

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 25 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462458

研究課題名(和文) 移植腎グラフトにおける抗体抵抗性生存シグナル誘導による慢性拒絶反応の予防

研究課題名(英文) The prevention against chronic antibody mediated rejection on graft endothelial

研究代表者

岩崎 研太 (Iwasaki, Kenta)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10508881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：DSAの種類によって予後経過が異なることから、免疫順応という概念が生まれた。申請者らは少量のHLA抗体接着であればHO-1やFerritinといった細胞保護遺伝子が誘導されること、さらに内皮細胞の活性化に關与するERK分子の不活性化と補体制御因子の誘導がAB抗体接着で引き起こされることを明らかにしてきた。また、ABO不適合移植患者では適合患者と比べHLA class II DRに対するde novo DSAの出現頻度が少ないこと、in vitro ではanti-A/B抗体接着は、内皮細胞においてHLA class DRの発現を低下させることを最近明らかにし報告した。

研究成果の概要(英文)：Donor-specific antibody (DSA), particularly against HLA class II, is a major cause of chronic antibody-mediated rejection (CAMR) after transplantation, although ABO-incompatible kidney transplantation has recently demonstrated favorable graft outcomes. The condition of no injury even in the presence of anti-donor antibody has been referred to as “accommodation”, which would be one of the key factors for successful long-term graft survival. The purpose of this study was to analyze the beneficial effect of anti-blood group A/B antibody ligation on endothelial cells against HLA-DR antibody-mediated, complement-dependent cytotoxicity (CDC). Pre-incubation with anti-blood group A/B antibody had resistance to HLA-DR antibody-mediated CDC. This finding was ascribed to decreased expression of HLA-DR by post-translational regulation and increased expression of CD55/59, which was related to ERK and mTOR pathway inhibition.

研究分野：移植免疫

キーワード：移植免疫 免疫順応 腎移植 シグナル伝達 細胞保護

1. 研究開始当初の背景

これまで禁忌と言われた血液型不適合移植・HLA不適合移植も、良質な免疫抑制剤を背景に行われるようになった。一方、移植後の短期生着率は95%を超えるが、長期生着率は改善の余地がある。臓器生着を拒む要因は、抗ドナーHLA抗体(Donor Specific Antibody: DSA)による抗体関連型拒絶反応(Chronic Antibody Mediated Rejection: CAMR)である。移植後10~30%の患者でDSAの産生を認め、CAMRの要因となる。

Rituximab/Bortezomib/IVIgなどによる血中DSAの低下が試みられているが、十分な効果が得られていない。そこでCAMRを防ぐための手段として「抗体反応抵抗性を獲得」したグラフトに誘導できないかと考え、申請者は免疫順応(抗体が接着し補体活性がみられるにもかかわらず、移植臓器が傷害をうけない状態)におけるシグナル伝達経路制御の重要性について研究してきた。これまで、異種移植、ABO血液型不適合移植で免疫順応が報告されてきたが、現段階ではその本質をつかむまでには至っていない。世界では免疫順応を理解するために、抗体接着が引き金となる内皮細胞の変化を、分子生物学的手法によって正確に理解する試みがされつつある。

DSAの種類によって予後経過が異なることから、免疫順応という概念が生まれた。免疫順応に関して世界ではある共通した理解【DSAの接着によるシグナル伝達の活性化が細胞保護効果があること】が提唱されている。特にPI3K/AKT経路(細胞保護)と、ERK(内皮細胞活性化経路)は特に注目されてきた。一方で、実際の移植医療で、これらシグナル分子を制御する薬剤は無いに等しい。そこで将来の新たな治療薬探索の可能性の一つとして、細胞のエネルギーセンサーの役割を担うAMPKに着目した。特にポリフェノールであるResveratrolによってAMPKや転写因子KLF2を介して細胞保護遺伝子・補体制御遺伝子が活性化されることで、抗体に依存した補体障害を軽減することを最近報告した。

2. 研究の目的

移植臓器の長期生着には「抗体が接着し、補体の活性化が見られるにもかかわらず傷害をうけない:免疫順応」の理解とその誘導法が必要不可欠である。申請者はこれまで内皮細胞に対する抗HLA抗体接着はPI3K/AKT経路の活性化、血液型A/B抗体はERKの不活性化が補体傷害の抵抗性を獲得することを主に*in vitro*を中心に明らかにし、細胞のエネルギー代謝調節分子であるAMPKや転写因子KLF2が免疫順応誘導に関与する可能性も示した。慢性抗体関連型拒絶反応の原因となる抗HLA抗体産生を完全に制御することは現実的に困難であり、抗体産生後の対策を講じる必要がある。グラフト側の抵抗性獲得という移植医療に新局面を展開すべく、シグナル分

子研究をさらに発展させ、抗体反応抵抗性因子を同定し、臨床応用可能な誘導法を開発する。

3. 研究の方法

in vitro 内皮細胞にて免疫順応遺伝子・miRNAの発現メカニズムを解明する。凝固系に関して、EPCR(Endothelial cell Protein C receptor)、Thrombomodulin(TM)の役割が大血管と微小血管で異なるため、2種類の内皮細胞;ヒトの大動脈内皮細胞(Human Aortic Endothelial Cell; HAEC)と肺毛細血管(Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cell; HPMEC)を用意する。さらに我々が樹立したA/B糖鎖発現内皮細胞EA.hy926も用いる。miRNAの移入・阻害が免疫順応にどのような影響を与えるかについても検討する。シグナル伝達経路に関しては、検討する対象タンパク質の抗体はCell Signaling社もしくはSanta cruz社より販売されており、Western blottingもしくはImmunohistochemistryにより観察可能である。また阻害剤やsiRNAなどの方法を用いてシグナル経路の制御を試みる。さらにそれらシグナル伝達の下流にあり、免疫順応遺伝子を誘導・抑制する転写因子の同定も試みる

4. 研究成果

申請者は少量のHLA抗体接着であればHO-1やFerritinといった細胞保護遺伝子が誘導されること、さらに内皮細胞の活性化に関与するERK分子の不活性化と補体制御因子の誘導がAB抗体接着で引き起こされることを明らかにした。我々のグループにおいて、ABO不適合移植患者では適合患者と比べHLA class II DRに対する*de novo* DSAの出現頻度が少ないことがわかった。anti-A/B抗体接着による新たなシグナル伝達としてmTORを同定した。内皮細胞におけるHLAの発現は、定常状態ではHLA class Iは出ているものの、HLA class II DR/DQ(HLA DR/DQ)は殆ど発現していない。そこで、内皮細胞をIFN-gammaで刺激し、それら分子を強発現させた。IFN-gammaで2~3日間刺激し、HLA class I/DR/DQ抗原を内皮細胞上に発現上昇させる実験系にて、anti-A IgM抗体接着をさせその影響について検討した。anti-A抗体接着でHLA class I/DRの発現が低下すること、さらにその際mTORの活性化を抑制することが明らかとなった。anti-A抗体によるHLAの発現制御は翻訳制御であり、HLA DRの発現に関わるCIITA(class II transactivator)やHLA DRのmRNAには影響を及ぼさなかった。IFN-gamma刺激下ではanti-HLA抗体による細胞傷害が上昇するが、anti-A抗体接着によりその傷害を軽減していた。mTOR阻害剤であり、免疫抑制剤として

使用されている Everolimus を使用し、HLA の発現制御における影響を検討したところ、HLA DR のみに影響を及ぼしていた。HLA class I に関しては、mTOR 阻害剤の影響を受けず、細胞障害を軽減することはできなかった。

腎移植における慢性抗体関連型拒絶反応 (CAMR) の早期発見と内皮細胞レベルでのイベントの解明は、長期生着には必須である。今回以下 2 つの研究を行った。

a) microRNA (miRNA) は 20 数 bp の小分子 RNA であり、血清・血漿中エクソソームに存在する miRNA と、様々な疾患との関連性が報告されている。本研究では、血清・血漿中の miRNA 情報が腎移植後の DSA 産生と CAMR の早期診断の有用性を検討する目的で、名古屋第二赤十字病院・増子記念病院の患者を、Group 1 (腎機能安定、DSA(-): n=21)、Group 2a (腎機能安定、DSA(+), 腎生検 CAMR(-): n=11)、Group 2b (腎機能安定、DSA(+), CAMR(+): n=11)、Group 3 (腎機能悪化、DSA(+), CAMR(+): n=11) の 4 群に分類し、マイクロアレイ解析を行った。miRNA の測定は Exiqon 社の SYBR GREEN 法にて測定した。

b) 現在我々が使用できる biopsy サンプルを用いてアレイ解析を行った。サンプルは約 1 mm x 1 mm x 0.2 mm である。患者群を以下の 3 つのグループに分ける。

- i) ABO 適合で拒絶反応無し(コントロール)
- ii) ABO 不適合症例で拒絶反応無し(免疫順応状態)
- iii) ABO 適合症例で subclinical CAMR (拒絶)

それぞれ移植 1 年後のプロトコール biopsy サンプルを、各グループ 10 人程度用意する。これら検体を用いてアレイ解析を行った。

a) 血清・血漿中 miRNA は採取後時間経過したサンプルにおいても安定に発現していた。マイクロアレイの結果、Group 1 に比べ DSA 陽性群 (2a/2b/3) で 22 種類の miRNA (DSA 産生時

に変動)、また Group 2a に比べ Group 2b で 20 種類 (腎生検による診断と相関関係) の 2 倍以上の発現変動を示した miRNA を同定した。特に DSA 陽性かつ CAMR 患者で miR-142-3p, miR-1913, miR-374-5p が優位に高値となることが示唆された。

b) 拒絶反応群では HLA class II 関連遺伝子の上昇がみられた。補体制御因子・細胞保護遺伝子・凝固遺伝子に大きな差はなかった。ABO 不適合で予後良好の患者において (本研究 Group ii) 転写抑制因子である Bach1 の発現上昇がみられた。

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 2 件)

Negative regulation of HLA-DR expression on endothelial cells by anti-blood group A/B antibody ligation and mTOR inhibition.

Iwasaki K, Miwa Y, Uchida K, Kodera Y, Kobayashi T.

Transpl Immunol. 2017 Feb;40:22-30.

MiR-142-5p and miR-486-5p as biomarkers for early detection of chronic antibody-mediated rejection in kidney transplantation.

Iwasaki K, Yamamoto T, Inanaga Y, Hiramitsu T, Miwa Y, Murotani K, Narumi S, Watarai Y, Katayama A, Uchida K, Kobayashi T.

Biomarkers. 2017 Feb;22(1):45-54.

[学会発表] (計 5 件)

2015/9/10~12 第 24 回日本組織適合性学会、水戸、ポスター、翻訳後修飾による抗 A/B 抗体接着を介した内皮細胞上 IFN 誘導性 HLA class II DR の発現減少

2015/11/15~19 IXA、メルボルン、オーラル、Human Endothelial Cell Activation through ERK by Non-Gal Antibody

2016/2/20 第 18 回 日本異種移植研究会、

長崎、オーラル、ERK と mTOR を標的とした
Non-Gal・HLA・ABO 抗体関連型拒絶反応制御

()

2016/8/18~23 26th TTS Hong Kong、オー
ラル、The preventative effect of mTOR
inhibition by anti-A/B antibody ligation
and mTOR-inhibitor on anti-HLA-DR
antibody mediated complement dependent
cytotoxicity.

2016/11/26~27 第 43 回日本臓器保存生物
医学会、東京、オーラル、mTOR 経路の阻害に
より IFN 誘導性の HLA class II DR の発現
を抑制する

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

岩崎研太(Iwasaki kenta)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10508881

(2) 研究分担者

小林孝彰(Kobayashi Takaaki)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：70314010

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者