

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462457

研究課題名(和文) ABO血液型不適合移植腎障害におけるADAMTS13、vWFと免疫学的順応

研究課題名(英文) ADAMTS13, vWF and Immunological accommodation in renal injury after ABO-incompatible kidney transplantation

研究代表者

齋藤 和英 (Saito, Kazuhide)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：20262438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ABO血液型不適合腎移植では多くの症例で免疫学的順応が成立するが、その成立維持機構は不明である。一方いまだに一部の症例では抗体関連拒絶反応や血栓性微小血管障害による腎障害がoccur。われわれはこの現象に着目しグラフト側因子としての腎血管内皮血液型糖鎖抗原とアンカー蛋白であるPECAM-1、vWF、ADAMTS13の役割について明らかにするとともに、レシピエント側因子として、免疫学的順応成立患者においてはドナー血液型抗原特異的な抗体産生の抑制が起こっていること、その本態はB細胞性アナジー(免疫学的不応答性)誘導の結果であることを新たに見出し、免疫学的順応誘導機構の解明に一步近づいた。

研究成果の概要(英文)：It has been still unknown that the establishment and maintenance mechanism of immunological accommodation after ABO-incompatible kidney transplantation. Even now, antibody mediated rejection(AMR) and/or thrombotic microangiopathy(TMA) sometimes occurs in several cases. We have focused on the graft factor in which kidney endothelium express the blood type carbohydrate antigen with specific anchor proteins such as PECAM-1, vWF, ADAMTS-13 that is quite different from RBCs, which play a critical role in prevention of AMR and/or TMA and induction of accommodation. On the other hand, we have also found the recipient factor in which the donor-blood type specific inhibition of antibody production. We have approved it both in vivo and in vitro study. B cells derived from the patients have revealed that the immunological unresponsiveness, so-called B cell anergy against donor blood type antigen, which might be the real feature of the accommodation after ABO-incompatible kidney transplantation,

研究分野：泌尿器科学

キーワード：ABO血液型不適合腎移植 免疫学的順応 抗体関連型拒絶反応 血栓性微小血管障害 ADAMTS13 vWF
免疫学的不応答性 PECAM-1

1. 研究開始当初の背景

ABO 血液型不適合腎移植は免疫学の常識を覆し高い成功率と長期移植腎生着を達成している。しかし移植腎血管内皮細胞表面に発現する血液型組織抗原とレシピエント血中の抗 A 抗 B 血液型抗体による抗原抗体反応と補体活性化による移植腎障害(抗体関連型拒絶反応: antibody-mediated rejection(AMR))が回避され、免疫学的順応が誘導され長期生着が導かれる機構は不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、われわれが初めて解明した「腎血管内皮細胞における血液型糖鎖抗原は赤血球とは異なり、vWF, PECAM-1 などのアンカー蛋白と結合している」事実より、ABO 血液型不適合腎移植における免疫学的順応には vWF(第 VIII 因子)、ADAMTS13 活性の関与が重要なカギを握っているとの仮説に基づいて血清学的・免疫組織学的・細胞生物学的検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体における ADAMTS13 の検討

ドナー・レシピエントにおける ADAMTS13 活性インヒビター活性の検討 (ELISA)

ADAMTS13 活性低下例における遺伝学的解析

移植腎生検組織における ADAMTS13, vWF の発現に関する免疫組織学・プロテオーム解析

(2) In Vitro 腎微小血管内皮細胞培養系における ADAMTS13 の検討

培養血管内皮細胞への抗 A 抗 B 抗体暴露による A, B 血液型糖鎖抗原発現の定量的解析

培養腎微小血管内皮細胞に対する抗 A 抗 B 抗体暴露に対する vWF 3 鎖形成と ADAMTS13 添加による障害作用の検討

培養血管内皮細胞障害時の抗体濃度・暴露時間と補体制御因子(DAF)、ERK 発現の定量的解析

4. 研究成果

新潟大学で1988年3月から2018年1月までの

間に行ったABO不適合腎移植90例中、4例にAMRが発生し3例が移植腎機能を喪失した。血栓性微小血管症thrombotic microangiopathy (TMA)は5例に発生し、2例が移植腎機能を喪失した。これらの移植腎組織では補体系の活性化、IgG, IgM沈着、vWF凝集, fibrin血栓の広範な形成、血管内皮細胞の障害・脱落・ドナー血液型抗原の喪失などが見られ抗血液型抗体がAMR・TMA発生の誘因と考えられた。TMA症例では血清中ADAMTS13活性の著明な低下を観察した。AMR・TMAは抗ドナー血液型抗体が血管内皮細胞の血液型抗原に結合し、そのアンカー蛋白であるPECAM1やvWFを介してvWF凝集、ADAMTS13の消費と血小板血栓、Fibrin血栓形成で微小血管障害から生じる可能性が示唆された。しかし血清中に抗ADAMTS13抗体やインヒビターの存在は確認できず、ADAMTS13の遺伝子変異も認めなかったため、ADAMTS13活性の一過性低下は少なくとも今回の症例におけるAMR・TMAの原因ではなく結果である可能性が高くなった。

そこで研究の方向性を一考した。われわれは免疫学的順応が成立した患者の臨床的検討でドナー血液型に対する抗体価が低値を維持している現象に着目した。そこで健常人ボランティアおよびABO血液型不適合腎移植後に臨床的に免疫学的順応が誘導されていると考えられた患者の末梢血単核球をインフォームドコンセント(倫理委員会承認)の上で採取・培養し、末梢血リンパ球の調節性B細胞と推測される細胞集団(IL-10産生B細胞、CD24+CD38+B細胞、CD5+B細胞)を解析した。IL-10産生B細胞は採取した末梢血リンパ球をCpGで刺激培養し48日目に回収したのちCD19+IL-10+の細胞を解析した。CD24+CD38+B細胞、CD5+B細胞は末梢血B細胞中の陽性率で解析を行った。その結果、Bリンパ球培養系においてもABO血液型不適合腎移植後に免疫学的順応が誘導されている患者においてのみ、抗ドナー血液型抗体産生が特異的に抑制され

ていることを見出した。末梢血中の調節性B細胞と推測される細胞集団(IL-10産生B細胞、CD24+CD38+B細胞、CD5+B細胞)をABO不適合群・適合群、健常者の3群で比較すると、不適合群ではアナジー(免疫学的不応答性)に陥った末梢血CD5+B細胞が有意に多く、繰り返す抗原刺激によりアナジーに陥り抗体産生が抑制されることが推測された。

しかし実臨床では高抗体価でもAMR・TMAを惹起しない症例と低抗体価でも惹起する症例があり、血管内皮細胞表面の血液型糖鎖抗原アンカー蛋白の構造的多様性とそれに対応する患者血清中の抗血液型抗体の多様性と特異性の存在が推測された。そこでHEK293細胞膜上に血液型糖鎖とCD31(PECAM-1)を共発現させた細胞を作成し、抽出糖鎖を固相化した糖鎖アレイを開発した。本アレイにより従来の標準赤血球による抗血液型抗体価測定では峻別が難しかった、腎傷害性の高い抗体を測定できる可能性が示唆された。

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5件)

1. Tasaki M, Saito K, Nakagawa Y, Imai N, Ito Y, Aoki T, Kamimura M, Narita I, Tomita Y, Takahashi K. Acquired Downregulation of Donor-Specific Antibody Production After ABO-Incompatible Kidney Transplantation. *Am J Transplant.* ;17(1):115-128:2017. doi: 10.1111/ajt.13937.
2. Nakagawa Y, Ikeda M, Ando T, Tasaki M, Saito K, Takahashi K, Aikawa A, Kikuchi M, Akazawa K, Tomita Y. Re-evaluating Cut-off Points for the Expansion of Deceased Donor Criteria for Kidney Transplantation in Japan *Transplant Proc.* ;49(1):10-15. 2017. doi: 10.1016/j.transproceed.
3. Takahashi K, Saito K, Takahara S, Fuchinoue S, Yagisawa T, Aikawa A, Watarai Y, Yoshimura N, Tanabe K, Morozumi K, Shimazu M;

IDEC-C2B8 ABO-I KTx Study Group.

Results of a multicenter prospective clinical study in Japan for evaluating efficacy and safety of desensitization protocol based on rituximab in ABO-incompatible kidney transplantation.

Clin Exp Nephrol.;21(4):705-713.2017.

doi: 10.1007/s10157-016-1321-5.

4. Ikeda M, Tsukada N, Chikai H, Tasaki M, Saito K, Nakagawa Y, Takahashi K, Suzuki K. Successful Second Allogeneic Stem Cell Transplantation From a Sibling Donor for Relapse of Myelodysplastic Syndrome in a Recipient of a Renal Transplant From His Mother: Case Report.

Transplant Proc.;48(9):3085-3087.2016.

doi: 10.1016/j.transproceed.

5. Sugiyama K, Tsukaguchi M, Sasahara H, Isogai K, Toyama A, Satoh H, Saito K, Nakagawa Y, Takahashi K, Tanaka S, Onda K, Hirano T.

Relationship between the Peripheral Lymphocyte Response to Mycophenolic Acid in vitro and the Level of ATP in Peripheral CD4+ Lymphocytes before and after Renal Transplantation.

Drug Res (Stuttg.);65(12):629-34.2015.

doi: 10.1055/s-0034-1395686.

[学会発表](計4件)

1. 齋藤和英, 柳瀬雅裕, 田崎正行, 中川由紀, 池田正博, 富田善彦
既存抗体陽性例の腎移植も積極的に実施を検討すべきである
第33回 腎移植血管外科研究会 2017年7月
2. 齋藤和英
ABO血液型不適合腎移植における安全性
第53回 日本移植学会総会 2017年9月
3. 田崎正行, 齋藤和英, 中川由紀, 池田正博, 高橋公太, 富田善彦
ABO血液型不適合腎移植におけるB細胞の関与
第53回 日本移植学会総会 2017年9月
4. 田崎正行, 齋藤和英, 中川由紀, 佐藤隆、館野浩章、牛木隆志、高橋公太、富田善彦
ABO血液型不適合腎移植の減感作療法：基礎研究の観点からの血漿交換回避プロトコルの妥当性
第51回日本臨床腎移植学会 2018年2月

[図書](計1件)

KOTA TAKAHASHI(Editor)

KOTA TAKAHASHI, KAZUhide SAITO, YUKI NAKAGAWA, MASAYUKI TASAKI, (Contributer)

ABO-INCOMPATIBLE KIDNEY TRANSPLANTATION MPVING TOWARD A COMPREHENSIVE AND SOUND APPROACH TO KIDNEY TRANSPLANTATION

Elsevier, 2015, Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, Philadelphia, San Diego, St. Louis, Tokyo.

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤和英 (SAITO Kazuhide)

新潟大学大学院・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：20262438

(2) 研究分担者

中川由紀 (NAKAGAWA Yuki)

新潟大学大学院・医歯学総合病院・助教

（現 新潟大学地域医療教育センター魚沼
基幹病院・講師）

研究者番号：70422607