

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09725

研究課題名(和文)慢性腎臓病患者の免疫不全における免疫チェックポイント機構の役割

研究課題名(英文)A role of immuno checkpoints for an immunodeficiency of patient with chronic kidney disease

研究代表者

松本 明彦(Matsumoto, Akihiko)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：90451806

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)：血液透析患者40名、腎癌患者2名、膀胱癌患者2名に対して、血液検体の採取、保存を完了し、血液透析患者からはQOL調査を38名から聴取した。

QOL調査はKDQOL-SFを用い、解析可能な血液透析導入患者9名と血液透析導入1年以上経過の患者17名について、腎疾患特異的尺度と包括的尺度(SF-36)を比較した。腎疾患特異的尺度4項目、包括的尺度5項目で、透析導入患者が透析導入1年以上経過の患者に対して、有意に項目素得点の平均値が高い結果であり、血液透析導入によるQOLの低下が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

QOL調査の結果から、血液透析導入となる保存期腎不全の状態よりも、血液透析導入1年後の患者でQOLが低下していることが示唆されたため、血液透析導入後も腎不全の持続によりQOLの低下が進行することが推定された。腎代替療法として9割以上で血液透析が選択される日本の治療において、QOLをいかに維持するかを考慮する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Blood samples were collected and stored for 40 hemodialysis patients, 2 renal cancer patients, and 2 bladder cancer patients, and a QOL survey was conducted from 38 hemodialysis patients.

In the QOL survey, KDQOL-SF was used to compare the renal disease-specific scale and the comprehensive scale (SF-36) for 9 analyzable hemodialysis-introduced patients and 17 patients over 1 year after hemodialysis induction. With a renal disease-specific scale of 4 items and a comprehensive scale of 5 items, the average value of item scores was significantly higher in patients who had been on dialysis for more than 1 year after dialysis induction.

研究分野：泌尿器科

キーワード：慢性腎臓病 免疫チェックポイント機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

わが国において、慢性腎臓病患者は平成 26 年調査によると 29.6 万人と推定され、その内血液透析を導入した患者は 3.8 万人となっている。末期腎不全は、尿毒素の影響とされる免疫力の低下が著しく、透析導入後 1 年以内における、死因は感染症が 1 位(全体の 26.5%)であり、がん発症率についても、消化器系悪性腫瘍では 1 年以内が 30%以上と最も多い結果となっている。このことから、臨床的に感染症や発がんの予防や早期発見が急務となっている。慢性腎臓病患者の免疫低下の原因としては、尿毒素がそのトリガーとして作用していることが数十年来想定されているものの、いまだそのパスウェイについては検証が十分ではない。免疫学的な観点からは、免疫抑制性の分子 (TGF $\beta$ 、IL-10、IDO、PGE2 など) 抑制性 T リンパ球や免疫応答を司る抗原提示細胞である樹状細胞などが、T 細胞の活性化を抑制させることが想定されており、透析導入に伴い、末梢血中の樹状細胞数が減少することや、透析導入後のリンパ球数が減少するなどといった、主に免疫担当細胞の活性化が阻害されることが知られている。

一方で近年、がん免疫応答の抑制に關与する免疫チェックポイント機構を応用した免疫療法が開発され、すでに抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体が、悪性黒色腫、小細胞肺がんや腎がんなどの固形癌に対して治療の有効性が確認されており、免疫療法のブレイクスルーとして広く認識されることとなった。

## 2. 研究の目的

慢性腎臓病患者は、尿毒素の影響とされる免疫力の低下状態にさらされている。また末期腎不全により透析導入となった場合、導入後 1 年以内で、感染症のリスクや、がん発症率が極めて上昇することが知られている。本研究は、免疫応答の制御に關わる免疫チェックポイント機構を司る PD-1 や CTLA-4 分子などに着目して、慢性腎不全の免疫低下への影響について、ヒトリンパ球を用いた免疫学的手法による解析を行う。その結果をもとに、重度の免疫低下をきたしている透析移行期の患者に対して、免疫チェックポイント機構の制御を行うことが可能となれば、免疫不全の回復や、感染症や発がんリスクの軽減に寄与することができ、予後の改善も期待される。

## 3. 研究の方法

### ・対象者

健常者ボランティア(血清 eGFR80 以上)5 名、血液透析導入時の患者 15 名 (糖尿病性腎症 5 名、腎炎 5 名、腎高血圧症 5 名)、透析導入後 1 年未満の患者 15 名 (糖尿病性腎症 5 名、腎炎 5 名、腎高血圧症 5 名)、透析導入後 1 年以上の患者 15 名 (糖尿病性腎症 5 名、腎炎 5 名、腎高血圧症 5 名) 抗 PD-1 抗体を投与する腎がん患者 10 名(病期分類: pT2N0-1M1 5 名、pT3-4N0-1M1 5 名) を対象患者とする。

対象者の身体所見と検体の採取 (担当: 松本)

対象者のベースラインとして、下記の測定を行うことで、各群間の比較の参考とする。

対象者の身長、体重、血圧、脈拍、performance status、血算、血清 Alb、BUN、Cre、IP、Ca、Na、K、Cl、CRP、血液ガスを測定する。採尿可能な対象者については、尿定性、

尿生化学(Na, K, Cl, Cre, TP)を行う。

#### QOL の評価

対象者の健康関連 QOL を評価することで、腎不全と免疫機能が、QOL において臨床的な関連性を示すかどうかや、腎不全の各原因疾患の比較を行うことで、QOL での変化があるかどうかを確認する。具体的な QOL の評価は、腎疾患で使用される KDQOL-SF(Kidney Disease QOL-Short Form)を用いて問診を行う。

#### フローサイトメトリーによる腎不全患者および腎がん患者のリンパ球分画の解析

リンパ球の表面抗原をフローサイトメーターで検出する手法で、リンパ球分画の組成や免疫チェックポイントの代表的なマーカーの発現を測定し、健常者と腎不全患者、腎がん患者での比較を行う。

フローサイトメトリー用に蛍光色素を標識した抗体 ( CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, CD45RA, CD56, PD-1, CTLA-4(CD152), TIM-3, LAG-3(CD223), FoxP3, CCR4 ) で染色を行う。

#### 抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体を用いたリンパ球の刺激 ( 担当 : 垣見 )

免疫チェックポイント機構の代表的な分子である PD-1 と CTLA-4 の抗体を用いて、リンパ球の刺激による影響が、腎不全患者でどのように変化するかを確認する。

単核球を培養液(RPMI1640 液体培養に、FCS10%とペニシリンストレプトマイシン混合液 1%を混合する)に入れる。リンパ球刺激として、コンカナバリン(ConA) は 0.5-4 $\mu$ g/ml、LPS は 0.5-2 $\mu$ g/ml の濃度希釈でそれぞれ分注投与し、37 $^{\circ}$ C で 12-96 時間培養をしたのち、単核球および培養上清を回収する。抗 CD3 抗体は、PBS で 0.5-2 $\mu$ g/ml とした溶解液を細胞培養プレートにまき、4 時間でオーバーナイトし、抗体を固相化する。単核球をまく前に、抗体液を除去し、PBS で 3 回洗浄する。多段階に濃度調整した抗 PD-1 抗体と抗 CTLA-4 抗体またはコントロールの PBS を投与し、12-96 時間培養したのち、単核球および培養上清を回収する。

#### 細胞増殖試験

リンパ球の刺激を行ったリンパ球について細胞増殖の測定を行うことで、免疫チェックポイント機構の細胞増殖への影響を確認する。

MTT アッセイは、MTT 細胞数測定キット ( ナカライテスク ) を用いて、細胞処理を行い、570nm の吸光度で精細胞数として測定する。または細胞増殖 ELISA キット(ロシュ・ライフサイエンス)を用いて、臭素化デオキシウリジン(BrdU)による ELISA 法により検出を行う。

#### フローサイトメトリーによる表面マーカーの評価

リンパ球刺激を行ったリンパ球について、下記の表面マーカーをフローサイトメーターで測定し、免疫チェックポイント機構を介した発現変化を解析する。

フローサイトメトリー用に蛍光色素を標識した抗体 ( CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, CD45RA, CD56, PD-1, CTLA-4(CD152), TIM-3, LAG-3(CD223), FoxP3, CCR4,

MTG, TMRE, 2NBDG) で染色を行う。

### サイトカイン産生の測定

リンパ球刺激を行った単核球の上清を用いて、ELISA またはフローサイトメトリーによるサイトカインアッセイ(IL-2, IL-4, IL-12, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  測定)を行うことで、免疫チェックポイント機構を介したサイトカインの産生変化を解析する。

## 4. 研究成果

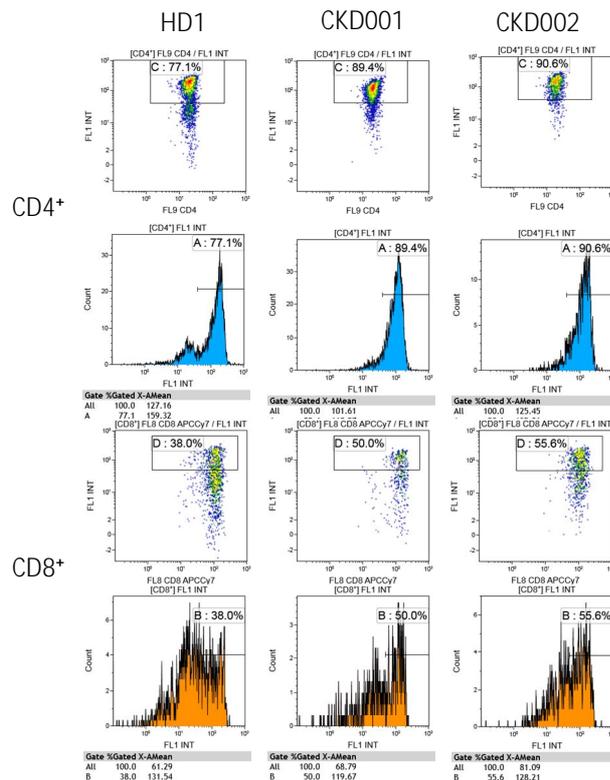
血液透析患者 40 名、腎癌患者 2 名、膀胱癌患者 2 名、健常者ボランティア 1 名に対して、研究に同意いただいた方から、血液検体の採取をした。血液透析患者からは QOL 調査についても 2 名を除く 38 名から聴取を行った。

QOL 調査は KDQOL-SF version1.3 を用いた。解析可能であった血液透析導入患者 9 名と血液透析導入 1 年以上経過の患者 17 名について、腎疾患特異的尺度と包括的尺度(SF-36)を算出した。尺度の中で、症状、ソーシャル・サポート、透析スタッフからの励まし、透析ケアに対する患者満足度、身体機能、日常役割機能(身体)、体の痛み、活力、日常役割機能(精神)について、透析導入患者が透析導入 1 年以上経過の患者に対して有意に項目素得点の平均値が高い結果であった。

現在、採取したリンパ球に対する免疫学的解析として実験を繰り返しているところであり、一例として MTG、TMRE、2NBDG の抗体を用いた健常者、血液透析患者 2 名のフローサイトメトリーを示すが、近日中に解析結果を発表予定である。

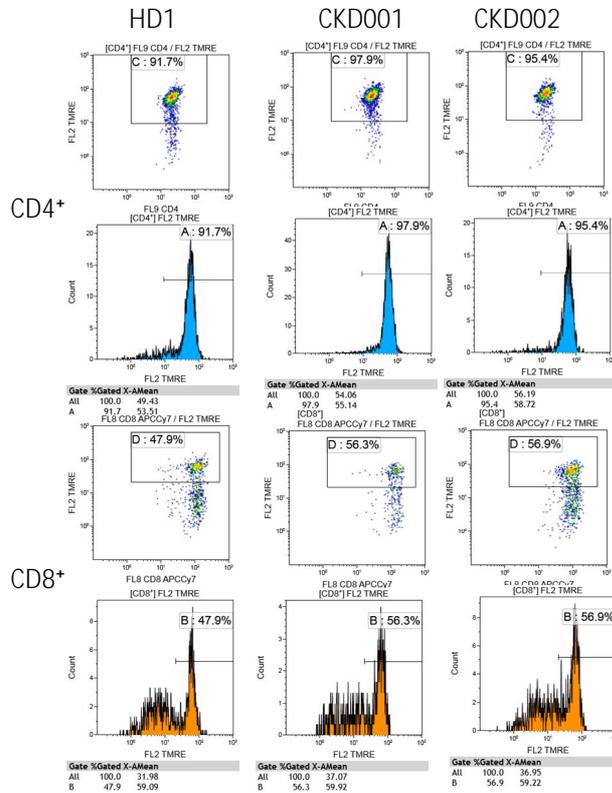
## MTG

MitoTracker Green FM は緑色蛍光ミトコンドリアの染色用です。ミトコンドリアの膜電位に関係なく、ミトコンドリアの検出ができます。



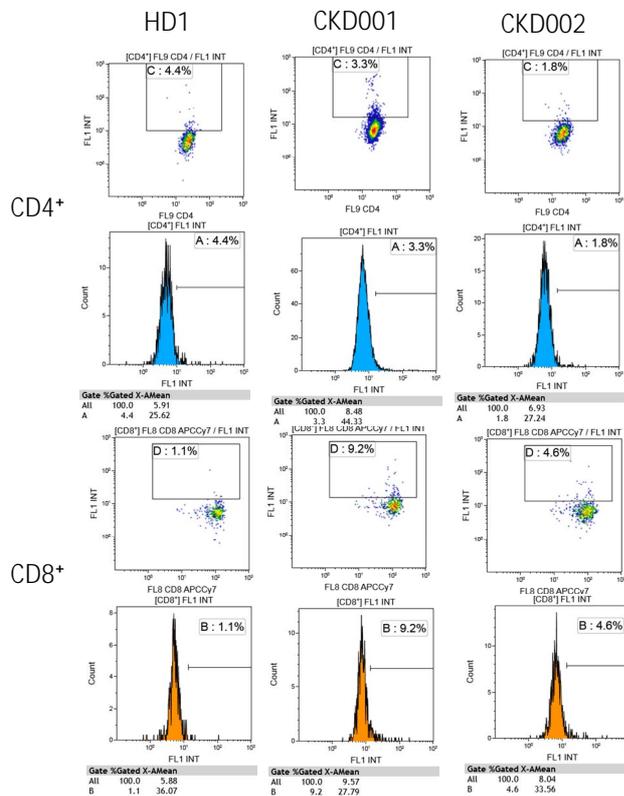
## TMRE

テトラメチルローダミンメチルエステル(TMRM)は、正常な膜電位を有する活動性のミトコンドリアに蓄積する細胞浸透性の蛍光色素です。細胞が健康であり、機能するミトコンドリアを有している場合、シグナルは明るくなります。ミトコンドリア膜電位が減少すると、TMRMの蓄積が止まり、シグナルは暗くなるか、または消失します。



## 2NBDG

2-NBDG (2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose)は、東京農工大学の松岡 英明教授のグループによって合成された蛍光性のグルコースアナログ<sup>1</sup>で、グルコーストランスポーターを介して細胞に取り込まれますが、ほとんどは分解されず蓄積します。2-NBDGによる蛍光量は、細胞のグルコース取り込み量に比例するため、フローサイトメトリーによる解析や、蛍光顕微鏡による観察を行うことができます。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	垣見 和宏  (Kakimi Kazuhiro)  (80273358)	東京大学・医学部附属病院・特任教授    (12601)	