

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791736

研究課題名(和文) 血液型糖鎖抗原に結合する新規ペプチドによる ABO 不適合腎移植の拒絶抑制法の開発

研究課題名(英文) Development of novel ABO blood group antigen targeting peptide that suppress rejection during ABO-incompatible kidney transplantation

研究代表者

米山 徹 (Yoneyama, Tohru)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50587649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：血液型不適合移植では、ドナー臓器の血液型抗原とレシピエント血中の抗血液型抗体との抗体抗原反応を抑制するため、通常の腎移植よりも強力な免疫抑制により顕在化する感染症および移植後の長期成績の低下が問題となる。本研究では、ファージディスプレイ法によりA/B抗原標的ペプチド(BATP)を同定した。BATPは、細胞毒性が低く、赤血球、腎組織上のA/B抗原をブロックする。BATP還流後、血液型不適合血液を還流した腎臓では、糸球体毛細血管における抗血液型抗体を含むイムノグロブリンの沈着を抑制し、血栓形成予防効果を示した。ABO不適合腎移植の新規拒絶抑制法の開発につながる知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Antibody-mediated rejection after ABO-incompatible kidney transplantation (ABO-I KTx) is a major barrier to transplantation success. Clinical conditions during ABO-I KTx are difficult to control because of overimmunosuppression. To reduce the need for immunosuppression, we screened for an ABO blood group antigen-targeting peptide (BATP) by screening of T7 phage-displayed peptide library and identified six peptide sequences that efficiently suppressed binding of anti-ABO blood group antibodies (Abs) to ABO histo-blood group antigens in kidney tissues. Surprisingly, ex vivo perfusion of BATP in kidneys caused significant suppression of anti-blood group Ab binding to antigen and IgG and IgM deposition in renal glomerular capillaries after ABO-I blood reperfusion. These data indicate that A/B blood group antigens in kidney tissues may be neutralized by BATP. This approach may enable the development of a novel blood group antigen-neutralizing therapy to overcome the challenges of ABO-I KTx.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：血液型不適合腎移植 ABO抗原標的ペプチド

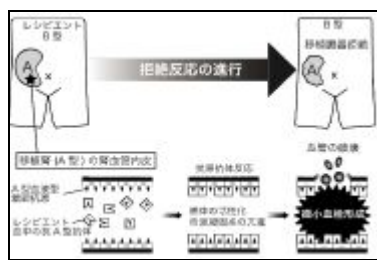
1. 研究開始当初の背景

ABO 不適合腎移植では、移植腎の血液型糖鎖抗原による拒絶抑制のためにレシピエント血中の抗体の除去および抗体産生細胞の抑制療法が行われるが、血液型糖鎖抗原に対して非特異的であり、通常よりも強力な免疫抑制によって顕在化する感染症と移植長期成績の低下が問題となる。そのため、移植腎の血液型糖鎖抗原そのものを特異的に減弱化、無効化する新たな治療法の開発が求められている。これまでに血液型糖鎖抗原に特異的に作用する分子として糖鎖切断酵素タンパク質をヒトの腎血管に還流することにより、血液型糖鎖抗原を除去する方法 (*Transpl. Immunol.*, 20: 132-138, 2009) が報告されているが、ヒトへの臨床応用には至っていない。

2. 研究の目的

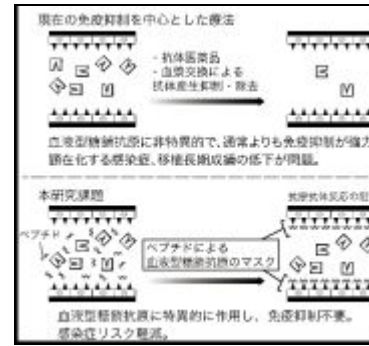
ABO 不適合腎移植の際には、血液型糖鎖抗原を介した拒絶反応が問題となる。(図1)優れた免疫抑制剤や抗体除去療法により移植の短期成績は向上したが、その長期成績は、必ずしも満足できるものではない。

図 1. 血液型不適合移植の拒絶反応例



我々は、これまで糖鎖抗原を模倣するペプチド配列のスクリーニングを行ってきた。本研究では、この方法により、血液型糖鎖抗原に特異的に結合するペプチドを用いて拒絶反応を抑制する新たな治療法の開発を目的とする。(図2) ABO 不適合腎移植の成績向上は、生体腎移植のみならず献腎移植や脳死移植への適応拡大へと道を開くものである。

図 2. 血液型不適合移植における拒絶抑制法



3. 研究の方法

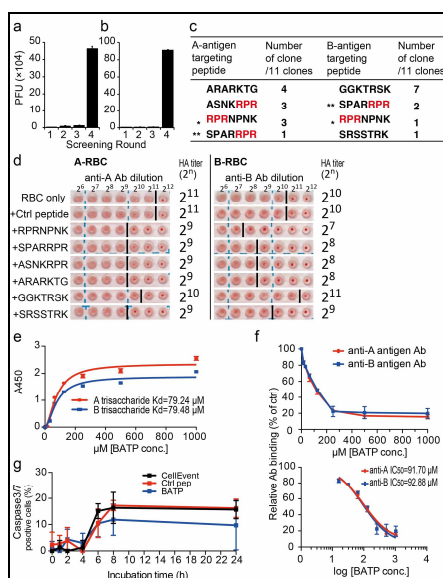
本研究では、最初に A 型あるいは、B 型血液型抗原に結合するペプチド配列をファージディスプレイ法でスクリーニングし、得られたペプチドの各血液型糖鎖抗原に対する結合親和性を決定した。上記ペプチドを阻害剤として血液型糖鎖抗原のマスク効果を免疫組織化学的に検討し、もっともマスク効果の高いペプチドのヒト腎組織血管における血栓予防効果について検証した。また移植腎の血管内皮上の血液型糖鎖抗原の提示分子を同定し、ファージディスプレイ法および相互作用解析装置で血液型糖鎖抗原提示分子に結合するペプチドを同定する。最終的に血栓予防ペプチドと血液型糖鎖抗原提示分子結合ペプチドからなる融合ペプチドを作製し、腎血管内皮への血栓予防ペプチド送達システムの開発を試みる。

4. 研究成果

ファージディスプレイスクリーニングを行った結果、4 ラウンドのスクリーニングにより、A および B 型抗原に結合するファージが増幅した(図 3a,b) 8 種類のペプチド配列を同定した(図 3c)、8 種類の BATP による A および B 型 RBC のブロッキング処理後の HA 活性阻害効果(図 3d) および BATP によるプレート上の A および B 型抗原ブロッキング処理後の抗血液型抗体の結合阻害効果(図 3e,f) について試験した結果、8 種類の BATP は、いずれも HA 活性阻害効果を示し、A および B 型抗原への抗

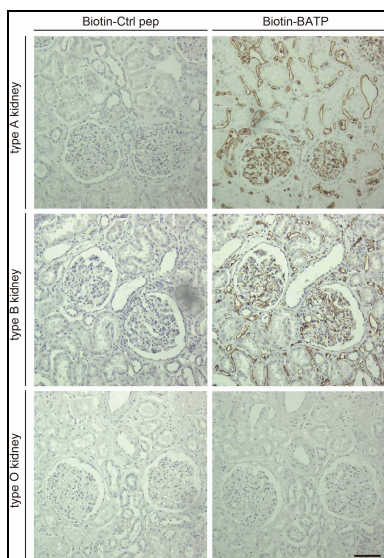
A および B 抗体の結合を約 60%阻害した。HA 活性阻害効果および抗血液型抗体結合阻害効果が最も高い RPRNPKNK (BATP) を以降の実験で使用した。BATP の糸球体毛細血管内皮細胞に対する細胞毒性を測定した結果、Ctrl ペプチドと同程度の低毒性であった (図 3g)。

図 3. BATP のスクリーニングと BATP ブロッキングによる HA 活性阻害効果および抗血液型抗体結合阻害効果



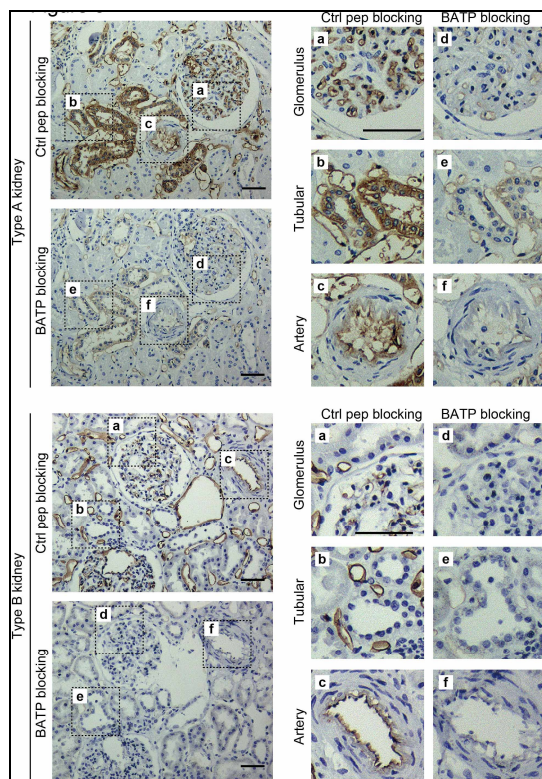
次に A/B 型腎組織におけるビオチン標識した BATP の結合を免疫組織化学的に検討した結果を図 4 に示す。その結果、BATP は、A/B 型腎の糸球体内皮、尿細管内皮および腎動脈内皮に結合することが示された。

図 4. A/B 型腎組織への BATP の結合



次に BATP でブロッキングした A/B 型腎組織における抗 A/B 抗体の結合を免疫組織化学的に検討した結果を図 5 に示す。図 5a, b, c は、Ctrl ペプチドでブロッキングし、d, e, f は、BATP でブロッキングした組織における抗 A 型抗体による免疫染色の結果を示す。a, d は、糸球体、b, e は、尿細管、c, f は、腎動脈を示す。その結果、BATP でブロッキングした組織では、Ctrl ペプチドと比較し、A/B 型腎組織上の A/B 型抗原への抗 A/B 抗体の結合が効果的に抑制された。

図 5 BATP ブロッキング処理による A/B 型腎組織への抗 A/B 抗体結合阻害効果



さらに腎細胞がん患者から摘出した腎臓の正常部位に BATP を生体外灌流し、不適合血液を再灌流し、抗原抗体反応による糸球体内の血栓形成の有無 (図 6) および糸球体内の抗血液型抗体を含むイムノグロブリンの沈着 (図 7) について調べた。

図 6. B ATP の生体外灌流による糸球体内血栓予防効果

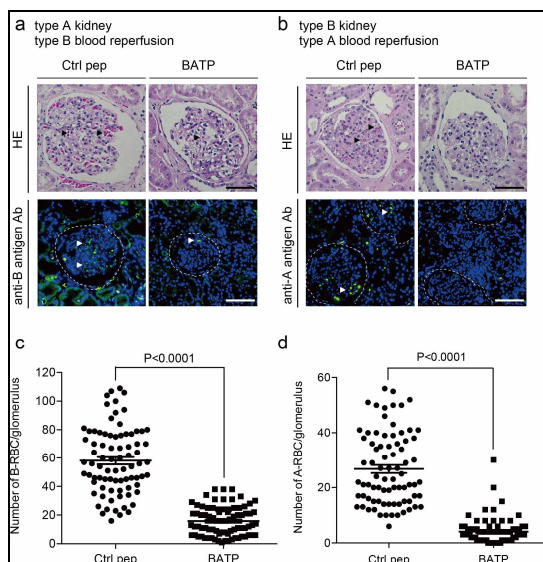
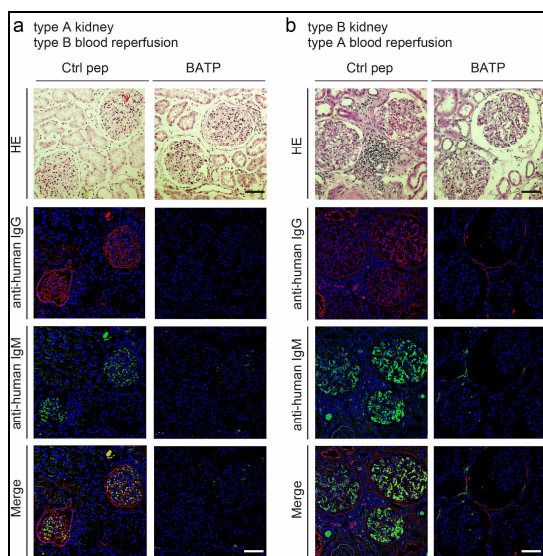


図 7. B ATP の生体外灌流によるイムノグロブリン沈着予防効果



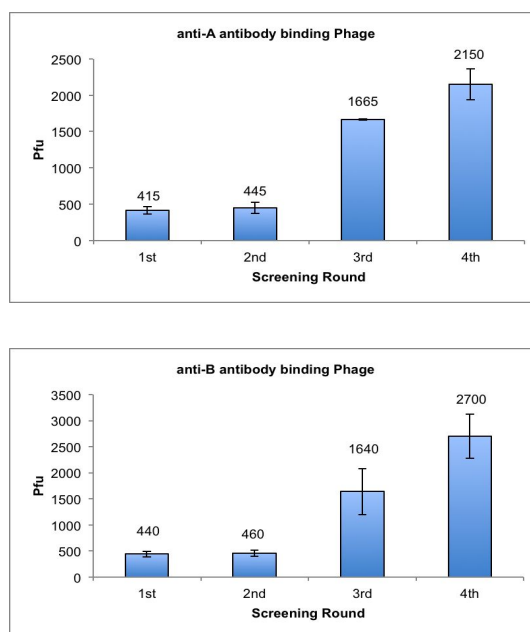
その結果、B ATP の生体外灌流 (A 型、図 6a, c および図 7a) (B 型、図 6b, d および図 7b) により、ABO 不適合血液再灌流後の糸球体内の血栓形成とイムノグロブリンの沈着が、コントロールペプチドの灌流と比較して顕著に減少することが明らかとなった。

以上の結果より、ABO 不適合腎移植の新規拒絶抑制法の開発につながる知見が得られた。本研究のもう一つの柱である移植腎の血管内皮上の血液型糖鎖抗原の提示分子を同定することができなかつたため、本研

究の最終目標とした腎血管内皮への血栓予防ペプチド送達システムの開発を試みると

いう点について達成するには至らなかつた。平成 25 年度以降の研究計画が達成できない場合の方策として血液中の抗血液型抗体を除去するペプチドをファージディスプレイ法にてスクリーニングし、抗 A および抗 B 抗体に結合するファージの増殖に成功した (図 8)。現在増殖したファージが提示するペプチド配列調べている。B ATP による血液型抗原のマスクと抗血液型抗体結合ペプチドによる抗血液型抗体除去を組み合わせることにより、今後、免疫抑制剤減量を目的とした ABO 不適合移植の新規拒絶抑制法の開発を目指す。

図 8. 抗 A / B 型抗体結合ファージの増殖



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. Blood group antigen-targeting peptide suppresses anti-blood group antibody binding to antigen in renal glomerular capillaries after ABO-incompatible blood reperfusion. Yoneyama T, Hatakeyama S,

Tobisawa Y, Yamamoto H, Imanishi K, Okamoto T, Tokui N, Sugiyama N, Suzuki Y, Kudo S, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Kamimura N, Fukuda MN, Ohyama C. *Transplantation*. 2013 Feb 15;95(3):418-25. doi: 10.1097/TP.0b013e3182795b9c.PMID: 23274971. 査読あり

2. 米山 徹, 畠山真吾, 今西賢悟, 得居範子, 岡本哲平, 杉山尚樹, 鈴木裕一郎, 工藤茂将, 米山高弘, 盛 和行, 古家琢也, 神村典孝, 大山 力: ABO 血液型抗原をマスクするペプチド配列のスクリーニング. 第 44 回日本臨床腎移植学会記録集「腎移植症例集 2011」(日本医学館)平成 23 年 10 月 1 日 79-82. 査読なし

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 米山 徹, 畠山真吾, 今西賢悟, 得居範子, 岡本哲平, 杉山尚樹, 鈴木裕一郎, 工藤茂将, 米山高弘, 盛 和行, 古家琢也, 神村典孝, 大山 力: ABO 血液型抗原をマスクするペプチド配列のスクリーニング —ペプチド灌流は、ABO 不適合血液還流後の腎系球体毛細血管における血栓形成を抑制する—. 第 99 回日本泌尿器科学会総会 平成 23 年 4 月 21-24 日 名古屋国際会議場 (23 日) ポスター
2. Yoneyama T, Hatakeyama S, Imanishi K, Tokui N, Okamoto T, Sugiyama N, Suzuki Y, Kudo S, Mori K, Yoneyama T, Koie T, Kamimura N, Ohyama C: Blocking of blood group A- or B-antigen by blood group specific binding peptide: New strategy by overcoming ABO incompatible kidney transplantation. 第 105 回 AUA 平成 23 年 5 月 13 日-20 日. ワシントン

3. 米山 徹, 畠山真吾, 今西賢悟, 得居範子, 岡本哲平, 杉山尚樹, 鈴木裕一郎, 工藤茂将, 米山高弘, 盛 和行, 古家琢也, 神村典孝, 大山 力: ABO 抗原標的ペプチドは腎系球体における血栓形成を抑制する. 第 27 回腎移植・血管外科研究会 平成 23 年 6 月 24—25 日 札幌市(定山溪万世閣ホテルミリオール)
4. Yoneyama T, Hatakeyama S, Tobisawa Y, Imanishi K, Tokui N, Okamoto A, Sugiyama N, Suzuki Y, Kudo S, Mori K, Yoneyama T, Koie T, Kamimura N, Ohyama C: Blood group antigen targeting peptide suppresses thrombotic microangiopathy in renal glomerular capillaries after ABO-incompatible blood reperfusion. 弘前国際医学フォーラム 第 13 回学術集会 平成 23 年 9 月 9 日 弘前大学医学部コミュニケーションセンター
5. 米山 徹, 畠山真吾, 飛澤悠葵, 今西賢悟, 得居範子, 岡本哲平, 杉山尚樹, 鈴木裕一郎, 石村大史, 工藤茂将, 米山高弘, 盛 和行, 古家琢也, 神村典孝, 大山 力: ABO 抗原標的ペプチドは ABO 不適合腎移植模倣モデルにおける腎系球体内の血栓形成を抑制する. 第 14 回東北移植研究会 平成 23 年 11 月 26 日 仙台市(長陵会館)
6. Yoneyama T, Hatakeyama S, Imanishi K, Tokui N, Okamoto T, Sugiyama N, Suzuki Y, Kudo S, Mori K, Yoneyama T, Koie T, Kamimura N, Ohyama C: Blood group antigen targeting peptide suppresses thrombotic microangiopathy in renal glomerular capillaries after ABO-incompatible blood reperfusion. 内藤カンファレンス、札幌市

7. Yoneyama T, Hatakeyama S, Tobisawa Y, Yamamoto H, Imanishi K, Okamoto T, Tokui N, Sugiyama N, Suzuki Y, Kudo S, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Kamimura N, Fukuda MN, Ohyama C: Blood group antigen targeting peptide suppresses anti-blood group antibody binding to antigen in renal glomerular capillaries after ABO-incompatible blood reperfusion. EAU2013 (European Association of Urology 2013) 平成 25 年 3 月 15-19 日 ミラノ
8. Yoneyama T, Hatakeyama S, Tobisawa Y, Yamamoto H, Imanishi K, Okamoto T, Tokui N, Sugiyama N, Suzuki Y, Kudo S, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Kamimura N, Fukuda MN and Ohyama C: Blood group antigen-targeting peptide suppresses anti-blood group antibody binding to antigen in renal glomerular capillaries after ABO-incompatible blood reperfusion. AUA (American Urological association) 2013 平成 25 年 5 月 4-9 日 サンディエゴ
9. Yoneyama T, Hatakeyama S, Tobisawa Y, Yamamoto H, Suzuki Y, Okamoto A, Imai A, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Fukuda MN and Ohyama C: Blood group antigen-targeting peptide suppresses anti-blood clotting and immunoglobulin deposition in renal glomerular capillaries after ABO-incompatible blood reperfusion. IXA2013 (International xenotransplantation association 2013) 平成 25 年 11 月 10-13 日 大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

米山 徹 (YONEYAMA, Tohru)
 弘前大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号 : 50587649

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :