

令和元年6月26日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10424

研究課題名(和文) 肝移植グラフト肝におけるHLA発現の移植免疫応答における意義の解明

研究課題名(英文) Analysis of HLA class II expression in graft liver tissue; the significance of immune response in liver transplantation

研究代表者

吉澤 淳 (Yoshizawa, Atsushi)

京都大学・医学研究科・特別研究員

研究者番号：60457984

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)： 肝臓移植長期経過後に、移植肝障害をもたらす原因の一つに慢性抗体関連型拒絶反応がある。肝移植後にある割合で、レシピエントに移植ドナーのHLAに対する抗体が産生される。一方、HLA抗体陽性であっても、慢性抗体関連型拒絶反応を生じない症例も存在する。本研究では、慢性抗体関連型拒絶反応が生じる機序を明らかにするため、HLA抗体と同時に移植肝についても検討を行った。

本研究で、抗体関連型拒絶反応の進行に、HLA抗体に加え、移植肝内のHLA-DR発現が関与することを明らかにした。さらに、移植肝障害がHLA-DR発現を促進することも推測され、肝移植長期経過後の液性免疫拒絶反応の機序の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、移植後長期経過後に肝障害によっておこる移植肝内における免疫原性の変化を明らかにし、そのことによって、生じる抗体関連型拒絶反応の機序について明らかにした。移植治療後の拒絶反応については、これまで、移植患者内に起こる免疫反応に注目されて研究がおこなわれているが、本研究では移植された臓器の状態が変わることにより移植反応が生じ、進行することを明らかにした。移植後の免疫抑制療法のさらなる工夫と改良をもたらす研究成果である。

研究成果の概要(英文)： One of the causes of late allograft liver injury is chronic antibody-mediated rejection(cAMR). It has been reported that some liver transplant recipients have donor-specific HLA antibodies (DSA) after operation. cAMR will not necessarily occur even in the patients with DSA. This study focused on the expression of HLA-DR in the grafted liver as well as DSA.

This study revealed that the progression of cAMR is not caused only by the existence of DSA but also by the expression of HLA-DR in the grafted liver. And, moreover, it has speculated that the expression of HLA-DR is accompanied with the damage of the graft liver. This study will contribute to clarify one of the humoral immune responses that will occur in the late liver graft and to improve the long-term prognosis of liver transplantation.

研究分野：移植免疫

キーワード：肝移植 HLA 拒絶反応

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臓器移植において抗 Human Leukocyte Antigens(HLA)に対する抗体 (Donor Specific Antibodies: DSA) が抗体関連型拒絶反応および長期経過後グラフト機能障害の原因となり、移植後の短期および長期経過の成績を低下させる原因として注目されている。腎移植、心移植においては術後に新規に発生する de novo DSA がグラフト生着率の低下に関与していることは報告されている。肝移植において、術後 DSA が新たに存在することと長期における患者生存率に影響があるとの報告はあるが、長期経過後のグラフト肝機能に与える影響、移植肝機能障害をもたらす機序については、いまだ明らかにされていない。慢性的な DSA によるグラフト肝障害の所見として、移植肝の線維化の進行にみられる慢性抗体関連型拒絶反応を認める症例が多くみられた。その一方で、DSA が血中に存在していても、移植肝の線維化が進行しない症例があり、その違いの機序は明らかになっていない。

免疫応答において、免疫反応を惹起する抗原性を免疫原性という。グラフト臓器の免疫原性についての検討がこれまでされていなかった。つまり、グラフト臓器における HLA の発現が高発現であれば、免疫原性が高いと考えられ、また、HLA の発現が低発現であれば免疫原性は低いと考えられる。この観点から、や、術後の急性拒絶反応の発症、ドナー抗原に対する免疫反応、さらには、術後の免疫抑制療法不足によって、術後晩期に de novo DSA が産生されることがあった時に、それが臓器にどのような影響を与えるかについては免疫原性の高さも考慮入れて検討する必要がある。

臓器移植後に産生される DSA は主に HLA Class II に対する抗体であることが明らかになっている。HLA Class II は主に抗原提示細胞や B 細胞に発現しているたんぱく質であり、肝組織内の肝細胞や血管内皮細胞には原則 HLA Class II の発現はされていないとされる。古典的な抗体関連型拒絶反応は血管内皮細胞などに発現している HLA Class I への抗体が問題とされており、術前のクロスマッチテストでは HLA Class I に対する抗体が問題視されてきた。最近、明らかになった術後に産生される DSA は主に HLA Class II に対する抗体であるという点から、肝移植後に HLA Class II に対する DSA が移植肝組織へ障害を与える直接の原因となりうるのかどうか、さらに、DSA が肝障害を与えるとするならば、その機序の解明が重要である

2. 研究の目的

我々のこれまでの研究から、術後長期経過後に DSA が陽性となっている症例において、そのグラフト肝の肝生検によって肝線維化が進行している症例が認められ、DSA の存在と移植肝線維化との間に強い相関が認められている。その現象は DSA が直接抗原と反応することによってもたせている(いわゆる慢性抗体関連型拒絶反応)が移植肝線維化の直接の原因となっているのか、または、DSA はドナー抗原との免疫反応の状態を反映している結果であり、線維化はレシピエントリンパ球による免疫応答、つまり、晩期急性細胞性拒絶反応の結果であるかは明らかになっていない。本研究において、グラフト肝の血管内皮細胞の HLA Class II 抗原発現について精査することにより、グラフト肝線維化の進行に DSA が直接移植肝に作用して肝障害が生じる機序が存在することを明らかにする。さらに、グラフト肝の血管内皮細胞に本来発現していない HLA Class II が発現する条件を明らかにすることで、DSA がグラフト肝に反応する条件、メカニズムを推察する。本研究では、移植後、抗体関連型拒絶反応による肝障害において、DSA の存在だけではなく、グラフト肝における抗原発現が移植肝障害の進行に重要であることを立証し、DSA 産生のメカニズムおよび DSA によるグラフト肝障害、グラフト肝線維化のメカニズムを明らかに、さらにその予防法および治療法の確立のための知見を得ることである。

3. 研究の方法

本研究はすでに保存されている血清と肝生検組織を用いて行う retrospective study である。血清についてはすでに DSA の有無については検査済みであるため、DSA の有無、グラフト肝線維化の有無により層別化を行って DSA の精査およびグラフト肝における HLA 抗原の発現の評価を行う。DSA については、その IgG subclass を合わせて検討を行った。

さらに、肝機能検査を含めた、肝生検の背景と移植肝における HLA Class II の発現を精査する。HLA Class II の発現については免疫組織化学染色によって、血管内皮細胞と HLA Class II の 2 重染色を行い、血管内皮細胞における HLA Class II の発現の有無を検討する。HLA Class II の発現については門脈領域と中心静脈領域に分けて評価を行い、その血管内皮細胞の HLA Class II に対する免疫化学染色を行い、その分布と染色強度によってスコア化を行って評価を行った。

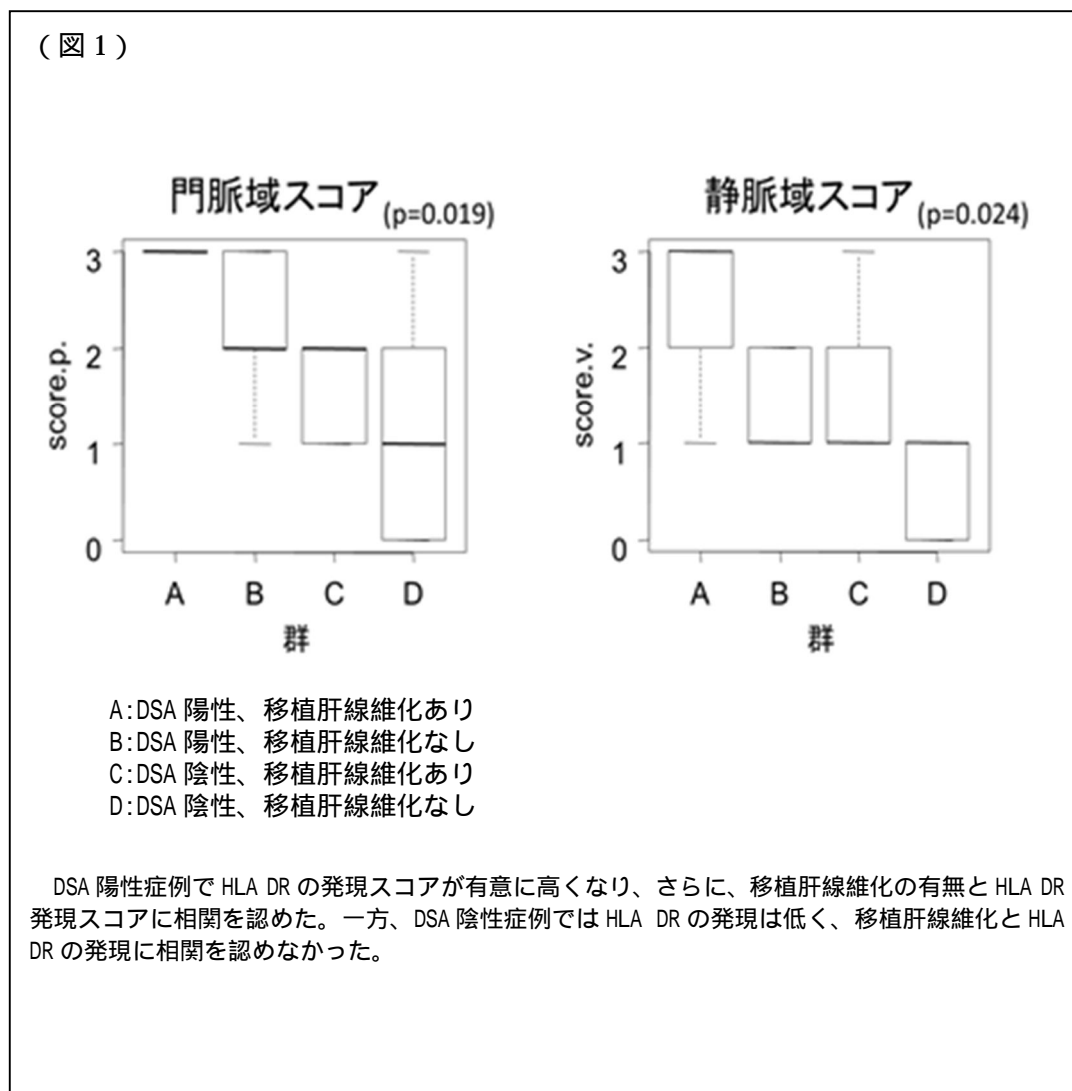
4. 研究成果

患者の肝生検標本採取時の年齢は平均 12.3 歳で、肝移植手術時の年齢は平均 2.4 歳で、肝移植手術からの期間は平均 9.9 年であった。DSA の陽性率は 39% であり、その DSA のほとんどが HLA Class II に対する抗体であった。

HLA-DR の発現スコアと肝移植後 DSA の有無と線維化の有無でサブグループ解析を行った。門脈域静脈域ともに DSA が陽性のグループで HLA-DR の発現が高いことが判明した。さらに、DSA が陽性の症例において、移植肝の線維化の進行と移植肝血管内皮細胞の HLA-DR 発現に有意

な相関を認めた。一方で、DSA が陰性の症例においては、移植肝の線維化と HLA-DR 発現に相関を認めなかった。このことから、移植後、移植肝線維化の進行（慢性抗体関連型拒絶反応の関与が考えられる）に DSA の存在と HLA-DR の発現が関与していることが明らかになった。（図 1）

（図 1） DSA の有無、移植肝線維化の有無による層別化をおこなった HLA-DR 発現スコア

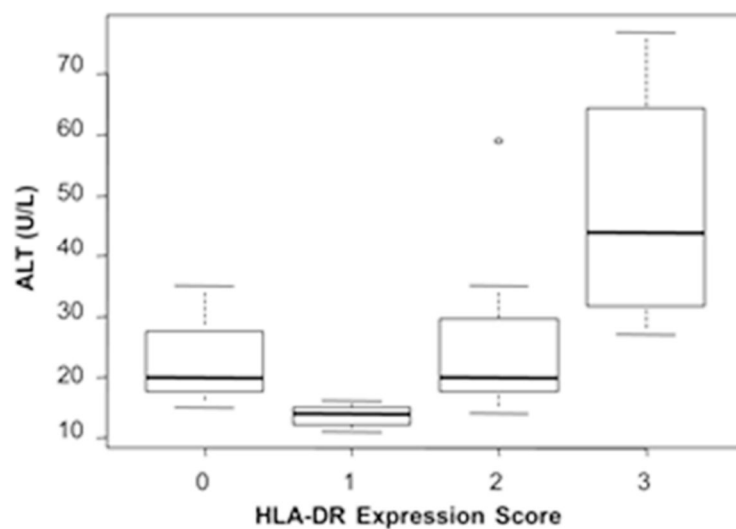


また、肝機能検査（ALT の異常）と HLA-DR 発現に有意な相関があり（図 2）、このことから、肝障害がおこるときに、HLA-DR が発現していることが明らかになった。また、蛍光組織免疫学的染色により、HLA-DR が類洞内の血管内皮細胞に発現し、その構造が不正になっていることが判明した。

このことは、組織傷害がおこり、その後に類洞内皮細胞および血管内皮細胞に HLA-DR が発現することを示す。また、HLA-DR は組織傷害に伴って発現することが観察できたが、HLA Class II である HLA-DQ については、血管内皮細胞内の発現は観察することができなかった。

Prospective な検討から、相対的な免疫抑制療法不足が DSA 産生の原因であることが明らかになった。肝障害が発生し、肝組織 HLA-DR の発現が生じて、DSA の産生と慢性抗体関連型拒絶反応が起き、線維化が進行することが推察されたが、本研究では肝障害時の肝組織中 HLA-DR の発現の評価が十分でなかった。今後、肝障害と肝組織 HLA-DR の発現の研究により肝移植後、慢性期の移植肝線維化をきたす病態の解明が明らかにされることが期待される。

(図 2) Asparate Aminotranferase と HLA DR の発現の関係



HLA-DR の発現が高い症例では ALT が有意に高値であった。(p<0.001)

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 3 件)

1 .金城 昌克、吉澤 淳、上田 大輔、八木 真太郎、秦 浩一郎、岡島 英明、海道 利美、鶴山 竜昭、上本 伸二

肝移植患者の血中抗ドナー特異的 HLA 抗体が肝臓に及ぼす影響と肝組織 HLA Class II の関係

2017 年 日本移植学会総会 発表

2 .金城 昌克、吉澤 淳、上田 大輔、八木 真太郎、秦 浩一郎、岡島 英明、海道 利美、鶴山 竜昭、上本 伸二

肝移植患者の血中抗ドナー特異的 HLA 抗体が肝臓に及ぼす影響と肝組織 HLA Class II の関係

2017 年 日本組織適合性学会 発表

3 . M. Kaneshiro, A. Yoshizawa D.Ueda, S.Yagi, K. Hata, H.Okajima, T.Kaido, T.Tsuruyama, S.Uemoto

Analysis of Human Leucocyte Antigen Class II Expression in Graft Liver Tissue; Donor Specific Antibodies and Graft Liver Fibrosis

15th Transplantation Science Symposium, 2017 年

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：金城 昌克
ローマ字氏名：KANESHIRO, Masakatsu

研究協力者氏名：上田 大輔
ローマ字氏名：UEDA, Daisuke

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。