

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21365

研究課題名(和文) 肝臓移植における抗体関連性拒絶反応抵抗性のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of resistance to antibody mediated rejection in liver transplantation

研究代表者

山田 洋平 (YAMADA, YOHEI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：60383816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、小児肝移植患者の長期生着患者の抗ドナー抗体を測定し、組織学的線維化との関連を解析した。横断研究の結果、抗HLAクラスII抗体陽性患者で、有意に肝細胞周囲線維化が多く観察された。また、原発性硬化性胆管炎に対する肝移植後の再発に抗体が関与しているという仮説の提唱を行い、脱感作療法による再発抑制効果の報告、さらには急性抗体関連型拒絶反応に対する脱感作療法の効果について報告した。

マウスモデルにおいて、肝臓類洞内皮細胞における抗MHC抗体との結合による遺伝子の変化をマイクロアレイを用いて評価し、Proteocadherin 10やTrpm2におけるupregulationが観察された。

研究成果の概要(英文)：This study revealed the association between the presence of anti-donor HLA antibody and the degree of fibrosis in transplanted liver grafts. The detailed analysis of the trend of donor specific antibody was performed in patients who developed acute antibody mediated rejection, and provided the clinical strategies to prevent and control humoral immunity in sensitized recipients or recipients with refractory rejection. We also reported that desensitization might prevent recurrent primary sclerosing cholangitis after liver transplantation based on the national data.

In animal model, we analyzed the molecular mechanism in the binding of target endothelial cells and anti-MHC antibody, utilizing liver endothelial cells and pulmonary endothelial cells. In the microarray analysis, Proteocadherin 10 and Trpm2 are upregulated in liver endothelial cells to higher degree than pulmonary endothelial cells, which potentially indicate the protective mechanism of liver grafts.

研究分野：臓器移植

キーワード：肝臓移植 抗体関連性拒絶反応 脱感作療法

1. 研究開始当初の背景

免疫抑制剤の進歩と周術期管理の向上によって、臓器移植後に数十年生存する症例が増加する中で、慢性拒絶反応による晩期の臓器廃絶や既存 DSA による液性拒絶反応は未だ解決をみない。また慢性拒絶反応の主たる原因の一つとされる DSA の存在は再移植を妨げる非常に大きな障壁の一因をなす。臨床の腎臓移植を始めとする心・肺・膵臓・小腸移植において、レシピエントにおける DSA の存在は相対的禁忌事項となっており、再灌流後に抗体関連性拒絶反応(AMR)を高率に発症する。しかし、一方で肝臓移植においては、特別な状況を除いて、既存の DSA は術後の成績に大きく寄与せず、これまでレシピエント血清とドナー細胞を混合するクロスマッチ試験すら術前に行われることは少なかった。興味深いことに、肝臓および腎臓両方を移植すると、既存の DSA が腎臓に AMR を引き起こすことは稀で、移植前の DSA の存在は問題にならないことが報告されている。

この現象背景には、肝腎同時移植手術の順序が関係しており、肝臓移植が先行して行われることにより、DSA が肝臓に吸着され、その後に行われる腎臓に血流が再開した時点において、そのレシピエントの血液中には DSA が消失しているという事実がある。いわゆる肝臓の腎保護作用である。さらに興味深いことは、移植前の DSA が非常に高い症例や MHC class II に対する DSA が高い症例では、肝臓に血流が再開し、前述した抗体の吸着現象が起こった後も、DSA が残存する現象が起こり、腎臓のみに AMR を引き起こす。そのような状況でも、肝臓に AMR を起こすことは稀であり、肝臓が AMR には抵抗性である事を示唆している。さらに、この事実は臓器特異的な抗原抗体反応に対する分子生物学的な反応の違いを意味し、この現象解明は既存抗体の関与する臓器障害のメカニズムの解明と治療法に新たな可能性をもたらすと考えられていた。

2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、臨床臓器移植の抗ドナー抗体=DSA (Donor Specific Antibody) による免疫応答が各臓器で異なっていることを背景に、マウスとヒトの組織を用いて特に肝臓における **MHC-class I、II の抗原抗体 ligation が誘導する血管内皮の細胞内 signal 伝達・炎症細胞・血小板 recruitment における他臓器との差違**を明らかにし、特に**肝臓における抗体関連性拒絶反応抵抗性のメカニズムを解明すること**にある。また、**どのような条件下で肝臓の抵抗作用が消失し、液性拒絶反応、fibrosis や胆管障害を引き起こすのかを明らかにし、実際の移植患者の生検標本を用いて免疫染色を追加し、その関連を検証すること**、さらには、抗体が引き起こす難治性拒絶反応や原疾患の再発などへの脱感作

療法の効果を検証することである。

3. 研究の方法

検証をマウス、一部ヒトの組織を用いて vivo と vitro のモデルで実行し、抗体反応に対する肝臓組織における反応変化を解析した。(1) 本研究では、小児肝移植患者の長期生着患者の抗ドナー抗体を測定し、組織学的線維化との関連を解析した。(2) 肝類洞内皮細胞 (LSEC) 特異的な MHC ligation における細胞内 signaling を明らかにするために、in vitro で FAK/PI3K を始めとする経路を肺の血管内皮細胞と比較検討した。上記より明らかになった代表的な蛋白や Gene を**移植患者生検標本**において検証し、特に DSA の有無や Fibrosis との関連を検討した。(3) 乳幼児劇症肝炎や急性抗体関連性拒絶反応を発症した患者の血清を詳細に評価し、脱感作療法の効果を検証した。(4) 抗胆管上皮抗体の関与が疑われる原発性硬化性胆管炎の肝移植後の再発予防としての脱感作療法の効果を検証した。

4. 研究成果

(1) 本研究では、小児肝移植患者の長期生着患者の抗ドナー抗体を測定し、組織学的線維化との関連を解析した。横断研究の結果、抗 HLA クラス II 抗体陽性患者で、有意に肝細胞周囲線維化が多く観察された。(2) 動物モデルでは、BALB/c マウスを用いて、肝臓類洞内皮細胞及び肺毛細血管内皮細胞における抗 MHC 抗体との反応による遺伝子の変化をマイクロアレイを用いて評価し、特に肝臓の類洞内皮細胞において Proteocadherin 10 や Trpm2 における upregulation が観察された。しかし、これらの分子の人組織内での染色は困難であった。(3) また、原因不明の乳幼児劇症肝不全後の肝移植には、難治性の拒絶反応が発症することが知られており、抗体関連性拒絶反応の関与が示唆されていた。これらの病態に対して、門脈から持続的にステロイドとプロスタグランジンを注入する治療法によって、難治性拒絶反応をコントロールすることに成功した。(図 1 参照) また、別患者において、急性抗体関連性拒絶反応を発症した患者血清を詳細に解析し、急性期に抗体が拒絶を起こす現象を詳細に解析することに成功した。(4) 抗胆管上皮抗体が肝臓に引き起こす現象として、原発性硬化性胆管炎の移植後再発が知られている。脱感作療法の一つの手段であるリツキシマブによる B 細胞除去療法によって、その再発が抑制されることを全国集計の結果から報告した。(図 2、3 参照)

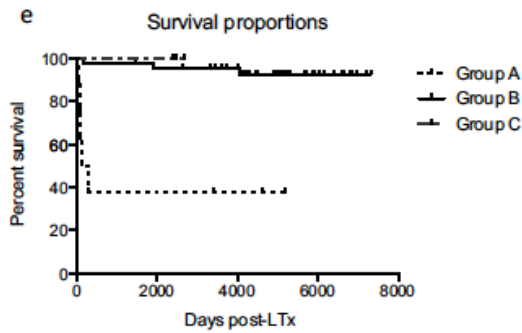


図1：論文より抜粋
Group A: 劇症肝炎に対する肝移植後に、難治性の拒絶反応を発症し、成績不良。Group B: 比較対象として、その他の疾患に対する肝移植後の成績。局所注入療法を併用した Group C では生存率が改善した。

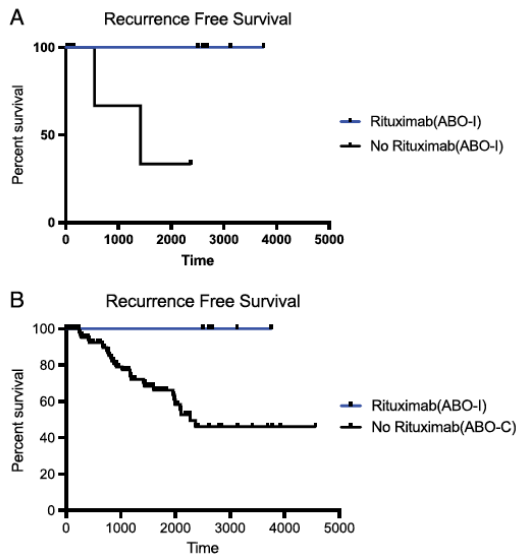


図2：論文より抜粋。
A: Rituximab を使用しない血液型不適合移植の場合、移植後に抗体関連性拒絶反応を発症し、短期成績不良であった。また、長期にもPSCが再発していた。一方で、Rituximabを使用すると、抗体関連性拒絶反応が抑制されると共に、PSCの再発も抑制された。
B: Rituximabを使用した血液型不適合移植の症例とRituximabを使用していない血液型適合肝移植における、PSC再発の有無を比較。Log-rankテストによる有意差は0.0519とわずかに有意差には至らなかったが、抗体にターゲットを置いた治療法が、原病であるPSC再発予防に寄与している可能性が示唆された。

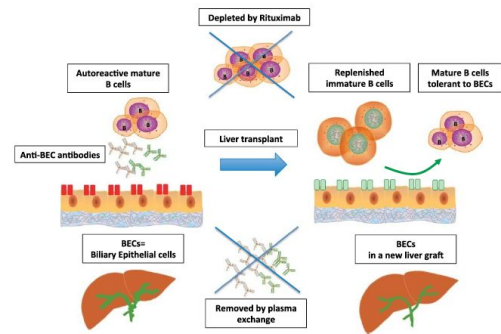


図3：論文より抜粋
肝臓の胆管上皮細胞に対する抗体の除去を行うことで、肝臓移植後にPSCが再発することが抑制できるという仮説の提唱。

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4件)

Rituximab induction to prevent the recurrence of PSC after liver transplantation
-The lessons learned from ABO-incompatible living donor liver transplantation-
Y. Yamada, K. Hoshino, Y. H. Egawa, T. Kuroda et al. *Transplantation Direct*, 2018 in press (査読あり)

Successful management of living donor liver transplantation for biliary atresia with single ventricle physiology - from peri-transplant through total cavopulmonary connection.
Yamada Y, Hoshino K, Kuroda T, et al. *Pediatr Transplant*. 2018 in press (査読あり)

Successful living donor liver re-transplantation for graft failure within seven days due to acute de novo donor-specific anti-HLA antibody-mediated rejection.
Yamada Y, Hoshino K, Kuroda T, et al. *Hepatol Res*. 2017 Jun 19. doi: 10.1111/hepr.12924. (査読あり)

The optimal immunosuppressive protocol for the portal vein infusion of PGE1 and

methylprednisolone in pediatric liver transplantation for fulminant hepatic failure of unknown etiology.

Yamada Y, Hoshino K, Kuroda, et al.

Pediatr Transplant. 2016 Apr 19. doi: 10.1111/ptr.12711. **(査読あり)**

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) PSC に対する血液型不適合肝移植の長期成績

日本移植学会 2017

山田洋平、星野健、黒田達夫、他

(2) **急性抗体関連性拒絶反応によるグラフトロスに対して初回移植後 10 日目に再肝移植を施行した 1 例**

日本肝移植研究会 2017

山田洋平、星野健、黒田達夫、他

(3) PSC 再発予防としてのリツキサン

誘導療法の効果

-Lessons learned from ABO Incompatible liver Transplantation-

日本移植学会 2016

山田洋平、星野健、黒田達夫、他

(4) 原因不明乳幼児劇症肝炎肝移植に対する門脈注入を併用した新たな免疫抑制の試み

日本肝移植研究会 2016

山田洋平、星野健、黒田達夫、他

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山田 洋平 (YAMADA, Yohei)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町) ・

助教

研究者番号 : 60383816