

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17591699
 研究課題名（和文） 慢性拒絶反応に関わる抗HLA抗体のクロナリティー変動の解析
 研究課題名（英文） Clonality analysis of anti-HLA antibodies involved in chronic allograft rejection.

研究代表者
 小幡 文弥（OBATA FUMIYA）
 北里大学・医療衛生学部・教授
 研究者番号：60129236

研究成果の概要： 腎移植後に出現する抗 HLA 抗体の変動と拒絶反応との関連性を調べるため、抗 HLA class I/class II、IgG/IgM 各抗体を経時的に解析した。その結果、（1）抗体陽性維持・出現・消失の各症例において、これらの抗体のほぼ全ての組み合わせパターンが観察された。（2）抗体陰性維持群においても陽性群（維持・出現・消失）においても、血清クレアチニン値は低値または中間値を維持する症例が多かった。（3）クレアチニン値の悪化に先立って、抗 HLA 抗体の出現が検出された症例が観察された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	1,000,000	0	1,000,000
2006年度	800,000	0	800,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腎移植，慢性拒絶反応，抗 HLA 抗体

1. 研究開始当初の背景

細胞性免疫による移植臓器の急性拒絶反応は、1980年代後半に登場したシクロスポリンおよびタクロリムスによって飛躍的に改善された。一方、移植後5～10年後に発症する慢性拒絶反応については、発症機序が不明

な点が多く、その解明と克服は移植医療における重要課題である。

移植後に出現する抗 HLA 抗体は、慢性拒絶反応と強く関連する事が知られている。移植片への抗体の吸着が炎症反応の引き金となり、慢性拒絶反応を進行させると考えられて

いる。出現する抗体の特異性は、ドナー特異的なものから非特異的なものまでさまざまである。しかしその際、どのような特異性あるいはどの程度のクロナリティー（多様性）を持つ抗体が、どのような時間的経過をたどって産生されるのかは全くわかっていない。従って、慢性拒絶反応に至る抗体の実体と挙動は解明されていない。

2. 研究の目的

腎移植患者の血清中に産生された抗HLA抗体の特異性・多様性を経時的に解析し、移植腎の機能維持との関連を探る。

3. 研究の方法

血中抗HLA抗体の解析：腎移植患者 87 例を対象に、1 年間隔で血清を採取した。血清を HLA class I および class II PRA beads (screening, single antigen) と反応させた。2 次抗体としては FITC 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体および抗ヒト IgM 抗体を用い、Flowcytometer で測定した。献腎移植においてドナー末梢血が入手可能であった症例では、末梢血リンパ球に患者血清反応させ洗浄後、2 次抗体として FITC 標識抗ヒト IgG 抗体 (IgM は B リンパ球に発現されているため解析不能) および B リンパ球を識別するための PE 標識抗ヒト CD19 抗体を反応させ、Flowcytometry を行った。Non B および B リンパ球双方に陽性を示す抗体は HLA class I 分子を認識するものとみなし、B リンパ球のみに陽性を示す抗体は HLA class II 分子を認識するものとみなした。

4. 研究成果

抗体・クレアチニン値の変動

合計 87 症例について、観察期間中における抗 HLA 抗体 (抗 class I, 抗 class II, IgG,

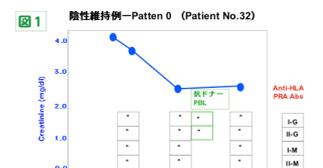
IgM) の変動パターンをまとめた結果を表 1 に示す。また各患者における血清クレアチニン値の変動を表 2 に示す。

表 1 抗HLA抗体の変動パターンのまとめ

標的HLA クラス	IgG		IgM		症例数
	I	II	I	II	
pattern No.					
陰性維持	0	- -	- -	- -	33
小計					33
陽性維持	1	- +	- -	- +	2
陽性維持 (変動なし)	2	- -	- +	- +	2
3	- +	- +	- +	- +	1
小計					5
出現	4	- -	- -	+ -	10
5a	- -	- -	- -	- +	3
5b	+ -	- -	- -	- -	1
6	- -	- -	- -	+ +	3
7	- -	- -	- -	- +	3
8	- -	- -	- -	- +	1
9	- -	- -	- -	+ +	3
10	- -	+ -	- -	+ +	1
小計					25
消失	11a	- +	- -	- -	5
11b	+ -	+ -	- -	+ -	1
12a	- -	+ -	- -	- -	6
12b	+ -	+ -	+ -	- -	1
12c	- -	+ +	- -	- +	1
12d	- +	+ -	- -	- -	1
13	- -	- +	- -	- -	1
14a	- -	+ +	- -	- -	3
14b	- +	+ +	- +	- -	1
14c	+ +	+ +	+ +	- -	1
小計					21
出現後消失	15	- -	- -	+/-	1
16	- -	- -	- -	+/-	1
17	- -	- -	- -	+/-+	1
小計					3
総計					87

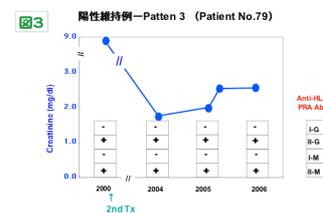
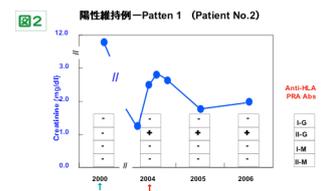
Pattern 0

いずれの抗体も検出されなかった陰性維持例は 33 例 (38%) 観察され、それらの症例におけるクレアチニン値は 3 例 (Patient 35, 49, 139) を除き低値または中間値で安定していた。抗体陰性維持例として Patient 32 を示す (図 1)。



Pattern 1

陽性抗体の種類が全く変動せず維持された例は 5 例 (6%) であり、クレアチニン値は Patient 54 で悪化した。他の 4 例では 2 近辺



の値を維持した。抗体陽性維持例として Patient 2, 79 を示す (図 2, 図 3)。

表2 抗体の変動パターンと血清クレアチニンの変動

クレアチニン値(mg/dl)の色分け
1.9> 2.0-3.5 3.6<

Antibody	IgG IgM	Patient ID	Serum Creatinine (mg/dl)					
			2004年	2005年	2006年	2007年		
維持	pattern 0	4	1.7	1.7	2.0			
		8	0.9	0.8	0.9			
		9	2.3	2.5	2.6			
		10	2.4	2.2	3.0			
		11	1.0	0.9	1.4			
		17	1.4	1.2				
		19	1.5	1.5	1.9			
		21	1.7	1.6	1.8			
		22	1.3	1.2	1.3			
		32	4.2	2.5	2.6			
		35	1.7	2.3	4.9			
		38	1.3	1.4	1.4			
		44	2.4	2.2	3.3			
		46	1.1	1.1	1.2			
		49	3.7	6.5	1.2			
		51	1.2	1.2	1.2			
		55	1.3	1.2	1.3			
59	1.7	1.7	1.7					
62	0.5	0.5	0.5					
63	1.6	2.0	2.0					
64	1.0	1.0	0.9					
71	1.8		2.0					
73	1.8	1.7	1.7					
出	pattern 4	34	2.3	2.0	2.2			
		36	4.9	15.1 HD				
		58	2.1	2.1	2.3			
		66	0.6	0.8	0.9			
		68	1.4	1.7	2.0	4.4		
		72	2.0	1.9	1.7			
		90	1.9	1.9	2.2			
		98		3.1	2.6			
		124		1.0	1.1			
		132		3.3	1.4			
		76	1.6	1.4	1.4			
		99		1.1	0.9			
		現	pattern 5	101		2.3		3.8
127				1.9				
40	1.7			1.8	2.1			
113				1.4				
117				2.1	2.0			
消	pattern 7			15	1.0	1.0	1.0	
				60	1.0	1.0	0.9	
				80	0.7	0.7	0.8	
				29	2.5	3.0	3.7	
				69	0.9	0.8	0.7	
		82	0.8	0.9	0.8			
		106		1.4	1.2			
		153		1.4	1.6	1.9		
		失	pattern 11	24	0.5	0.9	0.9	
				45	4.0	3.8	4.1	
50	3.0			3.2	3.3			
67	1.5			1.3	1.3			
83	1.2			1.3	1.4			
93	2.3			2.3	2.7			
6	1.9			2.3	1.9			
20	1.4			1.4	1.9			
23	2.0			2.3				
25	1.4			1.3	1.4			
出現後	pattern 12	30	1.1	1.3	1.1			
		31	1.1	1.5	1.8			
		57	1.0	1.0	1.0			
		77	1.3	1.4	1.9			
		94		1.3	1.0			
		28	2.7	4.0				
		3	2.0	2.1	3.1			
		14	1.8	1.6				
		33	1.7	1.5	1.5			
		39	6.3	10.4 HD				
消失	pattern 13	88	1.4	1.7				
		47	1.5	1.3	1.3			
出現後	pattern 16	53	6.2	3.5	4.5			
		131	2.3	2.3	2.3			

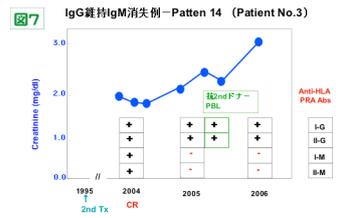
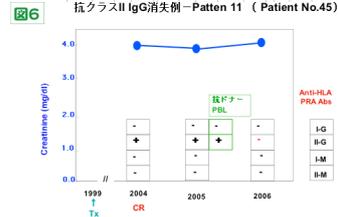
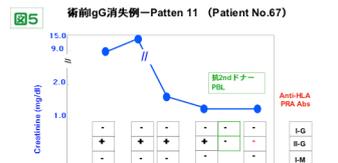
Patterns 4~10

観察期間中に新たに抗体が出現した例は25例(29%)であった。IgGが出現した Patient 36, 68(図 4), 101 および IgM が出現した Patient 29 ではクレアチニン値が顕著に悪化した。他の症例ではクレアチニン値は低値または中間値で安定していた。



Patterns 11~14

観察期間以前に出現した抗体が観察期間中に消失した例は 21 例 (24%) であった。Patient 67 (図 5) で消失した IgG は 1 次ドナーに対する抗体と考えられ、2 次移植後にクレアチニン値は急速に改善



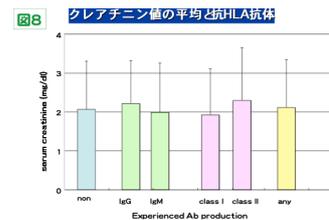
した。一方、Patient 11 (図 6) では抗ドナー抗体消失後もまだクレアチニン値の改善にはまだ至っていない。Patient 3 (図 7) および Patient 39 では、IgM 抗体が消失したもののドナーに対する IgG 抗体が維持され、クレアチニン値は悪化した。

Patterns 15~17

抗体が出現後 1 年以内に消失した例は計 3 例 (4%) であった。Patient 47, 53 では、出現した抗体の PRA 陽性率が低く、弱い抗体であったと推測されるが、後者ではクレアチニンは高値を維持した。

統計学的解析

抗体陰性維持群、IgG 陽性群、IgM 陽性群、抗 class I 陽性群、抗 class II 陽性群、いずれかの抗 HLA 抗体陽性群において、各患者のクレアチニン値 (最近値) の平均値



を比較した結果、有意差は検出されなかった（図8）。またクレアチニン値が30%以上悪化した症例数を抗体陰性群と陽性群間で比較した場合も有意差は検出されなかった（表3）。

表3 クレアチニン値悪化症例数と抗HLA抗体

lgG	Cr	変動なし	悪化
+		24	8
-		29	4

class I	Cr	変動なし	悪化
+		32	8
-		29	4

lgM	Cr	変動なし	悪化
+		20	9
-		29	4

class II	Cr	変動なし	悪化
+		22	9
-		29	4

any	Cr	変動なし	悪化
+		40	14
-		29	4

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 3 件）

1. Obata F, Hoshino A, Toyama A. Hydrogen peroxide increases interleukin-12 p40/p70 molecular ratio and induces Th2-predominant responses in mice. Scand J Immunol 2006;63(2):125-130. (査読有り)
2. Croute F, Beau B, Murat JC, Vincent C, Komatsu H, Obata F, Soleilhavoup JP. Expression of stress-related genes in a cadmium-resistant A549 human cell line. J Toxicol Environ Health A. 2005;68(9):703-718. (査読有り)
3. Obata F, Yoshida K, Ohkubo M, Ikeda Y, Taoka Y, Takeuchi Y, Shinohara N, Endo T, Baba S. Contribution of CD4⁺ and CD8⁺T-cells and interferon-gamma to the progress of chronic rejection of kidney allografts: The Th1 response mediates both acute and chronic rejection. Transplant Immunol 2005;14(1): 21-25. (査読有り)

〔学会発表〕（計 7 件）

1. Obata F, Yoshida K, Takeuchi Y, Tsuchida M, Endo T, Baba S. Correlation analysis among serum anti HLA antibodies, CD4⁺, CD8⁺, and CD19⁺ cells in renal allografts. XXII International Congress of The Transplantation Society (Sydney)

2008.8.11

2. 吉田一成、竹内康雄、若井陽希、馬場志郎、小池淳樹、小幡文弥 血漿交換とステロイド療法に低容量 Rituximab 併用投与にて長期改善を認めた抗体関連拒絶反応の1例 第16回日本組織適合性学会大会（京都）2007.9.11
3. 平山貴博、吉田一成、小幡文弥、竹内康雄、小池淳樹、遠藤忠雄、馬場志郎 ABO不適合腎移植患者における抗体関連拒絶の1例 第43回日本移植学会総会（仙台）2007.11.24
4. 小幡文弥、吉田一成、土田繭美、竹内康雄、遠藤忠雄、馬場志郎 腎移植患者における抗HLA抗体の変動に関する解析-第2報 第42回日本移植学会総会（千葉）2006.9.9
5. 比佐華菜子、吉田一成、竹内康雄、遠藤忠雄、馬場志郎、小幡文弥 腎移植患者における抗HLA抗体の変動解析-第2報 第15回日本組織適合性学会大会（東京）2006.9.30
6. 松井由紀子、吉田一成、竹内康雄、大久保みどり、遠藤忠雄、馬場志郎、小幡文弥 腎移植患者における抗HLA抗体の変動解析 第14回日本組織適合性学会大会（熊本）2005.10.3
7. 小幡文弥、吉田一成、竹内康雄、大久保みどり、遠藤忠雄、馬場志郎 腎移植患者における抗HLA抗体の変動に関する解析 第41回日本移植学会総会（新潟）2005.10.30

〔図書〕（計 1 件）

小幡文弥「新規キナーゼ様分子 LRRK2 の機能解析」、ブレインサイエンスレビュー2008（伊藤正男、川合述史編）pp181-198, クバクロ、東京、2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小幡 文弥 (OBATA FUMIYA)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号：60129236

(2) 研究分担者

吉田 一成 (YOSHIDA KAZUNARI)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：10174921