

機関番号：13901

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390340

研究課題名 (和文) 拒絶反応と免疫順応・寛容に関する抗原、抗体、補体、炎症、凝固のダイナミズム解析

研究課題名 (英文) Dynamic analysis of antigen, antibody, complement, inflammation and coagulation related to rejection, accommodation and tolerance

研究代表者

小林 孝彰 (KOBAYASHI TAKAAKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：70314010

研究成果の概要 (和文) : ABO 血液型不適合および HLA 抗体陽性移植後に免疫順応 (抗体の存在にも拘らず拒絶されない状態) を誘導する新しい治療法を開発するために、血管内皮細胞レベルで、補体、炎症、凝固反応の相互作用、シグナル伝達経路を解析した。遺伝子導入により解析に必要な A/B 抗原発現内皮細胞を樹立した。免疫順応には、ERK 経路の抑制、PI3K/Akt 経路の活性化が鍵となり、細胞保護因子を増加させた。抗凝固、抗炎症作用を持つヒトトロンボモジュリンは、異種移植では有効な方法と考えられた。臓器移植後の抗体関連型拒絶反応の制御に有用な知見が得られた。

研究成果の概要 (英文) : For the purpose of inducing “accommodation” which is defined as a state in which no graft injury is observed despite the presence of anti-donor antibody, after ABO blood group or HLA incompatible transplantation, we analyzed the interaction between complement, inflammation and coagulation, and signal pathway at an endothelial cell level. Blood group A/B antigen-expressing endothelial cells were established by gene transfer. Suppression of ERK pathway by anti A/B antibody and activation of PI3K/Akt pathway by HLA antibody were found to elicit up-regulation of cytoprotective factors. Human thrombomodulin which has the action for controlling coagulation and reducing inflammation, was proven to be useful in xenotransplantation. Obtained results from this research provide the valuable information on the strategy against antibody-mediated rejection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	11,900,000	3,570,000	15,470,000

研究分野：臓器移植、移植免疫

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、外科学一般、移植外科学

キーワード：ABO 血液型不適合移植、異種移植、抗原抗体反応、血管内皮細胞、補体、凝固、免疫順応、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

ここ 10 年間の免疫抑制療法の発展により、移植成績は向上した。新しい薬剤を武器に従来は禁忌とされた抗ドナー抗体陽性 (ABO 血液型不適合、クロスマッチ (HLA 抗体) 陽性) 移植が試みられるようになったが、標準的な

治療法は確立されていない。移植後の厳しい抗体関連型拒絶反応が問題となり、グラフトの機能廃絶には、凝固系の関与が大きく関わっている。安全な免疫抑制療法を行うためには、免疫モニタリングも必要となる。

ドナー不足問題を決定的に解決する手段

として、ブタの臓器を用いた異種移植が有望視されていた。補体制御因子遺伝子 (DAF, CD46, CD59) の導入と主要異種抗原である  $\alpha$  Gal 抗原をノックアウトしたクローンブタの作出に成功したが、血栓性微小血管傷害 (Thrombotic Microangiopathy: TMA) などが惹起され、凝固系の制御が新たな問題としてクローズアップされている。

抗原抗体反応を完全に制御することが可能であれば、上記の抗ドナー抗体陽性移植のみならず、移植後維持期に徐々にグラフトの機能が低下する慢性拒絶反応 (HLA 抗体の反応と考えられている) にも対応策を講じることができる。移植グラフト血管内皮細胞への抗体の接着は、補体の活性化、炎症反応 (内皮細胞活性化)、凝固系亢進を引き起こし、これらが複雑に絡み合っており、拒絶反応に進む。しかし、抗体接着のすべてが拒絶反応に向かうのではなく、グラフトに保護的に作用することも知られており、臨床では免疫順応 (accommodation: グラフトに対する抗体の存在にもかかわらず拒絶されない状態) が確認されている。グラフト内皮細胞上で抗原抗体反応から引き起こされる補体、炎症、凝固反応の相互作用を解析することが重要である。免疫順応のメカニズムの解明とその誘導法を探索することは、新たな制御法として期待されている。

## 2. 研究の目的

抗原抗体反応による拒絶反応を克服することが可能であれば、現在直面している移植医療の多くの課題を解決することができる。本研究の目的は、グラフト内皮細胞上で抗原抗体反応から引き起こされる補体、炎症、凝固反応の動的変化をとらえ、これらの相互作用を力学現象的に解析することである。そして、拒絶反応に進展する因子、免疫順応を獲得する因子を見出し、抗体関連型拒絶反応を克服する戦略を考案する。免疫抑制状態の把握、ドナーに対する反応性の評価など免疫モニタリング方法の開発も安全な免疫抑制療法の実施には不可欠である。ABO 血液型不適合移植、クロスマッチ陽性移植を安全に実施するだけでなく、慢性拒絶反応の効果的な抑制法を確立し、さらには遺伝子組換えブタの細胞・臓器を利用した異種移植の応用に展開していく。

## 3. 研究の方法

### (1) 内皮細胞に発現する抗原の制御

培養内皮細胞には血液型 A/B 抗原が発現していない。ヒト内皮細胞 (EAhy926) に A/B 型転移酵素の遺伝子導入により、A/B 抗原発現株を樹立する。A/B 切断酵素 (ABase: endo- $\beta$ -galactosidase) 処理により、抗原の発現量を調整する。ヒト内皮細胞での A, B 型抗原、

HLA 抗原、ブタ内皮細胞の  $\alpha$  Gal 抗原と抗体との反応 (量的、質的な差違) から、補体、炎症、凝固反応の動的変化を検出する。

### (2) 補体、炎症、凝固反応の解析

(1) で作成した内皮細胞を用い、とくに A/B 型抗原、HLA 抗原と抗体との反応について比較検討する。Ras/MAPK, ERK, PI3K/Akt 経路などの各種 signal pathway の key factor を Western blotting により定量解析し、拒絶反応に進展する因子、免疫順応を獲得する因子の候補を見出す。経時的に mRNA 解析、flow cytometry 解析、thrombin generation assay, tissue factor procoagulant activity assay, clotting assay を行い、炎症、補体、凝固に関連する因子、細胞保護に関与する因子などを解析する。

### (3) 内皮細胞への遺伝子導入

内皮細胞に対する補体・炎症・凝固・シグナル伝達制御因子の遺伝子導入を試みる。それらを制御する薬剤の投与により抗原抗体反応後の免疫順応獲得に及ぼす影響を調べる。

### (4) 臨床検体解析、モニタリング方法開発

ABO 血液型不適合移植の血小板、血漿、血清を用い、血小板での A/B 抗原発現、thrombin generation assay, clotting assay を行い、予後との関連を調べる。移植後患者の血液検体から、免疫抑制状態およびドナー反応性を評価できる免疫モニタリング方法を開発する。

### (5) 遺伝子組換えブタ作出と抗体関連型拒絶反応モデルの開発

A/B 発現クローンブタを作出し、免疫順応誘導を試みる。異種移植では補体・凝固・抗原制御因子を導入した遺伝子組換えブタを開発し、non human primate (NHP) への移植実験による機能評価を行う。

## 4. 研究成果

(1) ヒト内皮細胞 (EA.hy926) に type 2 血液型 H 抗原の発現を確認したため、A/B 型転移酵素の遺伝子導入を行い、type 2 血液型 A/B 抗原発現内皮細胞を作成した。さらに cell sorter を用いて A/B 抗原の高発現細胞を樹立した。今まで利用できなかった血液型 A/B 発現培養内皮細胞を樹立したことは、本研究の効率的な推進のみならず ABO 血液型関連研究に大きく貢献すると考えられる。

(2) A/B 型高発現内皮細胞株を用いて、HLA 抗体および抗 A/B 抗体接着後の内皮細胞の反応を比較検討した。少量の HLA 抗体および抗 A/B 抗体による 24 時間 preincubation

は、その後の多量の抗体接着と補体活性による細胞傷害の程度を軽減することを確認し、移植後の accommodation (免疫順応) に関する in vitro モデルとして利用できること明らかにした。HLA 抗体と抗 A/B 抗体の比較では、HLA は少量の抗体接着でのみ PI3K/Akt シグナル経路を活性化し、HO-1, ferritin などの抗酸化物質の発現が増強し、細胞保護効果が観察された。A/B 抗原では、多量の抗体でも ERK シグナルが抑制され、CD55, CD59 などの補体制御因子の発現が増加し、その後の補体活性化による細胞傷害が抑制された。すなわち Accommodation (免疫順応) の機序が HLA と ABO で異なることが示唆された。また、補体活性および凝固活性(トロンビン)存在下では、preincubation 中に ERK 経路が活性化され、細胞保護効果は誘導されなかった。Accommodation の誘導には、補体、凝固系の抑制も重要であると考えられた。これらは臨床では重要な知見であり、移植医療で実施している移植前の二重濾過血漿交換(抗体除去のみならず補体因子および凝固因子も除去)の有効性が細胞レベルで証明されたことを意味する。また、ABO 不適合移植、クロスマッチ陽性移植に対する新しい治療法の開発に有用な情報を提供する。

(3) ブタ細胞にヒトトロンボモジュリン(hTM)を遺伝子導入し、凝固機能を解析した。hTM 発現がブタ・ヒト間の分子レベルでの不適合を克服し活性型プロテインCを産生しうることを示した。さらに LPS, TNF $\alpha$  刺激後の Tissue Factor、E-selection など炎症性マーカーの up-regulation を軽減し、hTM が強力な抗炎症作用を持つこと、また、強力な向凝固因子である Direct prothrombinase の活性も軽減することを証明した。hTM は異種抗原( $\alpha$ Gal 抗原)抹消、補体制御因子発現に次ぐ、凝固制御に重要な膜タンパクであると考えられた。

(4) 維持期患者の臨床検体を用いた解析では、末梢血 FoxP3 mRNA 量の低下と慢性抗体関連型拒絶反応(CAMR)の関連が認められた。また、HLA 抗体の中でも class I よりも class II, DQB よりも DRB に対する抗体が CAMR と強い関連が見られた。これらのメカニズムの違いを解明することは今後の重要な課題である。

(5) (3)で明らかにしたように、hTM 遺伝子導入ブタの作出は異種移植の成功には重要な課題と考え、hTM 発現クローンブタを作出した。クローンブタ由来の大動脈内皮細胞でも、in vitro test により活性化プロテイン C 産生および抗炎症作用を認めた。世界でも、今のところ内皮細胞に発現する

hTM 遺伝子導入クローンブタの報告はない。また、hDAF と EndoGalC を共発現したブタ腎臓のヒヒへの移植では、1週程度の生着であるが、recombinant hTM 投与により、生着延長が認められた。従来の hDAF と EndoGalC、別系統で進行中の GT-KO ( $\alpha$ Gal 抗原抹消)ブタとの交配により、hTM 遺伝子を組み入れて行く予定である。

#### 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 29 件)

- ① Clinical significance of regulatory T cell-related gene expression in peripheral blood after renal transplantation. Iwase H, Kobayashi T (他 11 名、2 番目) Transplantation 91: 191-198 (2011) 査読有
- ② Significant association between chronic antibody-mediated rejection and donor-specific antibodies against HLA-DRB rather than DQB in renal transplantation. Kobayashi T (他 8 名、1 番目) Human Immunology 72:11-17 (2010) 査読有
- ③ Significance of HLA class I antibody-induced antioxidant gene expression for endothelial cell protection against complement attack. Iwasaki K, Kobayashi T (他 4 名、6 番目) Biochem Biophys Res Commun 391: 1210-1215 (2010) 査読有
- ④ Potential value of human thrombomodulin and DAF expression for coagulation control in pig-to-human xenotransplantation. Y. Miwa, T. Kobayashi (他 11 名、14 番目) Xenotransplantation 17: 26-37 (2010) 査読有
- ⑤ Successful cross-breeding of cloned pigs expressing endo-beta-galactosidase C and hDAF. Yazaki S, Kobayashi T (他 17 名 19 番目) Xenotransplantation 16: 511-521 (2009) 査読有

- ⑥ Pretransplant pharmacodynamic analysis of immunosuppressive agents using CFSE-based T cell proliferation assay. Kurata Y, Kobayashi T (他9名、11番目) Clinical Pharmacology & Therapeutics, 86, 285-289 (2009) 査読有
- ⑦ Removal of blood group A/B antigen in organs by ex vivo and in vivo administration of endo- $\beta$ -galactosidase (Abase) for ABO-incompatible transplantation. Kobayashi T (他12名、1番目) Transplant Immunology, 20, 132-138 (2009) 査読有
- ⑧ Stimulation Index for PCNA mRNA in Peripheral Blood as Immune Function Monitoring after Renal Transplantation. Niwa M, Kobayashi T (他12名、14番目) Transplantation, 87, 1411-1414 (2009) 査読有
- ⑨ Evaluation of IL-2 mRNA in whole blood as a parameter for monitoring cyclosporine pharmacodynamics. Kuzuya T, Kobayashi T (他6名、2番目) Biological Pharmaceutical Bulletin, 32, 604-608 (2009) 査読有
- ⑩ Role of the tumor suppressor PTEN in antioxidant responsive element-mediated transcription and associated histone modifications. Iwasaki K (他3名、2番目) Mol Biol Cell, 20: 1606-17 (2009) 査読有
- ⑪ Enzyme-linked immunosorbent assay for human leukocyte antigen antibody detection and urine protein test recommended for follow-up monitoring after renal transplantation. Kobayashi T (他7名、1番目) Transplantation, 85, 1595-1600 (2008) 査読有
- [学会発表] (計58件)
- ① Iwasaki K, Kobayashi T, et al. The Reduction of RAF/MEK/ERK Pathway By Anti-ABO Association May Be the Identity of Accommodation in ABO-Incompatible Transplantation. 23<sup>rd</sup> International Congress of the Transplantation Society. 2010/8/10-15 Vancouver (Canada)
- ② Iwase H, Kobayashi T, et al. Potential Value of Foxp3 and Regulatory T Cell-Related Gene Expression Monitoring in Peripheral Blood After Renal Transplantation. 23<sup>rd</sup> International Congress of the Transplantation Society. 2010/8/10-15 Vancouver (Canada)
- ③ Iwasaki K, Kobayashi T, et al. The Implication of AMP-Activated Protein Kinase As A Target To Suppress Lymphocyte Proliferation. 23<sup>rd</sup> International Congress of the Transplantation Society. 2010/8/10-15 Vancouver (Canada)
- ④ Kobayashi T, et al. Comparative Study of HLA Antibody Detection Between ELISA and Luminex Assay, and Its Clinical Relevance in Renal Transplantation. 23<sup>rd</sup> International Congress of the Transplantation Society. 2010/8/10-15 Vancouver (Canada)
- ⑤ Kuzuya T, Kobayashi T, et al. Pharmacodynamic Evaluation of Cyclosporine in B-Cell. 23<sup>rd</sup> International Congress of the Transplantation Society. 2010/8/10-15 Vancouver (Canada)
- ⑥ Kobayashi T, et al. Close Relation Between Chronic Antibody Mediated Rejection and Donor Specific Antibody Against Hla Class II DRB, But Not DQB. 23<sup>rd</sup> International Congress of the Transplantation Society. 2010/8/10-15 Vancouver (Canada)
- ⑦ Miwa Y, Kobayashi T, et al. Effective Suppression of Direct Prothrombinase Activity in Porcine Endothelial Cells by Human Thrombomodulin(hTM) Gene Transfer or Its Soluble Form. American Transplant Congress 2010. 2010/5/1-5 San Diego (USA)
- ⑧ Niwa M, Kobayashi T, et al. Immune Function Monitoring of PCNA and P21 mRNA Expression in Stimulated Peripheral Blood after Renal Transplantation. American Transplant Congress 2010. 2010/5/1-5 San Diego (USA)

- ⑨ Yuko M, Kobayashi T, et al. Potential Impacts of Human DAF and Thrombomodulin on Thrombin Regulation. American Transplant Congress 2009 2009/5/30-6/3 Boston (USA)
- ⑩ Iwase H, Kobayashi T, et al. Potential Value of FoxP3 mRNA Monitoring in Peripheral Blood after Renal Transplantation. American Transplant Congress 2009 2009/5/30-6/3 Boston (USA)
- ⑪ Kobayashi T, et al. Cost Effectiveness of HLA Antibody Screening Test after Renal Transplantation. American Transplant Congress 2009 2009/5/30-6/3 Boston (USA)
- ⑫ Iwase H, Kobayashi T, et al. SEMI-QUANTITATIVE ANALYSIS OF FOXP3. 14th European Society for Organ Transplantation (ESOT) 2009/8/30-9/2 Paris (France)
- ⑬ Miwa Y, Kobayashi T, et al. Anti-inflammatory properties of human thrombomodulin provide additional beneficial effects on coagulation control. IPITA-IXA 2009 (International Pancreas Islet Transplantation Association, International Xenotransplantation Association) 2009/10/12-17 Venice (Italy)
- ⑭ Saka Y, Kobayashi T, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells (AT-MSC) suppress xenoantibody production. IPITA-IXA 2009 2009/10/12-17 Venice (Italy)
- ⑮ Iwasaki K, Kobayashi T, et al. MHC class I ligation regulate phase II genes through PI3K/AKT activation, and enhances protection of endothelial cells from complement attack. IPITA-IXA 2009 2009/10/12-17 Venice (Italy)
- ⑯ Miwa Y, Kobayashi T, et al. Human thrombomodulin plays an important role in coagulation control: engine braking is essential for physiological regulation. IPITA-IXA 2009 2009/10/12-17 Venice (Italy)
- ⑰ Kobayashi T, et al. Essential role of human thrombomodulin in control of coagulation and inflammatory response after pig to human xenotransplantation. 2009 Seoul Forum on Xenotransplantation 2009/11/21 Seoul (Korea)
- ⑱ Miwa Y, Kobayashi T, et al. COAGULATION CONTROL USING GENE TRANSFER OF HUMAN DAF AND THROMBOMODULIN IN PIG TO PRIMATE XENOTRANSPLANTATION. 22nd International Congress Transplantation of The Society 2008/8/10-8/14 Sydney (Australia)
- ⑲ Iwase H, Kobayashi T, et al. CLINICAL VALUE OF ROUTINE MONITORING OF HLA ANTIBODY AND URINE PROTEIN AFTER RENAL TRANSPLANTATION. 22nd International Congress Transplantation of The Society 2008/8/10-8/14 Sydney (Australia)
- ⑳ Kuzuya T, Kobayashi T, et al. PHARMACODYNAMIC CHARACTERISTICS OF RENAL TRANSPLANT RESIPIENTS. 22nd International Congress Transplantation of The Society 2008/8/10-8/14 Sydney (Australia)

[図書] (計0件)

[産業財産権]  
(特許権、実用新案権、意匠権)

○出願状況 (計0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0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

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/tx-immunology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 孝彰 (KOBAYASHI TAKAAKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：70314010

### (2) 研究分担者

山本 晃士 (YAMAMOTO KOJI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90362251

竹田 伸 (TAKEDA SHIN)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20314015

丸山 彰一 (MARUYAMA SHOICHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10362253

羽根田 正隆 (HANEDA MASATAKA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座講師

研究者番号：50436995

岸田 聡 (KISHIDA SATOSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20402563

岩崎 研太 (IWASAKI KENTA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：10508881

### (3) 連携研究者

大西 彰 (ONISHI AKIRA)

独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子組換え家畜研究センター・上級研究員

研究者番号：30414890

小川 晴子 (OGAWA HARUKO)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授

研究者番号：10400079