

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2015～2016  
課題番号：15K20099  
研究課題名(和文) HSP90阻害剤を用いた臓器移植後拒絶反応に対する新規分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular targeted therapy for rejection after organ transplantation using HSP90 inhibitor

研究代表者  
前鼻 健志 (MAEHANA, TAKESHI)  
札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30718002  
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)：私たちはHeat shock protein 90(HSP90)が腎移植後拒絶反応時のバイオマーカーの一つになる可能性を見出すとともに、拒絶反応発症に関与している事を明らかにした。本研究は同種臓器移植における拒絶反応において、HSP90阻害剤が新規治療薬となり得るか検証することが目的である。HSP90阻害剤である17DMAGの投与により、マウス皮膚、心移植において対照群と比較し有意に移植片の生着が延長した。移植片における細胞浸潤、サイトカイン産生も有意に低下し、ドナー特異的免疫応答も抑制されていた。この結果からHSP90は移植片拒絶反応の新たな治療標的となり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have previously published that HSP90 is a potential serological biomarker of acute rejection (AR) after renal transplantation and plays a role in the development of AR in organ transplantation. The aim of this study was to investigate the immunosuppressive effect of the HSP90 inhibitor 17DMAG in organ transplantation. Administration of HSP90 inhibitor 17DMAG prolonged graft survival versus vehicle group in murine skin and heart transplantations. The allograft of the 17DMAG group decreased neutrophil infiltration into the allografts. In 17DMAG-treated mice, Th1 cell cytokine were significantly reduced. In MLRs analysis, 17DMAG significantly inhibited the proliferation of CD4 T lymphocytes and CD19 B cells. The results of our research suggest that HSP90 inhibition by 17DMAG may have therapeutic potential against AR in allotransplantation.

研究分野：移植免疫学

キーワード：Heat shock protein 90 HSP90阻害剤 臓器・組織移植 拒絶反応

1. 研究開始当初の背景

臓器移植における同種移植片免疫応答においては様々な研究が行われているが、発生機序については未だ不明な点が多く残されている。また移植片拒絶反応に対し、種々の予防・治療法が開発されているものの、課題は多く残されている。拒絶反応発生の機序の更なる解明、新たな治療法が開発が望まれている。

分子シャペロン Heat shock protein 90 (HSP90)は自己免疫性疾患における免疫反応の進展、病勢の変化に深く関与していることが最近明らかされている。組織移植・臓器移植における免疫応答においても関与している可能性が示唆されるが、現在のところ報告はない。

2. 研究の目的

本研究は、腎移植などの同種臓器移植における拒絶反応への HSP90 の関与を明らかにし、治療への応用の可能性につき検証することが目的である。

3. 研究の方法

(1) 腎移植患者における血清 HSP90 濃度と拒絶反応およびその治療経過との関係

腎移植後患者の保存血清を用い、血清 HSP90 濃度を ELISA 法にて測定した。急性拒絶反応発症例、拒絶反応非発症例、慢性拒絶反応症例、薬剤性腎機能障害例、ウイルス感染症発症例において血清 HSP90 濃度を測定し、臨床的特徴と血清 HSP90 濃度の関係について解析した。急性拒絶反応発症例については発症前、発症後、拒絶反応治療後の血清を解析した。

(2) マウス同種皮膚移植モデルにおける HSP90 の関与の解析

C57BL/6 (H-2b)をドナー、BALB/c (H-2d)をレシピエントとした MHC 完全不一致マウス皮膚移植をおこない、移植前、移植後 7 日目、拒絶時の血清 HSP90 値を ELISA 法を用いて測定した。さらに移植後 14 日目に 2 次皮膚移植を行い、急性抗体関連型拒絶反応モデルを作成し、同様に拒絶前後で血清 HSP90 値を測定した。対照群として拒絶反応を発症しない同系皮膚移植 (BALB/c BALB/c)を行い、移植後 7、14、21 日目に血清を解析した。

(3) マウス同種皮膚、心移植モデルにおける HSP90 阻害剤の移植片拒絶抑制効果の検討

HSP90 阻害剤である geldanamycin 誘導体をマウス皮膚、心移植動物に投与し、geldanamycin 非投与群の生着期間を比較する。移植後 7 日目での両群でのグラフト組織学的評価、各種サイトカイン値の評価を行う。さらに移植後 14 日目に脾臓よりリンパ球を採取し、混合リンパ球培養反応による活性評価を行った。

4. 研究成果

(1) 腎移植患者における血清 HSP90

患者血清 HSP90 値は急性 T 細胞性拒絶反応発症時には非発症例と比較し有意に上昇し (中央値 26.71 ng/ml vs 4.05 ng / ml、 $p < 0.001$ )、血管炎を伴う急性抗体関連型拒絶反応例はさらに高値 (中央値 28.79 ng/ml vs 4.05 ng / ml、 $p < 0.0001$ )である傾向を認めた。(図 1) 急性拒絶反応中に高値を示した HSP90 値は、拒絶反応の治療後には拒絶発症前の血清 HSP90 濃度と同程度まで低下した。(図 2) 一方で慢性拒絶反応、その他の移植腎障害では血清 HSP90 の上昇を認めなかった。さらに血清クレアチニン値と HSP90 値の相関を解析したが、各群で相関は認めず、血清 HSP90 はクレアチニン値と相関関係が無い事を明らかにした。

図 1

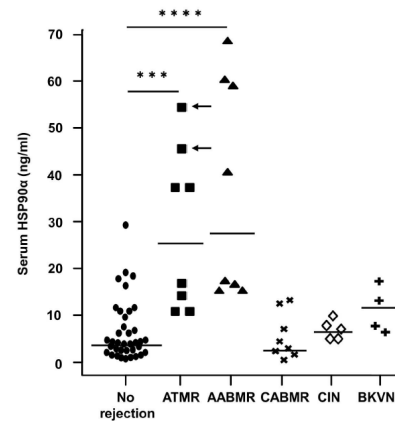
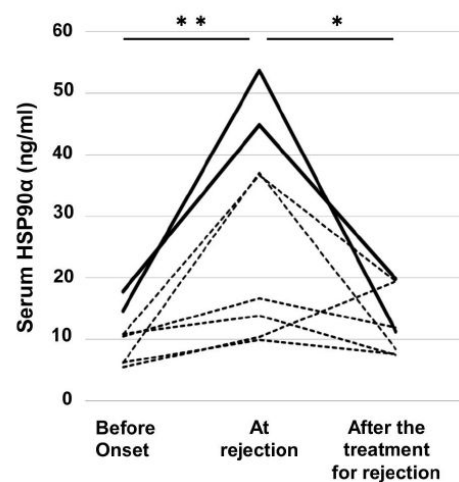


図 2

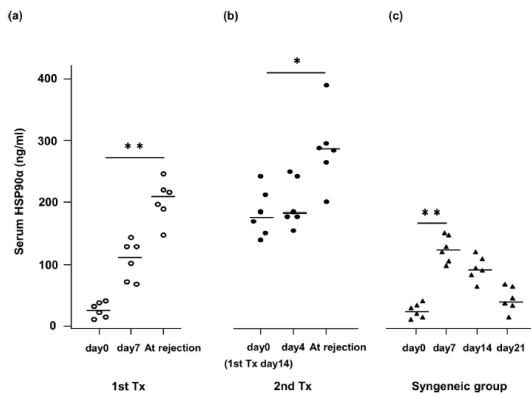


(2) マウス皮膚移植における HSP90

血清 HSP90 値は拒絶反応時に移植前と比較し有意に上昇し (中央値 206.86 ng/ml vs 24.33 ng/ml、 $p < 0.01$ )、二次移植後拒絶反応時にはさらなる上昇を認めた (中央値 286.03 ng/ml vs 178.22 ng/ml、 $p < 0.05$ )。一方で対照群である同系皮膚移植では、移植 7 日目にベースライン値より 4 倍程度の上昇 (124.47 ng/mL vs 24.33 ng/mL、 $p < 0.01$ )を認めたが、14 日目には低下を認め、21 日目での解析ではほぼベースライン値まで回

復した。(図3)

図3



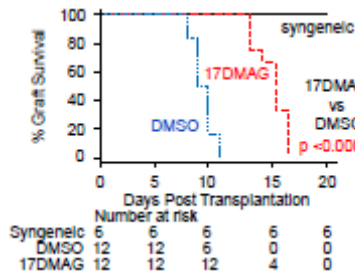
(1)、(2)の結果より HSP90 が拒絶反応の発症に  
関与している可能性が示唆されるとともに、急性拒絶  
反応の新規バイオマーカーになり得ると考えられた。

(3) マウス同種皮膚、心移植モデルにおける HSP90 阻  
害剤の移植片拒絶抑制効果

1. マウス同種皮膚移植での HSP90 阻害剤の治療効果

C57BL/6 (H-2b)をドナー、BALB/c (H-2d)をレシピエ  
ントとした MHC 完全不一致マウス皮膚移植を行い、  
HSP90 阻害剤投与群は geldanamycin 誘導体(17DMAG)  
を移植前 3 日前から連日 1mg/kg で投与した。対照群  
には DMSO を連日投与した。結果として HSP90 阻  
害剤投与群で有意に生着が延長した (median survival  
time: 17DMAG, 14.0 days vs. DMSO, 9.5 days,  $p < 0.0001$ ,  
図4)。

図4



2. マウス同種皮膚移植モデルにおける HSP90 阻  
害剤投与での各種評価

移植後 7 日目のグラフトを摘出し HE 染色で評価  
した結果、HSP90 阻害剤投与群は対照群と比較し  
表皮の肥厚が少なく、真皮内への炎症細胞浸潤が抑  
制されていた。(図5)サイトカイン産生能として評  
価するため、7 日目のグラフト内 IFN mRNA 発現量、  
血清 IFN 値を解析した結果、HSP90 阻害剤投与群  
は対照群と比較し有意に抑制されている事が明らか  
になった(図6)。その他の血清・皮膚グラフトサイ  
トカインの測定を行い、コントロール群と比較し、  
IL-1、IL-2、IL-6、IL-12、TNF などが有意に抑制  
されており、主に Th1

細胞サイトカイン産生を制御する事が示唆された。  
さらに移植後 14 日目に脾臓よりリンパ球を採取し、  
混合リンパ球培養反応による活性評価を行った結果、  
HSP90 阻害剤投与群はドナー特異的免疫応答も抑  
制されていた。(図7)

細胞サイトカイン産生を制御する事が示唆された。  
さらに移植後 14 日目に脾臓よりリンパ球を採取し、  
混合リンパ球培養反応による活性評価を行った結果、  
HSP90 阻害剤投与群はドナー特異的免疫応答も抑  
制されていた。(図7)

図5

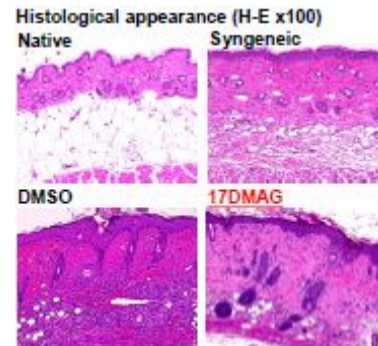


図6

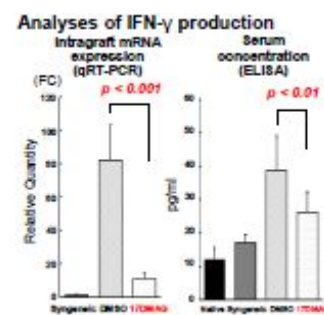
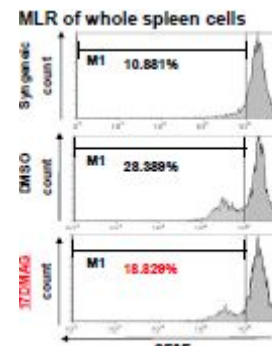


図7



3. マウス心移植での HSP90 阻害剤の治療効果

皮膚移植と同様、MHC 完全不一致異所性心移植  
を行った結果、HSP90 阻害剤投与群で有意に生着  
が延長した (median survival time: 17DMAG, 14.0  
days vs. DMSO, 7.0 days,  $p < 0.001$  )。

以上の結果から急性拒絶反応の発症には HSP90  
が重要な役割を持っており、これを阻害することで  
発症・進行を抑制する可能性が示唆された。同種臓  
器移植における拒絶反応において、HSP90 阻害剤が  
新規治療薬となり得る可能性を示した。

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1件)

Maehana T, Tanaka T, Kitamura H, Fukuzawa N, Ishida H, Harada H, Tanabe K, Masumori N. Heat Shock Protein 90 Is a Potential Serological Biomarker of Acute Rejection after Renal Transplantation. PLoS One. 2016 Sep 15;11(9):e0162942. doi: 10.1371/journal.pone.0162942. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

前鼻健志、田中俊明、北村寛、福澤信之、原田浩、石田英樹、田邊一成、舛森直哉. 腎移植後拒絶反応発症時における新規バイオマーカーとしてのHeat shock protein 90の可能性. 第52回日本移植学会. 9.29-10.01、2016、グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)

Maehana T, Tanaka T, Kitamura H, Masumori N. Heat shock protein 90 inhibitor 17DMAG is a potential new therapeutic agent against acute allograft rejection. 2016 American Transplant Congress. June 11-15, 2016, Boston USA.

Maehana T, Tanaka T, Kitamura H, Masumori N. Heat shock protein 90 inhibitor is a new potential target of antibody-mediated rejection in organ transplantation. Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting 2016. April 4-8, 2016, Tokyo Japan.

Maehana T, Tanaka T, Kitamura H, Fukuzawa N, Ishida H, Harada H, Tanabe K, Masumori N. Heat shock protein 90 is a potential new biomarker of severe acute rejection after renal transplantation. American Urological Association 2015 Annual Meeting. May 15-19, 2015, New Orleans USA.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前鼻健志 (MAEHANA Takeshi)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：30718002

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

田中俊明 (TANAKA Toshiaki)