

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462536

研究課題名(和文) 免疫グロブリンGのシアル化Fc (sFc) による抗体関連型腎拒絶反応の制御

研究課題名(英文) Suppression of antibody-mediated rejection by immunoglobulin G resulting from Fc sialylation

研究代表者

奥見 雅由 (Okumi, Masayoshi)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：60512978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：治療一括投与群における移植腎の病理組織学的所見は、無治療群と比較し、炎症所見やC4d沈着が有意に抑制されていた。抗原抗体反応の結果、活性化する補体古典経路の補体因子(C1q、C3、C9)について、real-time PCRで移植腎におけるmRNAの発現について検討したところ、治療モデル群で補体因子(C1qとC3)の発現が有意に抑制されていた。また免疫グロブリンを投与することにより、DSAの産生が抑制されることが確認された。

研究成果の概要(英文)：2g/kg Intravenous immunoglobulin (IVIg) treatment significantly suppressed inflammation and C4d deposition in kidney allografts in a rat antibody-mediated rejection kidney transplant model. This mechanism acts, not only to reduce expression of mRNA levels of C1q and C3 in kidney allografts, but to suppress production of donor specific antibody.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腎移植 抗体関連型拒絶反応 免疫グロブリン

1. 研究開始当初の背景

腎移植領域では、近年の免疫抑制療法の進歩に伴い、効率に抗体関連方拒絶反応 (AMR) を起こすため、移植腎予後が不良とされる抗ドナー抗体陽性症例に対しても、様々な脱感作療法を行い腎移植が試みられている。その有効な対策の一つに免疫グロブリン静注 (IVIg) 療法がある。IVIg は自己免疫疾患や炎症性疾患で有効性が認められ、臓器移植領域においてもその効果が期待され 1990 年代から応用された。自己免疫疾患や炎症性疾患の分野では、IVIg の効果を探るために多くの研究が行われ、様々な作用機序が解明されているが、抗ドナー抗体産生制御や AMR 抑制の機序に関しては、これらの分野での研究で導かれた結果を参考にされることが多く、臓器移植の分野での研究報告は比較的少ない。注目される作用機序の一つとして、Ravetch らが報告したマクロファージや B 細胞上の抑制性 FcR である Fc γ RIIB を介するものである。IVIg により Fc γ RIIB の発現が亢進し、これにより細胞増殖抑制や誘導が起こり、その結果としてマクロファージや B 細胞の機能を制御するというものである。さらに IVIg の抗炎症作用は、約 1~3% に認められるシアル化された Fc フラグメント (sFc) により誘導されるが、sFc は生体内で IVIg と比して約 35 倍の抗炎症作用を有することが確認されている。そのため、実臨床では、5% グロブリン製剤の 1~2g/kg を静脈内投与で使用しており、大量投与が必要となる。しかし、腎移植前の透析管理で水分制限中の患者や、術後の重度拒絶反応により尿量低下を認める患者に対して、大量に投与するには、溢水や心不全発症の危険性もあり嚴重な循環動態のモニタリングが必要であり、もし sFc が臨床応用可能となれば、輸液の大幅な減量が期待される。またこれらの作用機序に関しても臓器移植モデルを用いて

検討した報告はなく、ラット同種腎移植モデルを用いて精製した sFc による抗ドナー抗体産生の制御および拒絶反応の抑制効果を検討する意義は大きいと考える。

2. 研究の目的

前感作ラット腎移植急性 AMR モデルを用いて、sFc による B 細胞活性化抑制および抗ドナー抗体 (DSA) 産生抑制効果を検討する。移植免疫における sFc によるマクロファージおよび B 細胞の機能抑制を確認するためには、小動物実験モデルでの検討は不可欠である。特に、機能性臓器移植モデルを用いて、sFc の至適濃度の探索およびその投与方法と安全性についても検討する。また、腎移植での免疫グロブリン (Ig) の脱感作療法における作用機序についても、解明されておらず、各実験系で Ig 投与による効果も評価し、sFc と Ig の免疫制御効果についても比較検討する。

3. 研究の方法

前感作ラット腎移植急性 AMR モデルの作成を行った。ドナーラット (Brown Norway : BN) の皮膚をレシピエントラット (LEWIS : LEW) に移植し感作させることで、ドナー MHC に対する抗体を産生させた。続いて、LEW ラットの左腎を摘出し、そこへ BN ラットの左腎を移植、最後に LEW ラットの右腎を摘出し、AMR モデルを作成した。そのモデルに、sFc と Ig を投与し、生着率 (生存率) を求めることにより、至適投与量や作用機序について検討を行った。

4. 研究成果

皮膚移植 2 週間後に DSA の産生を確認するために、レシピエントの血清と BN ラットの胸腺から分離した T リンパ球を混合培養し、フローサイトメトリー (MESF 法) を用いて、DSA の産生を確認した。過去の文献により、

DSAがMESF値>3000以上に上昇したラットをAMRモデルとして使用することとした。BN-LEW間で腎移植した非感作モデル(皮膚移植なし)、感作モデル(皮膚移植あり)のそれぞれの平均生着率は10.4日(n=5)、4.25日(n=4)(P<0.01)であった。分割と一括により移植前後でIgを腹腔内投与する群を作成したところ、Igを腎移植後に2g/kgを一括投与する治療モデル群で生存率が最も延長したため、検討に適したモデルであると判断した(図1)。

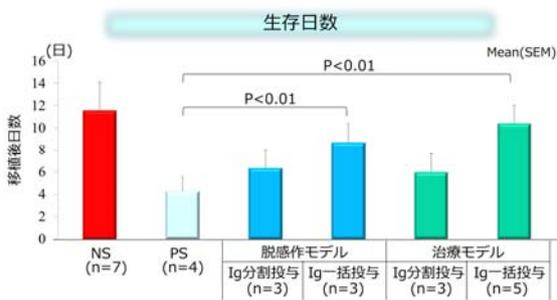


図1: 移植生存日数

しかし、sFcを投与したモデルでも同様の検討を行ったが、安定した実験結果が得られず、供給先の一般社団法人日本血液製剤機構中央研究所からFc部の安定したシアル化ができず製剤の提供が困難との報告を受け、sFcによる検討は断念した。Ig一括投与する治療モデル群における移植腎の病理組織学的所見は、無治療群と比較し、炎症所見やC4d沈着が有意に抑制されていた(図2)。

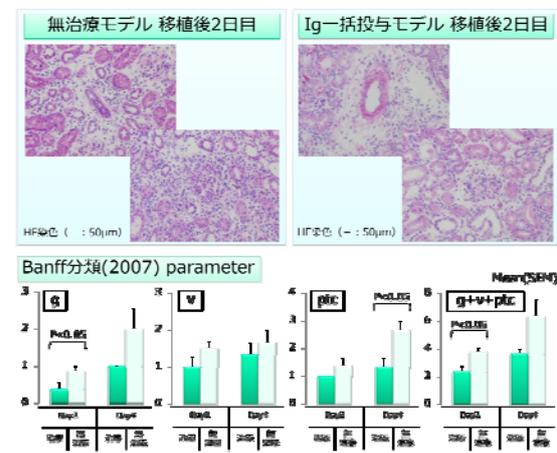


図2: 移植腎病理組織像

抗原抗体反応の結果、活性化する補体古典経路の補体因子(C1q、C3、C9)について、real-time PCRで移植腎におけるmRNAの発現について検討したところ、治療モデル群で補体因子(C1qとC3)の発現が有意に抑制されていた(図3)。

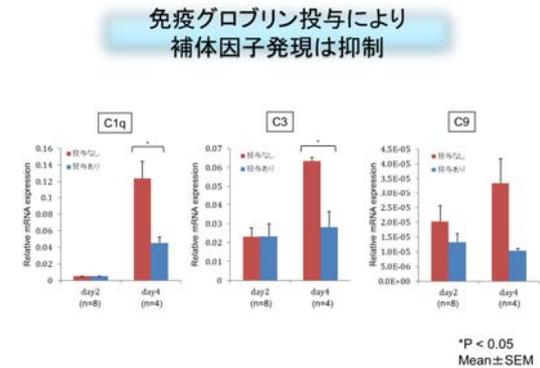


図3: 補体因子の発現

また皮膚移植後のレシピエントラット(腎移植前)に免疫グロブリンを投与することにより、DSAの産生が抑制されることが確認された(図4)。

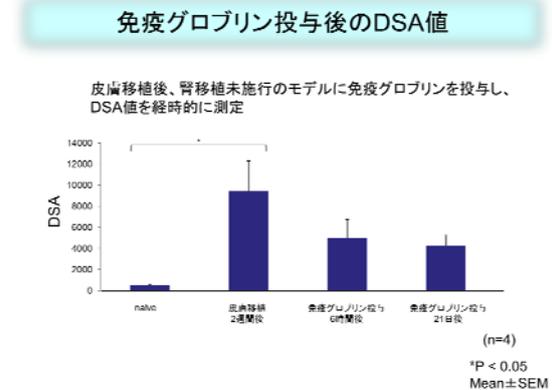


図4: DSAの変遷

以上の結果から、前感作ラット腎移植急性AMRモデルを確立し、Ig投与による治療効果を確認した。今後さらなるIgの移植腎における作用機序を解明する上で有用なモデルを確立した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計26件)

1. Okumi M, Scalea JR, Gillon BC, Tasaki M, Villani V, Cormack T,

- Hirakata A, Shimizu A, Sachs DH, Yamada K.
The induction of tolerance of renal allografts by adoptive transfer in miniature Swine.
Am J Transplant. 2013; 13: 1193-202.
2. Tsuda H, Yamahara K, Otani K, Okumi M, Yazawa K, Kaimori JY, Taguchi A, Kangawa K, Ikeda T, Takahara S, Isaka Y.
Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protect against ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury.
Cell Transplant. 2014; 23: 889-99
 3. Kaimori JY, Iwai S, Hatanaka M, Teratani T, Obi Y, Tsuda H, Isaka Y, Yokawa T, Kuroda K, Ichimaru N, Okumi M, Yazawa K, Rakugi H, Nonomura N, Takahara S, Kobayashi E.
Non-invasive magnetic resonance imaging in rats for prediction of the fate of grafted kidneys from cardiac death donors.
PLoS One. 2013; 8: e63573.
 4. Vallabhajosyula P, Hirakata A, Shimizu A, Okumi M, Tchipashvili V, Hong H, Yamada K, Sachs DH.
Assessing the effect of immunosuppression on engraftment of pancreatic islets.
Transplantation. 2013; 96: 372-8.
 5. Osawa S, Hosokawa Y, Soda T, Yasuda T, Kaneto H, Kitamura T, Kozawa J, Otsuki M, Imagawa A, Okumi M, Miyagawa Y, Nonomura N, Shimomura I.
Juxtaglomerular cell tumor that was preoperatively diagnosed using selective renal venous sampling.
Intern Med. 2013; 52:1937-42.
 6. Obi Y, Hamano T, Ichimaru N, Tomida K, Matsui I, Fujii N, Okumi M, Kaimori JY, Yazawa K, Kokado Y, Nonomura N, Rakugi H, Takahara S, Isaka Y, Tsubakihara Y.
Vitamin D Deficiency Predicts Decline in Kidney Allograft Function: A Prospective Cohort Study.
J Clin Endocrinol Metab. 2014; 99: 527-35.
 7. Wang Y, Ichimaru N, Kyo M, Kakuta Y, Okumi M, Kaimori JY, Nonomura N, Fan Y, Takahara S.
Beneficial Effects of Tonsillectomy for Mesangial Immunoglobulin A (IgA) Deposition and Clinical Outcome in Five Kidney Transplant Patients With Recurrent IgA Nephropathy: Case Report.
Transplant Proc. 2014; 46: 607-9.
 8. Yamanaka K, Kyo M, Okumi M*, Kato T, Kakuta Y, Ichimaru N, Takahara S, Nonomura N.
The impact on graft survival of interstitial inflammation in borderline change of allograft kidneys.
Nephrology. 2014; 19 Suppl 3:17-20.
 9. Kato T, Okumi M*, Tanemura M, Yazawa K, Kakuta Y, Yamanaka K, Tsutahara K, Doki Y, Mori M, Takahara S, Nonomura N.
Adipose tissue-derived stem cells suppress acute cellular rejection by TSG-6 and CD44 interaction in rat kidney transplantation.
Transplantation. 2014; 98: 277-84

10. Scalea JR, Okumi M, Villani V, Shimizu A, Nishimura H, Gillon BC, Torabi R, Cormack T, Moran S, LeGuern C, Sachs DH, Yamada K. Abrogation of Renal Allograft Tolerance in MGH Miniature Swine: The Role of Intra-Graft and Peripheral Factors in Long-Term Tolerance. *Am J Transplant*. 2014; 14: 2001-10
11. Kojima Y, Takahi Y, Ichimaru N, Okumi M, Takahara S, Nonomura N. Successful treatment of metastatic urothelial carcinoma arising in a transplanted renal allograft with paclitaxel, cisplatin, and gemcitabine combination therapy: a case report. *BMC Res Notes*. 2015; 8: 25.
12. Kato T, Kakuta Y, Yamanaka K, Okumi M, Abe T, Imamura R, Ichimaru N, Takahara S, Nonomura N. Early diagnosis and treatment of breast cancer in Japanese kidney transplant recipients: a single center experience. *Springerplus*. 2015; 4: 196
13. Unagami K, Kawanishi K, Shimizu T, Kanzawa T, Toki D, Okumi M, Omoto K, Horita S, Koike J, Honda K, Nagashima Y, Ishida H, Tanabe K, Nitta K. A case of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after kidney transplantation associated with variant conversion in the Columbia classification. *Nephrology (Carlton)*. 2015 Jul;20 Suppl 2:96-100.
14. Hasegawa J, Honda K, Wakai S, Shirakawa H, Omoto K, Okumi M, Ishida H, Tanabe K. Plasma Cell-Rich Rejection After Kidney Transplantation and the Role of Donor-Specific Antibodies: A Case Report and Review of the Literature. *Transplant Proc*. 2015; 47: 2533-6
15. Okumi M, Toki D, Nozaki T, Shimizu T, Shirakawa H, Omoto K, Inui M, Ishida H, Tanabe K. ABO-incompatible Living Kidney Transplants: Evolution of Outcomes and Immunosuppressive Management *Am J Transplant*. 2016; 6: 886-96.
16. Ishihara H, Ishida H, Toki D, Omoto K, Shirakawa H, Shimizu T, Okumi M, Tanabe K. Effects of Low-Dose Rituximab Therapy in Patients With Primary Cytomegalovirus Infection. *Exp Clin Transplant*. 2015;13: 573-80.
17. Kato T, Kakuta Y, Abe T, Yamanaka K, Imamura R, Okumi M, Ichimaru N, Takahara S, Nonomura N. The benefits of cancer screening in kidney transplant recipients: a single-center experience. *Cancer Med*. 2016; 5: 153-8.
18. Yagisawa T, Okumi M*, Omoto K, Sawada Y, Morikawa S, Tanabe K. Novel approach for bladder cancer treatment using sulfoquinovosylacylpropanediol as a radiosensitizer. *Int J Urol*. 2016; 23: 270-2.
19. Okumi M, Omoto K, Unagami K, Ishida H, Tanabe K. Eculizumab for the treatment of atypical hemolytic uremic syndrome

- recurrence after kidney transplantation associated with complement factor H mutations: a case report with a 5-year follow-up. *Int Urol Nephrol*. 2016; 48: 817-8
20. Yamanaka K, Kakuta Y, Miyagawa S, Nakazawa S, Kato T, Abe T, Imamura R, Okumi M, Maeda A, Okuyama H, Mizuno M, Nonomura N. Depression of Complement Regulatory Factors in Rat and Human Renal Grafts Is Associated with the Progress of Acute T-Cell Mediated Rejection. *PLoS One*. 2016 Feb 29;11(2):e014881
21. Ishihara H, Shimizu T, Unagami K, Hirai T, Toki D, Omoto K, Okumi M, Imai Y, Ishida H, Tanabe K. Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder in Kidney Transplant Recipients: A Single-Center Experience in Japan. *Ther Apher Dial*. 2016;20: 165-73.
22. Toki D, Inui M, Ishida H, Okumi M, Shimizu T, Shirakawa H, Omoto K, Unagami K, Setoguchi K, Koike J, Honda K, Yamaguchi Y, Tanabe K. Interstitial Fibrosis is the Critical Determinant of Impaired Renal Function in Transplant Glomerulopathy. *Nephrology (Carlton)*. 2016 Mar 10.
23. Ikeda T, Okumi M*, Unagami K, Kanzawa T, Sawada A, Kawanishi K, Omoto K, Ishida H, Tanabe K. Two cases of kidney transplantation-associated thrombotic microangiopathy successfully treated with eculizumab. *Nephrology (Carlton)*. 2016 Mar 10.
24. Odani K, Okumi M*, Honda K, Ishida H, Tanabe K. Kidney transplantation from a mother with unrecognized Fabry disease to her son with low α -galactosidase A activity: A 14-year follow-up without enzyme replacement therapy. *Nephrology (Carlton)*. 2016 Mar 12.
25. Okumi M, Tanabe K. Prevention and treatment of atypical hemolytic uremic syndrome after kidney transplantation. *Nephrology (Carlton)*. 2016 Mar 14.

[学会発表] (計 4 件)

1. 第 102 回日本泌尿器科学会総会
平成 26 年(2014 年)4 月 24 日~4 月 27 日
神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
 2. 第 50 回移植学会総会
平成 26 年(2014 年)9 月 10 日~9 月 12 日
京王プラザ(東京都新宿区)
 3. 第 41 回 臓器保存生物医学会
平成 26 年(2014 年)11 月 28 日~29 日
千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)
 4. 第 51 回 日本移植学会総会
平成 27 年(2015 年)10 月 1 日~3 日
ホテル日航熊本(熊本県熊本市)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 奥見 雅由 (OKUMI MASAYOSHI)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 60512978