

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09389

研究課題名（和文）腎移植における慢性抗体関連型拒絶反応の早期診断法の開発とメカニズム解析

研究課題名（英文）Development of immunomonitoring system that predicts chronic antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients

研究代表者

堀田 記世彦 (Hotta, Kiyohiko)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：90443936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：腎移植の短期成績は飛躍的に向上しているが、長期的にはドナー特異的抗体(DSA)による慢性抗体関連型拒絶反応(CAAMR)により移植腎機能廃絶となる症例が多く、この克服が長期成績の向上に必要不可欠である。当研究では、CAAMRとなりうる患者を早期に発見する診断法の開発と発症のメカニズム解析することを目的とした。

本研究で開発したリンパ球混合反応試験により、DSA陽性の腎移植患者ではドナーに対するCD4+ T cell特にTh1, Th17細胞の反応が亢進していることを明らかにした。そして、臨床ではCAAMR診断に必須と考えられている腎生検よりも早期にCAAMRを診断できる可能性を示すことが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したMLR試験は、これまで存在しなかったCAAMR早期診断法となり得る可能性を持つと思われる。そして、CAAMRの早期診断は、CAAMRが形成される前の治療介入を可能とし、CAAMR発症を予防または遅らせることができる可能性がある。

さらに、未だ正確な発症機序が不明なCAAMRにおいて、CAAMRを引き起こすDSAが直接認識経路を介したドナーに対するCD4+ T cell、Th1、Th17の活性化に関与していることを示し、CAAMRの病態の解明に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Chronic active antibody-mediated rejection (CAAMR) induced by Donor-specific antibodies (DSAs) are the main cause of graft loss over time. We analyzed the T-cell alloantigen response via the DP in kidney recipients with DSAs (DSA+) or without DSAs (DSA-). A mixed lymphocyte reaction assay was implemented to assess the DP response. DSA+ patients showed significantly higher CD8+ and CD4+ T cell responses to donor cells than DSA- patients. Furthermore, proliferating CD4+ T cells showed a marked increase in Th1 and Th17 responses in DSA+ patients than in DSA- patients. In a comparison between anti-donor and third-party responses, the anti-donor CD4+ T cell response was significantly lower than the anti-third-party response. In contrast, the donor-specific hyporesponsiveness was absent in DSA+ patients. Our study demonstrated that DSA+ recipients have a greater potential for developing immune responses against the donor tissues via the DP.

研究分野：移植免疫学、腎移植

キーワード：移植免疫 腎移植 慢性抗体関連型拒絶反応 ドナー特異的抗体 早期診断 リンパ球混合反応 Tリンパ球 ドナー特異的反応抑制

1. 研究開始当初の背景

近年の腎移植は、免疫抑制剤の開発により、短期の移植腎生着率は著明に向上した。しかし、長期的には慢性活動性抗体関連型拒絶反応(chronic active antibody mediated rejection: CAAMR)により移植腎機能廃絶となる患者が多く、移植腎の長期生着が課題となっている。

CAAMR は腎臓を提供したドナーに対する抗体、ドナー特異的抗体(Donor specific antibody: DSA)により引き起こされる。しかし、CAAMR の正確な発症機序は未だに解明されていない。また、臨床の現場では移植腎生検が CAAMR の唯一の診断方法であるが、移植腎生検を行い CAAMR と診断した時点にはすでに確立した治療法がないのが現状である。そのため、CAAMR となりうる患者を未然にもしくは可能な限り早期に発見する診断方法の開発とその発症メカニズム解析が望まれる。

2. 研究の目的

混合リンパ球反応試験は、臨床移植において急性 T 細胞性拒絶反応の診断に有用と報告されている。直接認識経路を介した T cell の反応は、移植初期の急性拒絶反応に関与すると考えられてきた。しかし、近年の研究では直接認識経路が移植臓器の慢性組織障害に寄与することが報告されている。本研究では、従来方法より感度高くレシピエントの T cell の反応の評価が可能な MLR 試験を開発した。そして、MLR 試験を用い、CAAMR の直接認識経路を介した T cell の反応を明らかにし、CAAMR の早期診断法を確立とその発症メカニズム解析することを目的とした。また、以前、我々は CAAMR の患者の尿中 ORM1 濃度が正常群に比べ高いことを報告している。この尿中 ORM1 を用いて非侵襲的で簡便な早期診断法を開発を目的とした。

3. 研究の方法

対象は、生体腎移植を施行した 100 例。70 例が移植後安定した経過であり (stable 群)、30 例が DSA 陽性であった (DSA+群)。腎移植前の末期腎不全患者 (end stage renal disease: ESRD 群) 40 例をコントロールとした。対象患者の末梢血を採取し、末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMC) に分離し回収した。分離した PBMC をそれぞれの表面抗原に対する抗体染色、細胞内染色を実施し、FACSverse (BD Biosciences) を用い解析した。MLR 試験では、レスポンダーに分離した T cell を用い実施した。レスポンダーを CFSE で染色し、ステミュレーターと 5 日間共培養した。抗体染色後、CFSE による細胞分裂の程度を評価した。

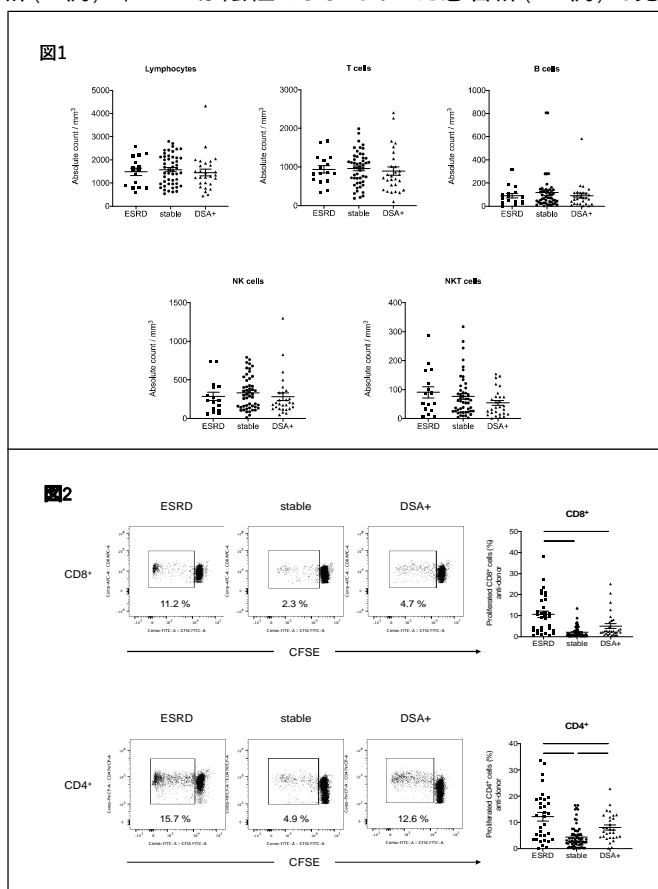
尿中バイオマーカーについては、腎機能が正常で DSA が陰性の 52 例の尿サンプルの尿中 ORM1 を測定し、2 年後以降に DSA 陽性となった群 (5 例) と、DSA が陰性のままであった患者群 (47 例) で比較し、将来の DSA の発症が尿中 ORM1 の測定で可能かどうか検討した。

4. 研究成果

(1) 末梢血におけるリンパ球サブセットの評価: ESRD 群、stable 群、DSA+群の 3 群における末梢血中リンパ球の比較を行ったが違いを認めなかった。(図 1)

(2) MLR によるドナーに対する T 細胞の反応の評価: DSA+群は stable 群と比ベドナーに対する CD8 陽性 T 細胞 (CD8 positive T cell: CD8+ T cell) の反応に違いを認めなかったのに対し、CD4 陽性 T 細胞 (CD4 positive T cell: CD4+ T cell) の反応の亢進を認めた (図 2)。以上より CD4 陽性細胞の反応をモニタリングすることにより、DSA 陽性患者の早期診断ができる可能性が示唆された。

(3) ドナーとサードパーティーに対する反応の評価: ドナーに対する反応とサードパーティーに対する反応を比較し、stable 群では CD4+ T cell のドナー特異的な反応の抑制を認めたが、DSA+群では認めなかった (図 3)。こ



の、ドナー特異的な反応の抑制は、免疫寛容を誘導した移植患者で認めることが報告されているが、免疫抑制剤を内服している臓器移植患者において認めるかは一定の見解は得られていない。免疫抑制剤内服下でも腎機能が安定していれば、この現症を認め DSA 陽性になればこの現症が失われることから、CD4 陽性細胞の反応が DSA の発症に大きく関与している可能性が示唆された。

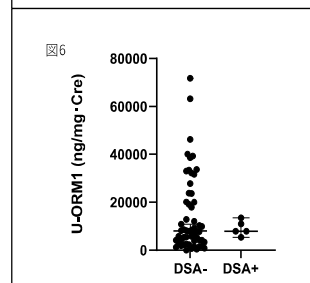
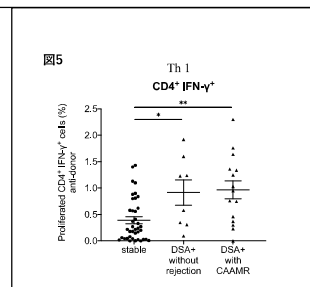
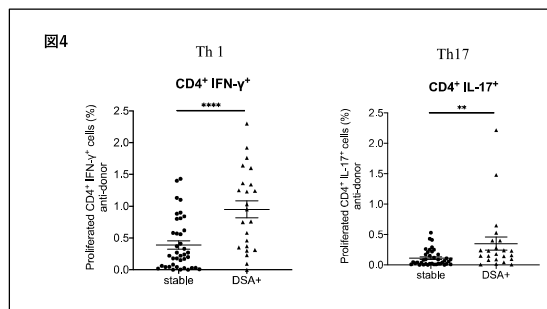
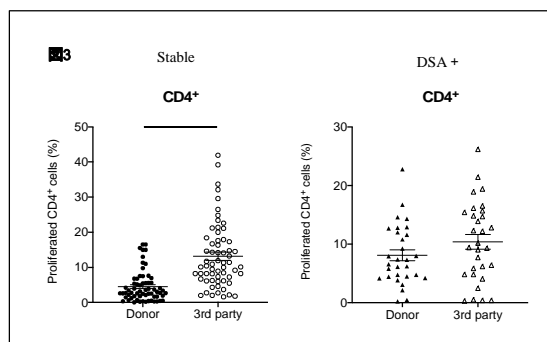
(4) ドナーに反応する CD4 陽性細胞のサブセット解析: DSA+群でドナーに対する CD4+ T cell の反応の亢進が亢進していたことから、DSA+群においてどの CD4+ T cell サブセットが活性化しているのかを検討した。結果、DSA+群では 1 型ヘルパー T 細胞 (type 1 helper T cell: Th1) と 17 型ヘルパー T 細胞 (type 17 helper T cell: Th17) のドナーに対する反応が stable 群と比べ亢進していた(図 4)。また、末梢血においても検討したが Th1, Th17 ともに、両群間に差は無かった。以上より、DSA の産生、CAAMR の発症に CD4 陽性細胞の中でも、特に Th1, Th17 が強く関与していることが示唆された。また、モニタリングには末梢血の測定では不十分で、MLR を施行する必要があることも明らかになった。

(5) 早期診断の可能性についての検討:

最後に、stable 群、DSA 群+を DSA+ without rejection 群と DSA+ with CAAMR 群に分け、3 群で CD4+ T cell, Th1, Th17 の反応を比較した。ドナーに対する Th1 の反応は stable 群と比べ、DSA+ without rejection 群および DSA+ with CAAMR 群は共に亢進していた。Th1 が DSA+ without rejection 群ですでに反応が亢進していることから、MLR 試験による Th1 のモニタリングは、CAAMR の早期診断法として有用である可能性が示唆された (図 5)。

(6) 尿中 ORM1 測定による早期診断法の可能性の検討:

腎機能が正常で DSA が陰性の 52 例の尿サンプルの尿中 ORM1 を測定し、2 年後以降に DSA 陽性となった群 (5 例) と、DSA が陰性のままであった患者群 (47 例) で比較したが両群間に有意な差は無く、尿中 ORM1 測定によって CAAMR を早期診断するのは困難であった (図 6)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 HAYASHI Asako, OKAMOTO Takayuki, NIO-KOBAYASHI Junko, IWAHARA Naoya, SUZUKI Ryota, UEDA Yasuhiro, TAKAHASHI Toshiyuki, Yasuyuki SATO, IWANAGA Toshihiko, HOTTA Kiyohiko | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 CD44 as a pathological marker for the early detection of calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity post kidney transplantation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biomedical Research | 6. 最初と最後の頁 181 ~ 186 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.43.181 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Hirose Takayuki, Hotta Kiyohiko, Harada Hiroshi, Tanabe Tatsu, Sasaki Hajime, Shinohara Nobuo | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Vesicoureteral reflux treatment following kidney transplantation potentially prevents graft function deterioration and allows long term graft survival | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Urology | 6. 最初と最後の頁 699 ~ 706 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14876 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Hotta Kiyohiko, Hirose Takayuki, Kawai Tatsuo | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Clinical trials for renal allograft tolerance induction through combined hematopoietic stem cell transplantation: A narrative review | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Urology | 6. 最初と最後の頁 1397 ~ 1404 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.15035 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Rosales Ivy A., Mahowald Grace K., Tomaszewski K, Hotta K, Iwahara N, Otsuka T, Tsuji T, Takada Y, Acheampong Ellen, Araujo-Medina Milagros, Bruce Amy, Rios Andrea, Cosimi Anthony Benedict, Elias Nahel, Kawai T, Gilligan Hannah, Safa Kassem, Riella Leonardo V., Tolloff-Rubin Nina E., Williams Winfred W., Smith Rex Neal, Colvin Robert B. | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Banff Human Organ Transplant Transcripts Correlate with Renal Allograft Pathology and Outcome: Importance of Capillaritis and Subpathologic Rejection | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology | 6. 最初と最後の頁 2306 ~ 2319 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2022040444 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Sasaki Hajime, Hotta Kiyohiko, Mitsuke Akihiko, Fukasawa Yuichiro, Tanabe Tatsu, Higuchi Haruka, Takada Yusuke, Harada Hiroshi | 4. 巻 53 |
| 2. 論文標題 Long-Term Outcome of ABO-Incompatible Kidney Transplantation in Patients Treated With Low-Dose Rituximab Regimen | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Transplantation Proceedings | 6. 最初と最後の頁 989 ~ 994 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2020.10.023 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Tanabe Tatsu, Hotta Kiyohiko, Iwahara Naoya, Iwami Daiki, Murai Sachiyo, Shinohara Nobuo | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Spontaneous closure of arteriovenous fistula after kidney transplantation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Urology | 6. 最初と最後の頁 872 ~ 873 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14576 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀田 記世彦、岩原 直也、高田 祐輔、樋口はるか、辻 隆裕、Ivy Rosales、村上 正晃、Robert Colvin、篠原 信雄 |
| 2. 発表標題 腎移植患者における慢性抗体関連型拒絶反応の早期診断法開発の取り組み |
| 3. 学会等名 第58回日本移植学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 堀田記世彦、大澤崇宏、横田勲、稲尾翼、田邊起、岩原直也、篠原信雄 |
| 2. 発表標題 生体腎移植ドナー腎機能と透析導入リスク；生体腎移植ドナーの長期生命予後と腎機能推移の検討 |
| 3. 学会等名 第57回日本移植学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀田記世彦、佐々木元、田邊起、高本大路、高田祐輔、岩原直也、篠原信雄 |
| 2. 発表標題 脱感作療法、保険収載されたガンマグロブリン大量投与治療；抗ドナー抗体陽性腎移植に対する脱感作療法における高用量IVIg療法 |
| 3. 学会等名 第57回日本移植学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|-----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 村上 正晃 (Murakami Masaaki) (00250514) | 北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授 (10101) | |
| 研究分担者 | 田邊 起 (Tanabe Tatsu) (80880096) | 北海道大学・大学病院・助教 (10101) | |
| 研究分担者 | 篠原 信雄 (Shinohara Nobuo) (90250422) | 北海道大学・医学研究院・教授 (10101) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|