

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861036

研究課題名(和文) Luminex法を用いた臓器移植後抗HLA抗体の慢性拒絶反応における役割の解明

研究課題名(英文) The role of post-transplant anti-HLA antibodies in chronic rejection.

研究代表者

戸子台 和哲 (Tokodai, Kazuaki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50581641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：移植後抗HLA抗体のスクリーニングを小児肝移植患者を対象として広く行い、その頻度やリスク因子を解析し明らかにした。抗HLA抗体陽性となるリスク因子について検討を行い、移植時年齢が3歳未満の症例ではドナー特異的抗HLA抗体の陽性率が高いことを明らかにした。このことにより、幼児期に肝移植を受けた患者には、積極的に抗体スクリーニングを行うことが妥当であると考えられた。さらに、スクリーニング範囲を小児肝臓移植患者全体に広げ、多変量解析を行うことにより、移植時年齢と抗HLA抗体出現が関連を認めた機序として、免疫抑制剤の維持量が独立したリスク因子として認められた。

研究成果の概要(英文)：We conducted a screening of anti-HLA antibodies for patients who underwent pediatric living donor liver transplantation. In this study, we found that CNI minimization or withdrawal was an independent risk factor for DSA development and that the association between younger age and DSA development was related to reduced CNI dose for recipient growth. Additionally, subgroup analyses for patients with anti-DQ DSAs available showed that low-trough CNI was an independent risk factor for anti-class II DSA development, and that almost all high-MFI DSAs had complement-binding ability.

研究分野：臓器・細胞移植

キーワード：抗HLA抗体 慢性拒絶 小児肝移植

1. 研究開始当初の背景

新規免疫抑制剤の開発や薬剤モニタリングの進歩により臓器移植後急性拒絶反応はほぼコントロール可能となり、短期成績は飛躍的に向上した。その一方で、長期成績の向上は未だ十分でなく、その主因の1つとしてドナー特異的抗 HLA 抗体が関与する慢性抗体関連型拒絶反応に対する診断および治療が未だ確立されていないことが挙げられる。臓器移植におけるドナー不足は世界的に深刻であり、また、移植時には多額の医療費が投入されるため、慢性拒絶反応を予防もしくは診断・治療し移植臓器を長期生着させることは、臓器移植患者のみならず社会的にも意義が大きい。

近年、Luminex 法をはじめとした HLA タイピングなどの技術革新によりこれまで知りえなかった抗 HLA 抗体に関する知見が明らかになりつつあり、特に、臓器移植後にミスマッチ HLA 抗原に対し新たに産出される de novo 抗 HLA 抗体が慢性抗体関連型拒絶反応の原因として注目されている。しかし、抗 HLA 抗体に関する知見が蓄積され始めたのはここ数年のことであり、de novo 抗 HLA 抗体の産出およびその意義に関する検討は世界中の移植関連施設共通の重要課題となっている。

現在、腎移植の領域において、血中ドナー特異的抗 HLA 抗体の検出とともに補体因子 C4d の組織沈着に関する研究が多くなされ、慢性抗体関連型拒絶反応の診断基準として用いられているものの、その診断的意義については未だ議論があり、慢性抗体関連型拒絶反応に対する組織診断は腎移植の領域においても確立していない。また、ドナー特異的抗 HLA 抗体だけでなくドナー非特異的抗 HLA 抗体の存在も移植臓器不全のリスク因子と報告されており、ドナー特異的抗体より早期に検出されることが多いため、その意義を明らかにすることも極めて重要である。

肝・膵などの他臓器においても慢性抗体関連型拒絶反応により移植臓器機能低下が明らかとなってきており、その診断法の確立は急務であり、その原因となる抗 HLA 抗体を高感度でとらえることができる Luminex 法への期待は非常に大きいと言える。肝・膵・腎 3 臓器における移植後抗 HLA 抗体を経時的に測定することにより、各臓器毎の抗 HLA 抗体出現の誘因に関する知見だけでなく臓器間の相違点を比較検討することができ、さらにはそれぞれの移植臓器組織像との関連を解析し慢性抗体関連型拒絶反応の組織診断の精度向上が図れるものと期待される。

2. 研究の目的

臓器移植後抗 HLA 抗体の出現とその意義を解明し、慢性拒絶反応のメカニズムを明らかにし診断法を確立することが目的である。具体的な目的として、以下の3項目を考えている。

- (1) 臓器移植後抗 HLA 抗体を経時的に測定し、抗体出現の誘因となる事象を明らかにする。
- (2) 抗 HLA 抗体陽性症例の移植臓器組織像を解析し、慢性拒絶反応の組織学的特徴を明らかにする。
- (3) 肝・膵・腎 3 臓器間での抗 HLA 抗体出現および意義の相違点を明らかにする。

3. 研究の方法

当施設で肝、膵、腎いずれかの臓器移植を施行した臓器移植レシピエントの末梢血を用いて抗 HLA 抗体を Luminex 法で経時的に測定し、以下の項目を評価する。

- (1) 肝・膵・腎 3 臓器移植後の抗 HLA 抗体出現の誘因となる事象
- (2) 慢性抗体関連型拒絶反応の組織学的特徴
- (3) 肝・膵・腎 3 臓器間での抗 HLA 抗体出現頻度およびその特徴
- (4) 各臓器移植後の慢性拒絶反応症例におけるドナー特異的抗 HLA 抗体およびドナー非特異的抗 HLA 抗体の意義

本研究の目的であると同時に解析の基礎となるのが、臓器移植患者の抗 HLA 抗体の経時的な測定である。当科で臓器移植を施行した患者の末梢血を用いて、ドナー非特異的抗体を含めた抗 HLA 抗体を Luminex 法で経時的に解析する。同時に、拒絶の有無やグラフト機能などの臨床経過を評価し、必要に応じて移植臓器生検を行い組織像の評価を行う。この、抗 HLA 抗体・臨床経過・移植臓器組織像の3者の相関を詳細に解析することが本研究の根幹である。

抗 HLA 抗体に関するデータ蓄積をもとに、臨床経過と移植臓器組織像を解析し、(1)肝・膵・腎 3 臓器移植後の抗 HLA 抗体出現の誘因となる事象、(2)慢性抗体関連型拒絶反応の組織学的特徴、(3)肝・膵・腎 3 臓器間での抗 HLA 抗体出現頻度の相違点、(4)各臓器移植後の慢性拒絶反応症例におけるドナー特異的抗 HLA 抗体およびドナー非特異的抗 HLA 抗体の意義、について解析する。

4. 研究成果

移植後抗 HLA 抗体のスクリーニングを小児肝移植患者を対象として広く行い、その頻度やリスク因子を解析し明らかにした。この中で、抗 Class I 抗体は陽性となる頻度が極めて限定的であることを自験例でも確認できたことは、今後の抗 HLA 抗体スクリーニングにおいてその高コストを考慮し省略することの根拠になり得ると考えられた。

続いて、抗 HLA 抗体陽性となるリスク因子について検討を行い、移植時年齢が 3 歳未満の症例ではドナー特異的抗 HLA 抗体の陽性率が高いことを明らかにした。Table 1 は移植時年齢別の患者背景、Table 2 は抗 HLA 抗体の陽性率を示している。3 歳以上の症例ではドナー特異的抗 Class II 抗体の陽性率は 11% であったのに対し、3 歳未満の症例では 40% を超える陽性率であった。

Table 1

Variable	Age at LT <3 y (n=12)	Age at LT ≥3 y (n=18)	p-Value
Recipient age [months], mean (range)	11.9 (9-35)	111 (40-203)	<0.0001
Recipient sex (male/female)	15/17	7/11	0.58
Donor age [years], mean (range)	30.8 (17-39)	40.0 (34-50)	<0.0001
Donor sex (male/female)	9/23	12/6	0.008
Relationship (mother/father/others)	22/9/1	6/12/0	0.02
Primary disease			0.38
Biliary atresia	30	11	
Alagille syndrome	1	1	
Acute liver failure	1	1	
Others	0	5	
ABO incompatible	4	2	0.88
Positive CDC crossmatch	2	1	0.89
Tacrolimus/Cyclosporine	28/4	13/5	0.19
Azathioprine/Mycophenolate mofetil/None	8/1/23	2/1/15	0.45
Basiliximab	0	4	0.003
Biliary leakage	5	2	0.65
Biliary strictures	4	4	0.38
Biopsy proven acute rejection	19	10	0.79
Non adherence to immunosuppressive therapy	2	2	0.55
Periods from LT [months], median (range)	143.5 (10-278)	123.5 (15-231)	0.67
T bil at DSA evaluation, mg/dL, mean (SD)	0.90 (0.73)	0.98 (0.54)	0.66
AST at DSA evaluation, mIU/mL, mean (SD)	29.3 (11.2)	26.4 (16.8)	0.48
ALT at DSA evaluation, mIU/mL, mean (SD)	23.0 (15.7)	21.9 (14.4)	0.81
Platelet count at DSA evaluation, / μ L, mean (SD)	20.0 (8.4)	17.9 (7.0)	0.38

LT - liver transplantation; CDC - complement-dependent cytotoxicity; DSA - donor-specific HLA antibodies; T bil - total bilirubin; SD - standard deviation; AST - aspartate aminotransferase; ALT - alanine aminotransferase.

Tokodai et al., Ann Transplant, 2017

Table 2

Variable	Age at LT <3 y (n=12)	Age at LT ≥3 y (n=18)	p-Value
MFI of DR DSA ≥1000	13 (40.6%)	2 (11.1%)	0.02
MFI of DR DSA ≥5000	2 (6.3%)	0	0.18
MFI of anti-DQ/DP antibody ≥1000	18 (56.3%)	11 (61.1%)	0.74
MFI of anti-DQ/DP antibody ≥5000	13 (40.6%)	5 (27.8%)	0.36

LT - liver transplantation; MFI - mean fluorescence intensity; DSA - donor-specific anti-HLA antibody.

Tokodai et al., Ann Transplant, 2017

このことにより、幼児期に肝移植を受けた患者には、積極的に抗体スクリーニングを行うことが妥当であると考えられた。一方で低年齢がドナー特異的抗 HLA 抗体の出現に影響する機序については解析をする必要があると考えられた。そこで、続いて、移植時年齢とドナー特異的抗 HLA 抗体出現との関連を詳細に解析するために、スクリーニング範囲を小児肝臓移植患者全体に広げることでサンプル数を増やし、追加解析を進めた。また、諸報告と同様、抗 HLA-DQ 抗体が多く認められたため、肝移植ドナーを対象として、HLA タイピングの追加解析を行った。このことにより、多くの移植患者で認められていた抗 HLA-DQ 抗体のドナー特異性を判断することができるようになり、抗 HLA-DQ ドナー特異的抗体についても詳細な解析を行った。

この検討の結果、まず、移植時年齢とともに免疫抑制剤の血中トラフ濃度が 1 つの重要な因子として認められた。また、免疫抑制剤の血中トラフ濃度と抗ドナー特異的抗体との関連は、抗 HLA-DQ ドナー特異的抗体を合わせた検討においても有意な関連として認められた。これらの多変量解析を含めた検討の結果をまとめ、現在欧文誌に投稿中である。

現在、本研究で得られた知見をすでに臨床診療にフィードバックするとともに、組織学的所見との関連などさらなる詳細な解析を進めることで、移植後長期経過中におけるドナー特異的抗 HLA 抗体の意義を解析していく予定である。本研究においても、予備検討を行っており、すでにドナー特異的抗 HLA 抗体と移植肝の組織像に関連を認める結果を得ている。さらに症例を蓄積するとともに、詳細な検討追加していくことで、その関連を明らかにしていきたいと考えている。

また、国内外の多くの施設と同様、本研究においても、HLA-A, -B, -DR, -DQ に対する抗体を中心に解析を行っているが、HLA-C, -DP に対する抗体についてもその頻度や意義を明らかにする必要があると考えており、実際に本研究で行った予備検討にて HLA-C に対する抗体自体は無視できない程度で認められている。これらの抗体がドナー特異的であるかどうかを検証することも課題の 1 つと考え解析を進めており、その結果についても学会発表や論文投稿などにより情報発信を行う予定としている。

さらに、抗 HLA 抗体スクリーニングにより認められたドナー特異的抗 HLA 抗体の経時的変化、特に免疫抑制剤の血中トラフ濃度の変更が与える影響についても重要な検討課題と考えている。免疫抑制剤の増量が移植肝の線維化を改善したとする諸報告もなされてき

ており、我々の研究においても免疫抑制剤の変更とドナー特異的抗HLA抗体の変化の関連について、本研究の成果をもとに進めていきたいと考えている。

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)

Kazuaki Tokodai, Shigehito Miyagi, Chikashi Nakanishi, Yasuyuki Hara, Wataru Nakanishi, Michiaki Unno, Takashi Kamei
Effect of Recipient Age at Liver Transplantation on Prevalence of Post-Transplant Donor-Specific HLA Antibody, Annals of Transplantation 査読有, in press, 2017

Kazuaki Tokodai, N. Kawagishi, S. Miyagi, C. Nakanishi, Y. Hara, A. Fujio, T. Kashiwade, K. Maida, H. Goto, T. Kamei, N. Ohuchi,
The Significance of Screening for Human Leukocyte Antigen Antibodies in the Long-term Follow-up of Pediatric Liver Transplant Recipients, Transplantation Proceedings 査読有, 48, 1139-1141 (2016), DOI: 10.1016

〔学会発表〕(計5件)

戸子台和哲 福岡健吾 清水健司 宮澤恒持 中西渉 原康之 中西史 宮城重人 亀井尚
小児肝移植後長期経過中におけるカルシニューリン阻害薬血中濃度がドナー特異的抗HLA抗体出現に与える影響
第28回東北小児肝胆膵消化管研究会
2017年3月18日、TKP ガーデンシティ仙台、仙台

Kazuaki Tokodai, Naoki Kawagishi, Shigehito Miyagi, Chikashi Nakanishi, Yasuyuki Hara, Takashi Kamei, Noriaki Ohuchi
Effect of recipient age at liver transplantation on the prevalence of post-transplant donor-specific HLA-DR antibody
Asian Transplantation Week 2016
2016年10月29日、Incheon, Korea

戸子台和哲 川岸直樹 清水健司 吉田悟 宮澤恒持 米田海 原康之 中西史 宮城重人 大内憲明 里見進
小児肝移植後長期経過中における抗HLA抗体スクリーニングの意義に関する検討
第52回日本移植学会総会、2016年9月30日、グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミ

ール、品川

Kazuaki Tokodai, Naoki Kawagishi, Shigehito Miyagi, Chikashi Nakanishi, Yasuyuki Hara, Takashi Kamei, Noriaki Ohuchi, Effect of recipient age (<3 years) during liver transplantation on the prevalence of post-transplant class II anti-human leukocyte antigen antibody
26th INTERNATIONAL CONGRESS OF THE TRANSPLANTATION SOCIETY
2016年8月20日, Hong Kong, China

Kazuaki Tokodai, Koji Miyazawa, Kai Maida, Toshiaki Kashiwade, Atsushi Fujio, Yasuyuki Hara, Chikashi Nakanishi, Shigehito Miyagi, Kazushige Sato, Naoki Kawagishi, Noriaki Ohuchi
THE SIGNIFICANCE OF SCREENING FOR HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN ANTIBODIES IN THE LONG-TERM FOLLOW-UP OF PEDIATRIC LIVER TRANSPLANT RECIPIENTS.
14th Congress of the Asian Society of Transplantation
2015年8月26日, Singapore, Singapore

〔図書〕(計0件)

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

戸子台 和哲 (TOKODAI, Kazuaki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 50581641