

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592384

研究課題名(和文) 血液型不適合移植後に認める血液型抗原キメラについての解析

研究課題名(英文) Endothelial chimerism after ABO-incompatible kidney transplantation

研究代表者

石田 英樹 (Ishida, Hideki)

東京女子医科大学・医学部・臨床教授

研究者番号：60246543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：移植臓器におけるカイメリズムはレシピエント由来の細胞がドナー臓器の血管壁等に混入する現象として定義される。この研究では、移植臓器におけるカイメリズム現象の割合、カイメリズム現象を起こす移植臓器の生着状態、を調べることである。血液型不適合移植腎臓の病理標本を免疫染色した。血液型抗原を染色することによって調べた。全症例49例中12例に血管カイメリズムを認めた。12例中7例は激しい抗体関連型拒絶を起こしたものであった。カイメリズムを起こした移植臓器はおこしていない臓器に比較して移植腎機能が悪かった。以上より、移植臓器に認められるカイメリズムは激しい免疫反応の結果であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Endothelial chimerism in transplanted organs can be defined as the presence of recipient-derived endothelial cells in the donor organ. First, we investigated the presence of chimerism in renal allografts of ABO-incompatible kidney transplantation recipients. Second, we analyzed the association between chimerism and the clinical course. We investigated the presence of chimerism in renal allografts of ABO-incompatible kidney transplantation recipients by immunohistochemical detection of blood type A and B antigens and assessed the association between chimerism and the clinical course. Twelve of the 49 patients (24.5%) exhibited endothelium chimerism in a biopsy sample. Among the 12 patients with endothelium chimerism, 7 patients (59%) had acute and chronic active antibody-mediated rejection. The graft survival rate in the chimerism group was significantly lower than that in the no-chimerism group. Endothelial chimerism appears to be a hallmark of vigorous immune or non-immune responses.

研究分野：腎移植

キーワード：腎移植 血液型不適合 抗体 カイメリズム

1. 研究開始当初の背景

この10年間で腎臓移植における急性拒絶反応の治療は目覚ましい発展を認め、それに伴い移植腎生着の著しい改善を認めるようになった。しかしながら、長期の生着成績は不変であり、10～15年における移植腎生着率は変わらない。移植後長期において最も大きく変化するのは血管内皮細胞の性状である。血管壁の内皮細胞に認められる血管カимерリズムは昔から唱えられてきた。血管カимерリズムとは本来のドナー由来の細胞中にレシピエント由来の細胞が混入することと定義されており、その機序に関しては不明である。さまざまな臓器に認められ、肝臓を中心に心臓や肺臓においても報告されている。カимерリズムを起こした結果に関してはさまざまな異論がある。1960年代にはノーベル賞を受賞した Medawar 博士の仕事がカимерリズムを唱えた論文として特に重要であり、彼は移植臓器の細胞がレシピエント由来に置き換わることで移植臓器がより長期に生着するための必要十分条件であると報告している。しかし、最近の報告ではこれとは全く異なり、激しい血管型の拒絶反応を起こした結果、カимерリズムは観察されるとするものもある。また全くカимерリズムと移植臓器の生着とは関係のない事象であると結論する論文も見受けられる。一方でカимерリズムを血管内皮に証明する免疫組織的な染色方は極めて難しく微量のレシピエント由来の血管内皮細胞に認めるタンパク質はいままで様々な方法で試みられてきている。代表的なものには女性のドナー臓器中に男性レシピエントの Y 染色体を In situ hybridization で証明するものなどがあるが、女性に妊娠歴がある場合などには偽陽性に染色される場合もあり、陽性の判定には注意を要する。レシピエント型のミスマッチ HLA 抗原は尚更染色が困難である。

血液型不適合移植をこれらのカимерリズムを証明する有効なサンプルであると我々は考えた。われわれは1989年以降今まで400例を超える血液型不適合移植を手がけてきた。血液型不適合移植の成績はいまや免疫抑制剤の進歩に伴い適合移植のそれに匹敵した生着率を示している。レシピエントとドナーで血液型の異なる移植においてはレシピエント由来の血液型抗原がドナー型の血液型抗原に加えて認めることが予想される。不適合移植の移植腎臓生検のサンプルを用いて免疫染色を行うことによってカимерリズムの解明をすることを目的とした。

2. 研究の目的

血液型不適合移植の移植腎の腎臓生検のサンプルを用いて全体のどのくらいの割合においてカимерリズムが起きているのか、頻度について調べる。カимерリズムの起きている移植腎臓の標本をさらに詳しく調べて拒絶反応や薬物(カルシニューリン阻害剤)毒性との関係、更には移植腎の成績、生着率につ

いて解析をする。レシピエントとドナーで血液型の異なる移植においてはレシピエント由来の血液型抗原がドナー型の血液型抗原に加えて認めることが予想される。不適合移植の移植腎臓生検のサンプルを用いて免疫染色を行うことによってカимерリズムの解明をすることを目的とした。

3. 研究の方法

患者：患者背景は Table のごとくである。このコホート研究には33人の女性患者および16名の男性患者が含まれている。平均年齢は46歳であった。すべての患者が血液透析を受けていた患者であり内4名は腹膜透析を受けていた。平均透析期間は30ヶ月、研究における平均フォローアップ期間は70ヶ月であった。血液型抗体価は2倍から256倍であり、免疫抑制剤は3剤併用療法で行われた。血液型不適合のために術前には抗体を除去するための血漿交換が全例において3回行われ、また2004年までは移植と同時に脾臓の摘出を行った(28例)。残りの21例は2005年以降でリツキシマブを移植の前に投与された。

Table 1. Patient demographics

Patient demographics	(N=49)	HLA-AB mismatches, n	2/13/18/11/0
Follow up months	70(7-233)	HLA-DR mismatches, n	5/24/20
No. of Tx 1 st / 2 nd , n (%)	44 (89.8%) / 5 (10.2%)	CDC B crossmatch positive, n (%)	9 (18.4%)
Recipient Age	46.4 ± 13.0	PRA (mean, %) class1 / class2	11 ± 25 / 5 ± 10
Male recipient, n (%)	33 (67.3%)	Luminex single DSA, n	5/19/5/6
Donor age	56.9 ± 10.9	Induction immunosuppression, n	
Male donor, n (%)	14 (28.6%)	CSA+AZ	9
Duration of hemodialysis (month)	30 (16-59)	TAC+AZ / TAC+MZ / TAC+MMF	1/1/38
ABO incompatibilities		Basiliximab induction	28 (57.1%)
A1 to B / B to A1, n (%)	28 (57.1%) / 21 (42.9%)	Rituximab induction	25 (51.0%)
Anti-A/B Ab Titer at Baseline, n		Splenectomy induction	28 (57.1%)
IgM 1:8 / 1:16 / 1:32 / 1:64 / 1:128	6 / 13 / 14 / 10 / 6	No of DFPP before operation (mean)	3.1
IgG 1:<8 / 1:16 / 1:32 / 1:64 / 1:128<	8 / 9 / 16 / 11 / 5		

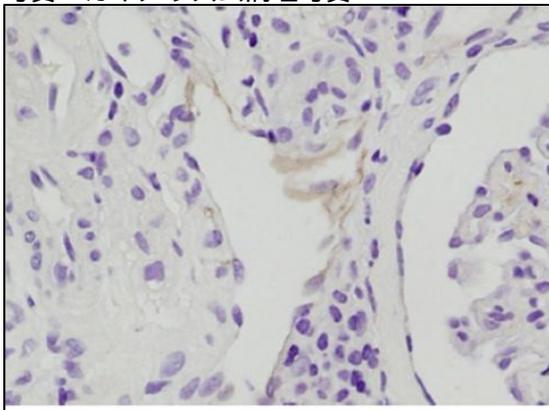
免疫染色法：東京女子医科大学泌尿器科で行われた腎移植症例の移植腎臓生検の検体を使用した。得られた組織の一部で免疫組織染色を行った。具体的には腎組織を3µmに薄切し脱パラフィン後に0.3%過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼの処理、非特異的反応の阻止、一次抗体(抗血液型交代)の負荷(40倍希釈)60分の反応、二次抗体を60分付加後、DABによる発色を行う。判定は患者の背景を知らない病理医によっておこなわれ、ドナーの組織にレシピエントの抗血液型抗体陽性の血管内皮細胞を認めた

場合にカイメリズム現象有りと判定する。

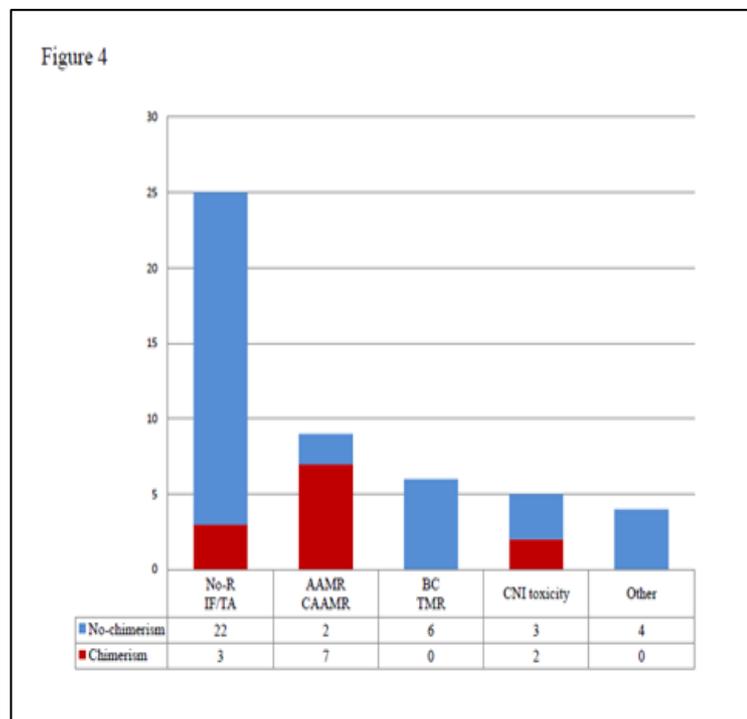
4. 研究成果

カイメリズム現象の発現についての結果：49例中にカイメリズムを発現していたのは12例だった(24.5%)。9例はエピソード生検で残りの3例はプロトコール生検で見つかった。5人はA型不適合移植後、7人はB型不適合移植後であった。性別不適合移植者は10例に認められそのうち6例の男性は女性の臓器を得た。生検が得られた時期は移植後平均36ヶ月であった。12例のカイメリズムを認めた臓器のうち8例は移植腎臓が廃絶していた。カイメリズムの認められた場所は12例中6例が大きな血管であった。また4例は糸球体に認められた。8例は傍糸球体血管の内皮細胞に認められた。1人のみ静脈に認められた(写真)。

写真 カイメリズム病理写真



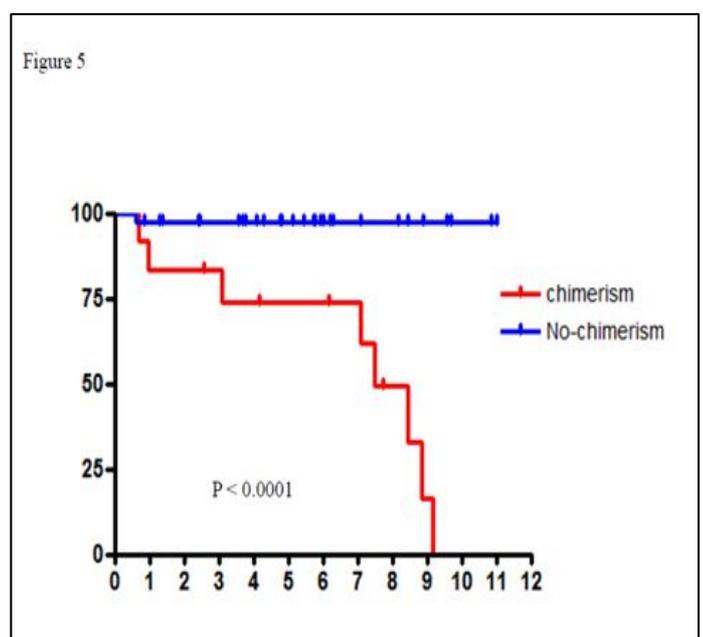
血管内皮細胞のカイメリズムと病理組織検査の関係についての結果：2007年に発表されたバンフ分類からカイメリズムの結果と病理組織検査の結果を解析した。下記のグラフに示すように、抗体関連型拒絶反応を起こした患者9例中7例においてカイメリズムを認めていた。また薬剤毒性を認めた5例中2例にカイメリズムを認めた。一方25例の拒絶反応を起こしていなかった患者でカイメリズムを認めた患者は3例にとどまった。3例は過去に拒絶を認め現在は沈静化している患者であった(次グラフ)。



グラフ：カイメリズムと病理組織(拒絶反応)の関係

血管内皮細胞のカイメリズムと移植腎臓の生着率の関係についての結果：さらにカイメリズムの発現した臓器および発現しなかった臓器における移植腎臓の生着率についてKaplan Meier法で解析を行った。以下のグラフからも明白であるようにカイメリズムを起こした臓器の移植腎の成績は有意差を持って悪かった。

グラフ：カイメリズムを持った移植臓器の生着予後についての解析



3年生着率ではカイメリズム群は83%(カ

イメリズム無し群では97%)5年生着率ではカイメリズム群では74%(無し群では97%)8年生着率ではカイメリズム群では46%(無し群では97%)であった。
($P < 0.0001$)

以上の結果より移植腎臓におけるカイメリズムの発現現象とは、血管内皮細胞を損傷する免疫学的及び非免疫学的(薬剤毒性)の結果であり、カイメリズムを発現する臓器の予後は発現していない臓器に比較して有意差を持って悪かったと言える。この研究ではカイメリズムが移植後の免疫学的な寛容状態を示すものではなかったと言える。

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5件)」

Endothelial chimerism after ABO-incompatible kidney transplantation. Tanabe T, Ishida H, Horita S, Honda K, Yamaguchi Y, Tanabe K. Transplantation 2012.; 93(7): 709-716

Clinicopathological analysis of acute vascular rejection cases after renal transplantation. Shimizu T, Ishida H, Tanabe T, Tanabe K. Transpl Proc. 2012; 44(1): 230-5

Acute vascular rejection after renal transplantation and isolated v lesion. Shimizu T, Tanabe T, Ishida H, Tanabe K. Clin transplant 2012; 24: 2-8

Decrease of blood type antigenecities over the long-term after ABO-incompatible kidney transplantation. Tanabe T, Ishida H, Horita S, Tanabe K, et al. Transpl Immunol. 2011; 25(1): 1-6

A case of transplant glomerulopathy early after kidney transplantation. Shimizu T, Ishida H, Tanabe T, Tanabe K. Clin transpl 2011; 23: 34-8

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田英樹 (ISHIDA Hideki)
東京女子医科大学 医学部 臨床教授
研究者番号: 60246543

(2)研究分担者

田邊一成 (TANABE Kazunari)
東京女子医科大学 医学部 教授
研究者番号: 80188359