

令和元年6月16日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05465

研究課題名(和文) 移植腎グラフトの長期生着をめざした慢性拒絶反応に対する予防・先制医療の導入

研究課題名(英文) Introduction of preventive and preemptive medicine against chronic antibody-mediated rejection for long-term graft survival

研究代表者

小林 孝彰 (KOBAYASHI, TAKAAKI)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70314010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：腎移植後の長期生着を妨げる要因として、ドナーHLAに対する抗体(DSA)産生による慢性抗体関連型拒絶反応がある。発症すれば難治性であり移植腎機能は廃絶する。DSAの産生を予防すること(予防医療)、早期に診断し対応すること(先制医療)が重要である。本研究では、免疫抑制療法の個別化(最適化)に、T細胞(CD4, CD8), B細胞をターゲットとした薬力学解析、HLA epitope解析が有用であり、血液中のメッセンジャー、マイクロRNA, グラフト由来のDNAを検出することで早期診断が可能となること、シグナル伝達解析により移植腎グラフトの傷害抵抗性を薬剤などで獲得する可能性があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国民成人の8人に1人が慢性腎臓病といわれ、年間4万人以上が末期腎不全となっている。末期腎不全の治療として世界では、腎移植が最良の治療とされているが、わが国ではドナー不足のため腎代替療法を必要とする患者の90%以上が血液透析を選択している。患者の生命予後、QOLそして医療経済を考えれば、透析医療から移植医療へのシフトが不可欠である。本研究では、慢性拒絶反応を防止するための予防、先制治療の可能性が示され、移植医療の課題となっている長期成績の改善につながる有意義な所見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Chronic antibody-mediated rejection is one of major obstacles to long-term graft outcome after kidney transplantation. We focused on preventive or preemptive medicine for de novo DSA production, because anti-rejection treatment has proved ineffective after manifestation of renal dysfunction. CD8+ T cell and B cell-targeting drug sensitivity test could be established. The expression level of CD40L on T cell would be a promising biomarker for antibody production. Potential value of miRNA (142-3p, 1913, 374-5p), mRNA (C11TA, CTLA-4) and donor-derived cell free DNA for preemptive treatment was elucidated. Graft accommodation induced by ABO incompatibility was elicited by up-regulation of CD55/59 and down-regulation of HLA class II through ERK inactivation and mTOR inactivation, respectively. Establishment of T cell indirect recognition assay, analysis of T cell receptor (TCR), and the feasibility of drug-induced graft accommodation should be next challenging subjects.

研究分野：移植外科、移植免疫

キーワード：移植・再生医療 腎移植 慢性抗体関連型拒絶反応 先制医療 マイクロアレイ シグナル伝達

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 腎移植では長期成績の改善が課題・最大の障壁は慢性抗体関連型拒絶反応である。生体腎移植の生着率は5年で約94%近くになり、短期成績は著しく向上しているが、長期成績の改善は伴っていない。移植腎機能喪失の第1位は、慢性拒絶反応(拒絶反応関連)であり、その対策が急務となっている。

(2) グラフト機能障害発症後には、有効な治療法はない。慢性拒絶反応が進行してからでは有効な治療法がないことは知られている。新規 DSA 産生例の腎生検結果より、約半数に subclinical 慢性拒絶反応を認めた。しかし、腎機能障害のない状態での治療でもほとんど改善が認められなかった。

(3) 予防・先制医療の重要性が問われている。先制医療とは、近年提唱されている予防医学的医療戦略であり、病気または重大な組織障害が発症する前の適切な時期に、有効な治療を行い、発症を防止または遅延させることを目標とする。慢性拒絶反応の発症後では有効な治療法がないため、正確な発症前予測に基づく有効な治療法の開発が重要となる。

### 2. 研究の目的

臓器提供不足問題とともに、グラフト長期成績の改善は、腎移植医療の最重要課題である。移植腎グラフト機能廃絶原因の第1位は慢性拒絶反応であり、ドナーHLAに対する抗体(DSA)の内皮細胞傷害によって引き起こされる。慢性拒絶反応が発症してからでは治療は無効であるため、血清中の DSA 検出による早期診断が試みられているが、遅きに失する例が多い。グラフト機能障害の前、さらには DSA が産生される前の段階での対策、すなわち予防・先制医療の導入が鍵となる。本研究では、抗体産生に関わる免疫応答のより早期の段階で検出可能なバイオマーカーを探究し、発症前診断法を確立する。DSA 産生、慢性拒絶反応発症が予測された状態での有効な治療法の開発を試み、腎移植長期成績のさらなる改善を目的として先制医療の実現をめざす。

### 3. 研究の方法

本研究では、前述した目的を効率的に遂行するために、3つのプロジェクト：(1)予防医療の実践、(2)先制医療に必要な発症前診断の開発、(3)発症前の有効な治療法の開発、に分けて実施する。発症後には有効な治療法がほとんどない慢性抗体関連型拒絶反応に先制医療導入の可能性を探究する。

(1) 予防医療の実践には、薬剤の特性、個人差を評価する Pharmacodynamics (PD)解析に基づく免疫抑制療法導入を計画する。従来の T 細胞(whole)でなく subset (CD4, CD8)に分けて解析するとともに、抗体産生に重要な役割を果たす T-B communication を考慮した MHC class II と TCR を刺激するスーパー抗原である SEB (staphylococcal enterotoxin B)を用いたアッセイの開発と実用化をめざす。

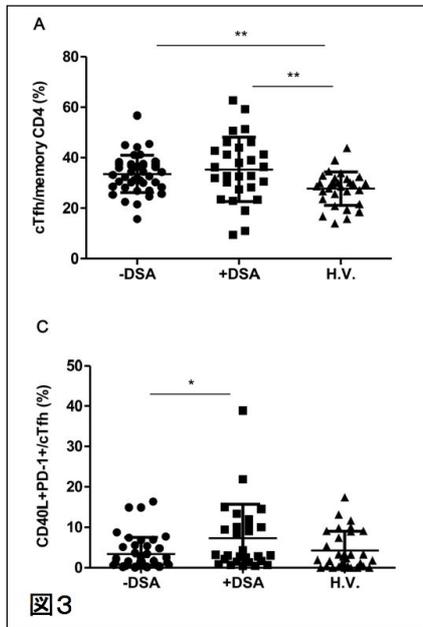
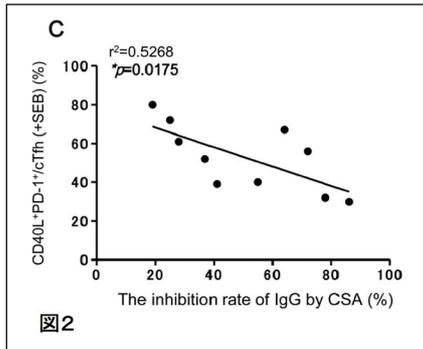
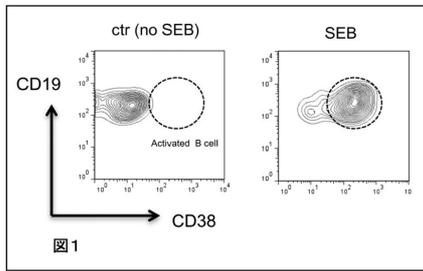
(2) 先制医療に必要な発症前診断の開発では、Liquid Biopsy による Biomarker 探索、次世代シーケンサーを用いた T 細胞受容体(TCR)、B 細胞受容体(BCR)レパトア解析、末梢血メモリー B 細胞培養の改良を計画する。また、cell-free DNA 解析によるグラフト機能障害の早期診断の可能性を探る。

(3) 発症前の有効な治療法の開発では、グラフト内皮細胞の Accommodation (免疫順応)誘導と RNA 干渉、抗体療法の開発である。Accommodation を誘導する薬剤を調べ invitro 内皮細胞モデルで細胞傷害保護効果を確認する。Graft accommodation を誘導する可能性のある抗 A/B 抗体についてもメカニズムを詳細に解析し、薬剤などでの誘導など臨床応用の可能性を探索する。

### 4. 研究成果

#### (1) 予防医療の実践

Pharmacodynamics (PD)解析に基づく免疫抑制療法導入を試みた。従来は Whole T 細胞での解析を行っていたが、CD4 T 細胞、CD8 T 細胞に分離し、CNI (Calcineurin Inhibitor)感受性テストを確立した。CD8 T 細胞の Bottom 値に着目することにより、より明確に CNI 高感受性は CMV, VZV などのウイルス感染との関連を示した。Bottom 値が 25%以下では他の薬剤を考慮するなど、ウイルス再活性化を軽減できた。しかし、ともに高感受性の場合、CNI 減量に伴う急性 T 細胞性拒絶反応のリスクが高いことが判明したため、Valganciclovir 予防投与の必要性が示唆された。また、抗体産生に重要な役割を果たす T-B communication を考慮した MHC class II と TCR を刺激するスーパー抗原である SEB (staphylococcal enterotoxin B)を用いたアッセイを開発に着手した。T 細胞だけでなく B 細胞にも着目し、SEB 存在下での Tfh 細胞と B 細胞の共培養アッセイを確立し(図 1)、IgG 産生まで確認した。IgG 産生に関するカルシニューリン阻害薬の感受性は、Tfh 細胞の CD40L (PD-1) upregulation の程度と相関があり、

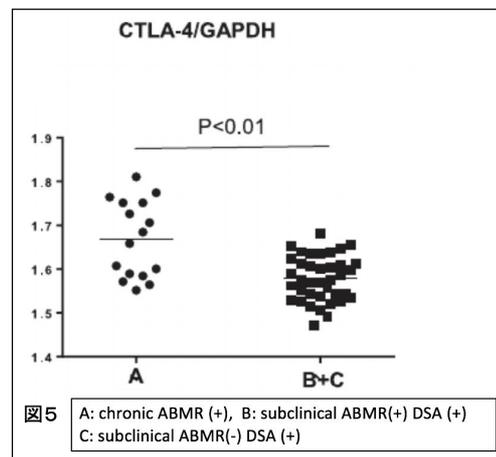
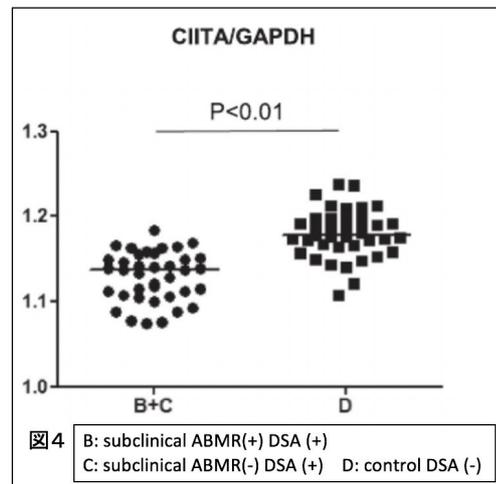


CD40L( PD-1)は T-B 細胞 communication による抗体産生を考慮した薬剤感受性のマーカーとなりうる可能性が示唆された(図2)。また、腎移植後 de novo DSA 産生症例では、コントロール群と比較して、末梢血の CD40L, PD-1 陽性 Tfh の割合が有意に高いことを明らかにした(図3)。また、DRB, DQB に関する B cell EPITOPE ミス

マッチレベルと de novo DSA 産生との関連を調査し、de novo DSA 産生に関わる因子として、過去の急性 T 細胞性拒絶反応、ABO 適合移植、epitope ミスマッチ数が有意な因子として検出された。

## (2) 先制医療に必要な発症前診断の開発

Liquid Biopsy による Biomarker 探索では、serum (plasma) 中の microarray の結果をもとに miRNA を解析した結果、de novo DSA 陽性、慢性抗体関連型拒絶反応と miR-142-3p, miRNA-1913, miRNA-374-5p の関連が示された。PBMC の mRNA 解析では、CIITA が DSA 産生例で正常機能例(コントロール)より有意に低く(図4)、CTLA-4 は慢性拒絶反応例で有意に高かった(図5)。これらの所見を総合すれば、liquid biopsy により腎機能障害前の段階での早期診断が可能になることが示唆された。また、グラフト由来の Cell-free DNA (Circulating cell-free DNA : cfDNA) にも着目した。レシピエント由、ドナー由来の異なる HLA をターゲットとして、次世代シーケンスを用い、ドナー由来 cfDNA 存在比率を測定した。急性拒絶反応時には、1.64%、高度な抗体関連型拒絶反応(急薬による)時には 3.28% であり、経過良好例では検出されなかった。ドナー由来 cfDNA 存在比率は、グラフトの傷害の程度を反映していると推測された。次のステップとして、免疫応答の初期の段階での検出を試みる必要がある。T 細胞受容体(TCR)レパトア解析では、TCR V 領域に着目し、MLR で反応した CD4、CD8 を、次世代シーケンサー、シングルセル PCR、さらには簡易検出方法として flow cytometry により解析に成功した。Dendritic cell を活性化させ、donor cell 由来のペプチドを抗原提示する indirect recognition pathway のモデルを確立し、TCR 解析を行う研究への準備が整った。



## (3) 発症前の有効な治療法の開発

発症前の有効な治療法開発では、Biopsy 検体をもちいたマイクロアレイ解析により、graft accommodation に関わる遺伝子解析を行った。1年後のプロトコール腎生検標本の再解析を行なった。ABO 不適合症例では、ABO 適合症例と比較して、PD-L1 が有意に高いことが判明した。

ABO 血液型不適合症例では、抗 A/B 抗体接着による ERK 阻害による補体制御因子発現増強、mTOR 阻害による HLA class II 発現誘導の軽減など、抗体、補体による細胞障害を軽減する graft accommodation の一つの要因として考えられた。ABO 不適合移植では、適合症例と比較して class II に対する de novo DSA の産生率が有意に低く、B cell EPITOPE を HLA matchmaker を用いて解析した結果、DRB( DRB1, 3, 4, 5) は 0-15 まで、DQB1 は 0-5 までのミスマッチであれば、de novo DSA 産生の可能性がかなり低いことを明らかにした。また、DR に対する DSA 産生も抑制されていることが示された(図6)。臨床での維持期の至適免疫抑制療法に関する重要な情報を提供し、個別化医療の実現に役立つものと考えられた。さらに、AMPK 活性化、ERK 不活性化、mTOR 不活性化に関わる薬剤により graft accommodation の誘導がグラフト長期着生に有用であるか検討すべき時期に到達している。

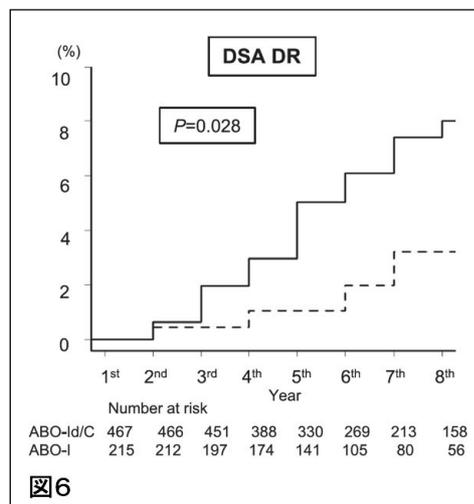


図6

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Kenta Iwasaki, Nana Kitahata, Yuko Miwa, Kazuharu Uchida, Yutaka Matsuoka, Kosei Horimi, and Takaaki Kobayashi. Suppressive effect of everolimus on IL-2, IL-10, IL-21, and IFN levels: Implication for successful minimization of calcineurin inhibitor use in transplantation. *Therapeutic Drug Monitoring* 2019 Jun;41(3):371-375. doi: 10.1097/FTD.0000000000000630. 査読有

Okada M, Watarai Y, Iwasaki K, Murotani K, Futamura K, Yamamoto T, Hiramitsu T, Tsujita M, Goto N, Narumi S, Takeda A, Morozumi K, Uchida K, Kobayashi T. Lower incidence of donor-specific antibodies against HLA-DRB in ABO-incompatible renal transplantation. *Hum Immunol.* 2019, 80: 169-175. doi: 10.1016/j.humimm.2018.12.004. 査読有

Iwasaki K, Kitahata N, Hiramitsu T, Yamamoto T, Noda T, Okada M, Narumi S, Watarai Y, Miwa Y, Uchida K, Matsuoka Y, Horimi K, Kobayashi T. CD40L expression level as a biomarker for predicting calcineurin inhibitor sensitivity against follicular helper T-cell-mediated B-cell activation/antibody production after kidney transplantation. *International Immunology.* 2018, 30: 345-355. doi: 10.1093/intimm/dxy039. 査読有

Yamamoto T, Iwasaki K, Murotani K, Takeda A, Futamura K, Okada M, Tsujita M, Hiramitsu T, Goto N, Narumi S, Watarai Y, Uchida K, Kobayashi T. Peripheral blood immune response-related gene analysis for evaluating the development of subclinical antibody-mediated rejection. *Hum Immunol.* 2018, 79: 432-438. doi: 10.1016/j.humimm.2018.03.012. 査読有

Okada M, Watarai Y, Iwasaki K, Murotani K, Futamura K, Yamamoto T, Hiramitsu T, Tsujita M, Goto N, Narumi S, Takeda A, Morozumi K, Uchida K, Kobayashi T. Favorable Results in ABO-Incompatible Renal Transplantation without B-Cell-Targeted Therapy: Advantages and Disadvantages of Rituximab Pretreatment. *Clinical Transplantation.* 2017, Oct; 31(10): e13071. doi: 10.1111/ctr.13071. 査読有

Iwasaki K, Miwa Y, Haneda M, Uchida K, Kodera Y, Kobayashi T. Negative Regulation of HLA-DR Expression on Endothelial Cells by Anti-A/B Antibody Ligation and mTOR Inhibition. *Transplant Immunology* 2017, 40: 22-30. doi: 10.1016/j.trim.2016.12.004. 査読有

Iwasaki K, Miwa Y, Haneda M, Uchida K, Kodera Y, Kobayashi T. Negative Regulation of HLA-DR Expression on Endothelial Cells by Anti-A/B Antibody Ligation and mTOR Inhibition. *Transplant Immunology* 2017, 40: 22-30. doi: 10.1016/j.trim.2016.12.004. 査読有

[学会発表](計 67 件)

堀見孔星, 松岡裕, 三輪祐子, 岩崎研太, 小林孝彰. De novo DSA を産生させない為の免疫抑制薬のモニタリング. 第 52 回日本臨床腎移植学会、大阪、2019/2/13-15.

前仲亮宏, 岩崎研太, 三輪祐子, 堀見孔星, 松岡裕, 奥村真衣, 打田和治, 斎藤寛子, 小林孝彰. 誘導性 HLA class II の発現は翻訳後に制御できるか. 第 45 回日本臓器保存生物医学会、名古屋、2018/11/9-10.

野田貴幸, 岩崎研太, 三輪祐子, 相原祐子, 河野あゆみ, 斎藤寛子, 小林孝彰. DSA 産

生B細胞の機能解析のための invitro 培養系とヒト化マウスの作製. 第54回日本移植学会、東京、2018/10-3-5.

小林孝彰. 抗体関連型拒絶反応における最新知見と早期適正診断～過剰診断、過小診断をしないために～. 移植腎病理研究会第22回学術集会、名古屋、2018/7/21.

T. Kobayashi, M. Okada, K. Iwasaki, K. Horimi, Y. Matsuoka, Y. Miwa, K. Uchida, A. Takeda, N. Goto, S. Narumi, Y. Watarai. Beneficial effect of ABO incompatibility on de novo DSA production after kidney transplantation. The Transplantation Society (TTS) 2018, Madrid (Spain), 2018/6/30-7/5.

T. Yamamoto, K. Iwasaki, K. Murotani, A. Takeda, M. Tsujita, T. Hiramitsu, N. Goto, S. Narumi, Y. Watarai, K. Uchida, T. Kobayashi. Peripheral Blood Immune Response-Related Gene Analysis for Evaluating the Development of Subclinical Antibody-Mediated Rejection. American Transplant Congress (ATC) 2018, Seattle (USA), 2018/6/2-6.

K. Iwasaki, Y. Miwa, H. Hamana, H. Kishi, A. Muraguchi, K. Uchida, T. Kobayashi. Involvement of PD-L1 Upregulation in Anti-A/B Antibody-Induced Graft Accommodation: Reduction of CD4 T Cell Allo-Response against Graft HLA Class II DR. American Transplant Congress (ATC) 2018, Seattle (USA), 2018/6/2-6

M. Okada, K. Futamura, T. Hiramitsu, M. Tsujita, N. Goto, S. Narumi, Y. Watarai, K. Iwasaki, T. Kobayashi. Lower Incidence of De Novo Donor-Specific Antibodies against HLA-DR in ABO-Incompatible Renal Transplantation. American Transplant Congress (ATC) 2018, Seattle (USA), 2018/6/2-6.

T. Tomosugi, K. Iwasaki, M. Okumura, Y. Matsuoka, K. Horimi, M. Okada, Y. Watarai, T. Kobayashi. Searching for Recipient-HLA Class II and Donor-HLA-Derived Peptide Complexes Inducing Protective Effect against De Novo Donor-Specific HLA Antibodies Formation in Kidney Transplantation. American Transplant Congress (ATC) 2018, Seattle (USA), 2018/6/2-6.

Y. Matsuoka, K. Iwasaki, Y. Miwa, K. Horimi, K. Uchida, T. Kobayashi. Once Daily CNI Administration Based on Pharmacodynamic Analysis for Preventing Viral Infection. American Transplant Congress (ATC) 2018, Seattle (USA), 2018/6/2-6.

小林孝彰. わが国における腎移植の到達点と未来への課題. 第26回日本組織適合性学会、広島、2017/10-27-29.

Yuko Miwa, Kenta Iwasaki, Shunichi Suzuki, Dai-ichiro Fuchimoto, Masaki Iwamoto, Akira Onishi, Takaaki Kobayashi. Mechanism Analysis of Molecular Incompatibility in Protein C-EPCR Coagulation System for Pig to Human Xenotransplantation. 14th Congress of the International Xenotransplantation Association (IXA), Baltimore (USA), 2017/9/20-23.

小林孝彰, 堀見孔星, 渡井至彦, 鳴海俊治, 後藤憲彦, 打田和治, 長坂隆治. "既存抗体陽性例の移植は積極的に行うべきか Cons" 第33回腎移植・血管外科研究会、小田原、2017/7/7-8.

T. Yamamoto, Y. Watarai, A. Takeda, M. Okada, M. Tsujita, T. Hiramitsu, N. Goto, S. Narumi, K. Morozumi, K. Uchida, T. Kobayashi. De Novo Anti-HLA DSA Characteristics and Subclinical Antibody Mediated Kidney Allograft Injuries. American Transplant Congress (ATC) 2016, Boston (USA), 2016/6/11-15.

Kenta Iwasaki, Yuko Miwa, Kazuharu Uchida, Takaaki Kobayashi. mTOR alters the IFN $\gamma$ -induced HLA-DR expression on endothelial cells. Transplantation Science Symposium (TSS) Asian Regional Meeting, Tokyo (Japan), 2016/4/8-9.

〔図書〕 なし

〔産業財産権〕 なし

〔その他〕 Research Map 参照

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：岩崎研太

ローマ字氏名：IWASAKI Kenta

所属研究機関名：愛知医科大学  
部局名：医学部  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：10508881

研究分担者氏名：三輪祐子  
ローマ字氏名：MIWA Yuko  
所属研究機関名：愛知医科大学  
部局名：医学部  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：90572941

研究分担者氏名：丸山彰一  
ローマ字氏名：MARUYAMA Shoichi  
所属研究機関名：名古屋大学  
部局名：医学系研究科  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：10362253

研究分担者氏名：堀見孔星  
ローマ字氏名：HORIMI Kosei  
所属研究機関名：愛知医科大学  
部局名：医学部  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：30634159

研究分担者氏名：松岡裕  
ローマ字氏名：MATSUOKA Yutaka  
所属研究機関名：愛知医科大学  
部局名：医学部  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：20714869

(2)研究協力者：

研究協力者氏名：野田貴幸  
ローマ字氏名：NODA Takayuki  
研究協力者氏名：前仲亮宏  
ローマ字氏名：MAENAKA AKIHIRO  
研究協力者氏名：野畑宏信  
ローマ字氏名：NOBATA Hironobu  
研究協力者氏名：岡田学  
ローマ字氏名：OKADA Manabu  
研究協力者氏名：山本貴之  
ローマ字氏名：YAMAMOTO Takayuki  
研究協力者氏名：友杉俊英  
ローマ字氏名：TOMOSUGI Toshihide  
研究協力者氏名：奥村真衣  
ローマ字氏名：OKUMURA Mai  
研究協力者氏名：猪子英俊  
ローマ字氏名：INOKO Hidetoshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。