

令和元年6月17日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11063

研究課題名(和文) ABO血液型不適合腎移植における免疫学的リスク・ベネフィット解析と抗体治療の開発

研究課題名(英文) Development of immunological risk-benefit analysis and antibody treatment in ABO blood group incompatible kidney transplantation

研究代表者

三輪 祐子 (MIWA, YUKO)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：90572941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ABO血液型不適合腎移植(ABOi-KT)は良好な成績が得られるようになった。現在ABO-iKTの解決すべき課題は、低頻度だが移植後早期に起こる急性抗体関連型拒絶反応(Acute AMR)のリスク因子の究明と、過剰免疫抑制による感染症を防ぐことである。今回我々は、Acute AMRのリスク因子の解析を行い、移植後の過剰免疫による感染症を防ぐために導入した、B細胞除去を目的としたリツキシマブ(RIT)投与回避プロトコルの適応基準を設定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在ABO血液型不適合移植前の脱感作療法において、過剰免疫抑制を避けるために血漿交換回避protocolが良いのか、RIT回避プロトコルが良いのか議論されている。レシピエントにとって安全で、より適切な脱感作療法を選択するために、RIT回避protocolの有用性と問題点が深められれば、より感染症を減らし、患者の負担を回避するプロトコルの選択の幅を増やすことができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：ABO blood group incompatible kidney transplantation (ABOi-KT) has come to have good results. Currently, the problem to be solved by ABO-iKT is to identify risk factors for acute antibody-related rejection (Acute AMR) that occurs infrequently but early after transplantation, and to prevent infection caused by excessive immunosuppression. Here, we analyzed the risk factors for Acute AMR and set the application criteria for the Rituximab (RIT) administration avoidance protocol for B cell elimination, which was introduced to prevent infection due to hyperimmunization after transplantation.

研究分野：移植免疫

キーワード：ABO血液型不適合移植

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ドナー臓器不足の解消のため、抗ドナー抗体陽性(ABO血液型不適合、DSA(ドナー特異的HLA抗体)陽性)移植が積極的に試みられ、ABO血液型不適合腎移植は、適合移植とほぼ同等の良好な成績が得られることが明らかになった。(Exp Clin Transplant.2015;Suppl1:18-22)現在、移植前の適切な抗体除去療法、脱感作療法(脾臓摘出、抗CD20抗体(リツキサン)投与)を施すための議論がなされており、低い確率ではあるが移植後早期に起こる抗A/B抗体による急性抗体関連型拒絶反応(Acute antibody mediated rejection (AMR))のリスク因子を明確にしたうえで、不必要な抗体除去療法、過剰な脱感作療法を行わないことは現在のABO血液型腎移植の課題である。

2. 研究の目的

ABO血液型不適合腎移植は、DSA(ドナー特異的HLA抗体)陽性腎移植に比較して予後が良い。早期の急性抗体関連型拒絶反応(Acute AMR)の頻度は低く、また抗A/B抗体が長期接着しても、慢性抗体拒絶反応(Chronic AMR)は起きにくい。腎グラフトを保護するaccommodation(免疫順応)の状況を引き出し、正に働く傾向がある。抗A/B抗体の接着はDSA抗体によるChronic AMRを抑制できる(ベネフィットな)可能性もある。本研究は、抗A/B抗体接着後早期で起こるAcute AMRの負に働くリスク因子を明確にした後、抗A/B抗体接着後、長期で起こるChronic AMRを抑制している正に働くベネフィット因子を探索し、それらの知見を元にChronic AMR防止のための抗体治療の開発を目指した、将来の臨床応用を視野に入れた研究である。

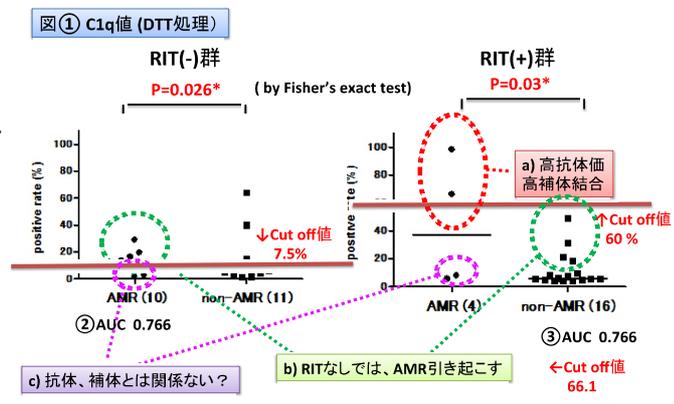
3. 研究の方法

抗A/B抗体によるAcute AMRのリスク因子の解析を行う。我々の関連施設で行われた腎移植患者のAcute AMR群、non-AMR群のレシピエント腎移植前血清を用いて、ドナーが(A or AB型)の抗A抗体、ドナーが(B or AB型)の抗B抗体に分けて、両者に違いがあるかにも注目してi) IgGサブクラス(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), total IgG, IgM測定とii) C1q測定を、96 well plateを用いた大量解析、赤血球フローサイトメトリー法(RBC-FCM)を用いておこなう。C1q測定は、血液の保存法によるばらつきを鑑みて、ヒト血清中より抽出したC1qを加える方法を用いて測定した。解析は臨床応用を視野に入れて、カットオフ値を設定し、2x2表を用い、カイニ乗検定にて解析する。iii)移植前のレシピエント末梢血中のB細胞培養を行う。移植前にレシピエントがT細胞依存性の感作を受けB-2細胞から産生された獲得免疫の抗A/B抗体を持つ場合、ABO血液型不適合移植においてAcute AMRのリスク因子になるか追跡する。方法として、anti CD19抗体ビーズを用いて、ポジティブセレクションによって回収したB細胞を用い、基本培地にB-2細胞をターゲットにしたT細胞依存的に刺激する系a) IL-2, 10, 21のサイトカインにCpGODN, CD40L添加群とcontrolとして、B-1細胞をターゲットにしたT細胞非依存的に刺激する系b)抗IgM-F(ab)'2抗体で刺激し10日間培養を行い、培養液を回収し、抗A/B抗体(IgG, IgM)をA/B抗原を固相化したELISA法にて検出する。Control群で抗A/B群の自然抗体の検出と比較して、抗A/B獲得免疫抗体が存在し検出されるか測定し臨床成績と比較する。またi)で測定しているレシピエント血清中に含まれる抗A/B抗体価、IgGサブクラスの分布との相関性も解析する。

4. 研究成果

【Acute AMR リスク因子の解析結果】

1994年から2017年の間に我々の関連施設でABO-iを受けたレシピエント患者41名のうち、Acute AMRを起こした群(AMR群14名)、起こさなかった群(non-AMR群27名)の抗AのIgG, IgM抗体価、およびIgG subclass (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)そして、補体結合能を測定するためにC1q assayを、赤血球Flow cytometry (FCM)を用いて測定し、その値をROC解析し、cut off値を求め、2x2分割表によって比較検討した。41名のレシピエント患者の腎移植前に施された脱感作療法はそれぞれで、脾摘群(SPX群)ではAMR群/non-AMR群=8名/8名、リツキシマブ投与群(RIT群)ではAMR群/non-AMR群=4名/16名、SPX(-), RIT(-)群ではAMR群/non-AMR群=2名/3名であった。解析結果は、IgGとIgMの比較では、AMR群の中央値がIgGにおいてより高く、IgMより感度が高かった。IgG subclass解析では、IgG1, IgG2, IgG4においてAMR群で優位に高かった。C1q assayにおいても有意にAMR群において高い結果となった。この解析の結果よりRIT freeプロトコルの適応基準は、A) 赤血球凝集反応 $IgG \leq x32$ (MFI値より換算)とDTT処理(IgMを除く処理) $C1q \leq 7.5\%$ (陽性率cut off値)の場合



DFPP は2回施行し RIT 投与はなし。(RIT free 群)(B) それ以外は DFPP は4回施行し、200mg の RIT 投与は2回と定めた。この C1q 解析の中で RIT (-)群と RIT(+)群を比較すると(a)高抗体価、高補体価で RIT を投与しても AMR を起こす症例、(b)RIT 投与がなければ AMR を引き起こす症例、(c)低抗体価でも AMR を起こす症例の存在が示された。(図) (a)においては血漿交換(DFPP)の回数を現在の回数より増やすなど、既存の脱感作療法の変更などで対処できる可能性があるが、(c)においては移植前の抗 A 抗体価が低抗体価であるが、i)抗 A 抗体産生 B 細胞が前駆体細胞として存在している可能性や、ii)この抗 A 抗体を産生する産生細胞のサブセットの違いによって、少量の抗体でも AMR を起こす抗体を産生している可能性も考えられる。また iii)免疫学的要因以外の原因で、わずかな抗体の接着で AMR を引き起こす原因がレシピエント、又はドナー側に存在するのか調査する必要がある。今回の研究では RIT 回避プロトコルをより安全に施行するために、i) ii)のヒト末梢血中に存在する抗 A/B 抗体の産生 B 細胞解析に特化し、レシピエント患者の潜在的なリスク因子を解明する。また血清中の抗 A/B 抗体価、IgG subclass の個人差が血液型抗体産生細胞のサブセットに由来し、Acute AMR のリスク因子となりうるのか解析する必要が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Suppressive effect of everolimus on IL-2, IL-10, IL-21, and IFN γ levels: Implication for successful minimization of calcineurin inhibitor use in transplantation
Iwasaki K, Kitahata N, Miwa Y, Uchida K, Matsuoka Y, Horimi K, Kobayashi T. *Ther. Drug Monit.* 2019 in press
2. Increased CD40L+PD-1+ follicular helper T cells (Tfh) as a biomarker for predicting calcineurin inhibitor sensitivity against Tfh-mediated B-cell activation/antibody production after kidney transplantation.
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. *Int Immunol.* 2018 Jul 24;30(8):345-355.
3. Negative regulation of HLA-DR expression on endothelial cells by anti-blood group A/B antibody ligation and mTOR inhibition
Iwasaki K, Miwa Y, Uchida K, Kodera Y, Kobayashi T *Transplant Immunology* 2017 Feb;40:22-30.
4. Changes in ABCB1 mRNA Expression in Peripheral Blood Cells before and after Renal Transplantation.
Kushihara H, Kuzuya T, Miwa Y, Iwasaki K, Watarai Y, Uchida K, Yamada K, Kobayashi T. *Biol Pharm Bull.* 2016;39(7):1085-90.

〔学会発表〕(計 11 件)

【国内学会】

- 三輪祐子、岩崎研太、大野皓子、野田貴幸、岡田学、山本貴之、渡井至彦、堀見孔星、松岡裕、打田和治、小林孝彰 末梢血 B 細胞培養を用いた、ABO 血液型不適合腎移植におけるリスク因子の解析 第 52 回 日本移植学会総会 2016 年 9/29-10/1 東京 一般演題(ポスター)
- 三輪祐子、堀見孔星、今本由紀、岩崎研太、松岡裕、後藤憲彦、渡井至彦、打田和治、小林孝彰 腎移植後の BK ウイルス再活性化のリスクファクター解析 第 52 回 日本移植学会総会 2016 年 9/29-10/1 東京 一般演題(ポスター)
- 三輪祐子、岩崎研太、鈴木俊一、岩元正樹、大西彰、小林孝彰 異種移植における Protein C-Endothelial Protein C Receptor (EPCR)システムの凝固系分子間不適合メカニズム解析 第 19 回 異種移植研究会 2017 年 2/25 京都 一般演題(口演)
- 三輪祐子、堀見孔星、今本由紀、岩崎研太、松岡裕、友杉俊英、奥村真衣、打田和治、小林孝彰 腎移植前後の BK ウイルスモニタリングによるグラフト長期生着への取り組み 第 53 回 日本移植学会総会 2017 年 9/7-9 旭川 一般演題(口演)
- 奥村真衣、三輪祐子、岩崎研太、友杉俊英、松岡裕、堀見孔星、打田和治、小林孝彰 末梢血 B 細胞培養法を用いた血液型糖鎖抗原に対する抗体産生系の確立 第 53 回 日本移植学会総会 2017 年 9/7-9 旭川 一般演題(口演)
- 三輪祐子、奥村真衣、岩崎研太、岡田学、渡井至彦、堀見孔星、松岡裕、友杉俊英、打田和治、小林孝彰 リツキシマブ回避プロトコルにおける C1q assay の有用性 第 51 回 日本臨床腎移植学会 2018 年 2/14-16 神戸 シンポジウム(口演)
- 奥村真衣、三輪祐子、岩崎研太、友杉俊英、松岡裕、堀見孔星、打田和治、小林孝彰 ABO 不適合移植での B 細胞の CD5 発現と血清中 IgG subclass との関連 第 51 回 日本臨床腎移植学会 2018 年 2/14-16 神戸 一般演題(口演)

三輪祐子、岩崎研太、鈴木俊一、岩元正樹、大西彰、小林孝彰 遺伝子改変ブタ作製におけるヒト型抗凝固因子選択のためのメカニズム解析 第 20 回 異種移植研究会 2018 年 3/10 大阪 一般演題(口演)

三輪祐子、堀見孔星、今本由紀、岩崎研太、松岡裕、友杉俊英、奥村真衣、打田和治、小林孝彰 腎移植後の BK ウイルス再活性化と de novo DSA 産生との関連性 第 54 回 日本移植学会総会 2018 年 10/3-5 東京 一般演題(デジタルポスター)

三輪祐子、岩崎研太、前仲亮宏、鈴木俊一、岩元正樹、大西彰、小林孝彰 SLA(swine leukocyte antigen)に対する抗体接着と凝固系亢進の関連性 第 21 回 異種移植研究会 2019 年 2/16 大阪 一般演題(口演)

【国際学会】

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. IXA 2017 (International Xenotransplantation Association) 9/20-23/2017 Baltimore (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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

腎疾患・移植免疫学寄附講座 <https://www.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060704/06.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小林 孝彰

ローマ字氏名：KOBAYASHI TAKAAKI

所属研究機関名：愛知医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：70314010

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：寄附講座 准教授
研究者番号（8桁）：10508881

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。