.07 (average \pm SD) であり、 1.17 (average \pm 3SD) を基準値として使用した。この結果、補体成分である C3b の測定は可能であった。また同じ患者血清を用い、IgG フローサイトメトリを行い、C3b との比較をおこなった。IgG と C3b 活性の関連は、当初比例関係とすることが予想されたが、予想に反し高 IgG・低 C3b または低 IgG・高 C3b の症例が存在した。これらの結果より C3b 活性は IgG 量によるのではなく血清/リンパ球の組み合わせにより決定されることが明らかとなった。

(4) 様々な補体成分に関する検討

HLA 抗体による補体系の活性化と各補体成分との関連性を検討した。上記と同様に抗 HLA 抗体陽性患者血清をリンパ球と反応させ、補体成分としてボランティアより採取した健康人の新鮮血清を付加した。抗 C1q, C4d, C3b, C3d, iC3b, C5, C5b-9 抗体を用い、フローサイトメトリにて計測した。この結果、抗 HLA 抗体陽性患者血清に対し C3b はほぼすべての患者で陽性であり、最も鋭敏な補体成分と考えられた。また C4d, C5 も有用なパラメータであった。C3d, iC3b, C5b-9 の反応はわずかであった。このため抗 HLA 抗体による補体活性化を指標とした新たなドナー・レシピエント選択検査は、C3b 測定が適当であることが確認された。

(5) IVIG の抗 HLA 抗体への結合効果

IVIG は HLA 抗体による拒絶反応における細胞障害を阻害する効果があると報告されている。このため IVIG の抗 HLA 抗体への結合効果について検討した。抗 HLA 抗体をもつ移植待機患者の血清 (n=23) を抗体とし、PBS と IVIG を付加し、T リンパ球結合 IgG 量をフローサイトメトリにて計測した。IVIG は臨床で行われている大量ガンマグロブリン療法 (2g/kg、川崎病の急性期使用量) に準じ、

32mg/ml 使用した。その結果、IVIG を付加しても T リンパ球結合 IgG 量の抑制は確認できず、IVIG は様々な特異性を持つ HLA 抗体の T リンパ球への結合を阻害しなかった。通常の仮説に反し、IVIG は HLA 抗体レセプターに結合しその活性を阻害しないことが確認された。

(6) IVIG の補体抑制効果

IVIG による細胞障害抑制効果のメカニズムを検討した。抗 HLA 抗体陽性患者血清と Campath 1H (humanized IgG1 monoclonal Ab) をリンパ球と反応させ、補体因子 (C3b) 測定のため、補体成分として健康人の新鮮血清を付加した。PBS と IVIG を付加し、抗 C3b 抗体を用い、フローサイトメトリーにて計測した。IVIG は最大 32mg/ml 使用した。その結果、IVIG は濃度依存的に補体 (C3b) 活性化を抑制することが示された。このため IVIG は HLA 抗体レセプターに結合しその活性を阻害するのではなく、HLA 抗体により活性化された補体系を抑制することが示された。

(7) 研究まとめ

超急性拒絶反応の原因である補体の活性化をフローサイトメトリーを用い直接測定することは可能であった。HLA 抗体の補体活性化を計測するために最も適したパラメータは C3b であり、精度の高い新たな移植患者選択システムとして使用可能である。IVIG は HLA 抗体により活性化された補体系を抑制することが示され、免疫感作患者に対する移植医療を進歩させる可能性がある。

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 1 件)

1. 臓器移植における抗体関連型拒絶反応に対する補体活性化計測システムの開発
渡邊常太、串畑史樹、高田泰次
愛媛医学 第 32 巻 1 号, p51-57, 2013

[学会発表] (計 2 件)

1. IVIG の HLA 抗体に対する補体抑制効果について
第 48 回日本移植学会総会 (9. 20~22. 2012, 名古屋)
愛媛大学 肝胆膵・移植外科
渡邊常太、串畑史樹、高田泰次

2. 臓器移植における超急性拒絶反応抑制の試みについて
第 30 回日本肝移植研究会 (6. 14-15. 2012, 福岡)
愛媛大学 肝胆膵・移植外科

渡邊常太、串畑史樹、高田泰次

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 常太 (Watanabe Jota)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：40403802

(2) 研究分担者

高田 泰次 (Takada Yasutsugu)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10272197

: