

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24年 4月 6日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791246

研究課題名（和文）抗体関連型慢性拒絶反応を回避するシグナル伝達経路の解明

研究課題名（英文）The study on signal transduction to reduce the risk of antibody mediated chronic rejection.

研究代表者

岩崎 研太 (IWASAKI KENTA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：10508881

研究成果の概要（和文）：HLA 抗体の中には、グラフト内での抗原抗体反応後の障害が軽減出来るものがある。HLA class I 抗体接着により、内皮細胞を活性化する MEK/ERK 経路ではなく、細胞保護に必要な PI3K/AKT 経路が活性化されることが、免疫順応獲得に必須であり、HLA class I 抗体接着により、細胞保護遺伝子である ferritin や H0-1 が、転写因子 Nrf2 によって PI3K/AKT 経路に依存して活性化することを示した。一方、ABO 不適合移植で見出される抗原抗体接着が引き起こす内皮細胞での研究は、私どもが糖鎖発現株を樹立し詳細な研究を行う事で、ABO-、HLA-不適合移植における相違点を見出すことに成功した。そこでは免疫順応の一端が AB 糖鎖に対する抗体接着による ERK の不活性化と、それに伴う補体制御因子の誘導であると明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Accommodation, the condition of no injury even in the presence of anti-donor antibody, is one of the key factors for successful transplantation with anti-donor antibody. The purpose of this study was to compare signal transduction between anti-A/B and anti-HLA antibody reaction and to elucidate the mechanisms underlying accommodation.

RESULTS: Preincubation with anti-HLA antibodies only at low levels (<10% of saturation level) or anti-A/B antibodies at high levels (even at near saturation levels) for 24 hr resulted in resistance to complement-mediated cytotoxicity. Anti-A/B antibody ligation inactivated ERK1/2 pathway and increased complement regulatory proteins such as CD55 and CD59, whereas anti-HLA ligation activated PI3K/AKT pathway and increased cytoprotective genes such as hemeoxygenase-1 and ferritin H. **CONCLUSION:** Complement inhibition by up-regulation of CD55 and CD59 through ERK1/2 inactivation might play a substantial role in accommodation after ABO-incompatible transplantation, which could also explain the intriguing finding of C4d deposition in the graft without 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	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植免疫、シグナル伝達、生体防御、転写因子、補体

1. 研究開始当初の背景

臓器移植医療における大きな問題は、移植臓器の廃絶にある。良質な免疫抑制薬の開発のおかげで移植直後に発生する細胞性拒絶反応は制御できるようになり、その成績は飛躍的に上昇した。腎臓移植の適応に伴い世界中でドナー不足が大きな問題となっており、その解決方法としてこれまでは禁忌とされていた抗ドナー抗体陽性移植が盛んに行われている。

抗原抗体反応において、拒絶反応に対して反応性を示さない状態が存在する。これを免疫順応 (accommodation)と定義している。この免疫順応獲得のため世界中で研究が行われているが、現在その方法は提示されていない。我々は移植における免疫順応を獲得するためのヒントが腎臓移植でのABO不適合移植にあるのではないかと考えている。ABO血液型不適合腎臓移植では、ほとんどのグラフトでC4dの接着が認められる。C4dは、C4b補体がI因子の作用により分割されることで生成する不活性なフラグメントで、補体古典経路の活性化に伴い組織への沈着が見られ、抗体関連型拒絶反応のマーカーとして注目されている。しかし、ABO血液型不適合腎臓移植ではC4d陽性でも拒絶反応が進行していない免疫順応に近い状態を保っている。一方、HLA抗体陽性移植では、C4d陽性であればグラフト機能は障害され、拒絶反応は進行する。また肝臓移植では腎臓移植とは反対、つまりHLA陽性に比べるとABO不適合の移植成績は悪くなる。これは腎臓と肝臓における血管内皮細胞の違い（肝臓は類洞内皮細胞といわれる特殊な内皮細胞が存在する）と

も考えられているが、明確な答えは無い。つまり2つの抗ドナー抗体陽性移植間での差異を解明すれば免疫順応を誘導する方法が開発でき、抗ドナー抗体陽性移植の安全な実施・免疫抑制療法の減量・慢性拒絶防止など現在抱えている問題を解決できると考えられる。

私達は若手スタートアップ (H20～H21) において、大動脈内皮細胞において一定量の抗 HLA 刺激で誘導される遺伝子発現が補体活性による細胞障害を減弱できることを見いだした。この現象は PI3K/AKT 経路活性化に伴うサイトプロテクティブな遺伝子発現が転写段階で制御されており、細胞保護に寄与していることも証明した。このサイトプロテクティブ遺伝子発現は PI3K/AKT を負に制御する PTEN の発現レベルに依存することも見いだした。一方多量の HLA 抗体接着では特に ERK の活性化がより顕著に上昇しており、このことが補体に対する細胞障害を亢進している可能性が示唆されたがそのメカニズムの詳細は以前不明である。現在、抗 A・B 抗体が引き起こすシグナル伝達・遺伝子発現の研究は無いに等しい。ABO 不適合移植において抗ドナー抗体が引き起こすシグナル伝達・遺伝子発現を解明し、HLA 陽性移植との差異を解明できれば、長期に移植臓器を生着させるための戦略を立てることが可能となる。

2. 研究の目的

本研究では抗原抗体反応後におこるシグナル伝達・遺伝子発現の変化を分子生物学的手法で観察し、免疫順応を獲得する方法を考案することを目的とする。

3. 研究の方法

抗 ABO 抗体接着によるシグナル伝達・遺伝子発現は抗 HLA 抗体のそれとは異なることが考えられるが、現在 AB 型糖鎖を発現している血管内皮培養細胞は存在していないため (*J Vasc Res* 2000;37:540-547)、抗 AB 抗体-抗原反応の研究のためにまずはそれぞれを細胞表面に発現している細胞株の樹立を行う。抗体抗原反応後におこるシグナル伝達、特に細胞保護に働く PI3K/AKT、酵母から植物・高等動物に至るまで広く真核生物に保存された MAPK、細胞のエネルギーセンサーである AMPK、細胞増殖などに深く関わる mTOR に特に注目し、どのシグナル伝達がそれぞれの抗原抗体反応後に活性化されているかを観察し、さらに炎症・補体活性・凝固を制御する遺伝子群にどのような影響を与えるのかを、内皮細胞への遺伝子発現/抹消を行うことで同定したい。そして、これらの結果をもとに免疫順応を誘導する有効な対策を立案する。

4. 研究成果

AB 糖鎖発現株の不在から世界でも研究が立ち遅れていたが、私どもが糖鎖発現株を樹立し詳細な研究を行う事で、ABO-、HLA-不適合移植における相違点を見出すことに成功した。そこでは免疫順応の一端が AB 糖鎖に対する抗体接着による ERK の不活性化と、それに伴う補体制御因子の誘導であると明らかにした。また ERK の阻害剤による補体制御因子 CD55/CD59 の発現上昇を確認した。(2012 Transplantation)このことは現在腎臓移植で観察されている、長期成績の違いが ERK の活性化に起因している可能性を示唆しており、さらなる研究を進める必要があると考えられた。

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 6 件、全て査読有り)

1. Comparative study on signal transduction in endothelial cells after anti-a/b and human leukocyte antigen antibody reaction: implication of accommodation.

Iwasaki K, Miwa Y, Ogawa H, et al.,

Transplantation 2012 Jan 13(4) 390-7

2. Adipose-derived stromal cells cultured in a low-serum medium, but not bone marrow-derived stromal cells, impede xenoantibody production.

Saka Y, Furuhashi K, Katsuno T, Kim H, Ozaki T, Iwasaki K, et al., (13 人中 6

番目) **Xenotransplantation**.2011 May-Jun;18(3):196-208.

3. Clinical significance of regulatory T-cell-related gene expression in peripheral blood after renal transplantation.

Iwase H, Kobayashi T, Kodera Y, Miwa Y, Kuzuya T, Iwasaki K, et al., (13 人中

6 番目) **Transplantation**. 2011 Jan 27;91(2):191-8.

4. Transcriptional regulation of ferritin and antioxidant genes by HIPK2 under genotoxic stress.

Hailemariam K, Iwasaki K, et al., (5 人

中 2 番目) **J. Cell. Sci.** 2010 Nov 15;123(Pt 22):3863-71.

5. Regulation of genotoxic stress response by homeodomain-interacting protein kinase 2 through phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein at serine 271.

Sakamoto K, Huang BW, Iwasaki K, et al., (6人中3番目) **Mol. Biol. Cell.** 2010 Aug 15;21(16):2966-74.

6. Potential value of human thrombomodulin and DAF expression for coagulation control in pig-to-human xenotransplantation.

Miwa Y, Yamamoto K, Onishi A, Iwamoto M, Yazaki S, Haneda M, Iwasaki K, et al., (14人中7番目) **Xenotransplantation.** 2010Jan-Feb;17(1):26-37.

[学会発表] (計 13 件)

1. 補体活性・凝固因子は ERK 不活性化による Accommodation 誘導を阻害する

○岩崎研太、三輪祐子、羽根田正隆、小林孝彰
異種移植研究会 2011.12.10 広島

2. Difference in signal transduction between anti-A/B and anti-HLA antibody binding to endothelial cells

○岩崎研太、三輪祐子、羽根田正隆、小林孝彰
国際異種移植学会 2011.10.24 マイアミ

他 11 演題

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/tx-immunology/F25CBCD1-6AEA-4505-A2A9-6BD0EB4F0C8C.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 研太 (IWASAKI Kenta)

名古屋大学・医学部・寄附講座助教

研究者番号：10508881

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし