

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11195

研究課題名(和文)糖鎖アレイを利用したABO不適合腎移植における抗体関連型拒絶反応予測検査法の開発

研究課題名(英文) Development of glycoconjugate microarray for the prediction of antibody mediated rejection in ABO incompatible kidney transplant

研究代表者

田崎 正行 (Tasaki, Masayuki)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：40571906

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において、ドナー血液型に対する免疫応答を術前に正確に評価することは、移植後の急性抗体関連型拒絶反応を予防するために重要である。しかし、従来の赤血球を用いた抗体測定は臨床の結果を反映しないことが度々あった。今回、腎臓の血液型抗原に特異的な抗体測定法(CD31-ABOアレイ)を開発し、ABO不適合腎移植後の急性抗体関連型拒絶反応を従来法より、正確に予測できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の赤血球を用いた抗A、抗B抗体の測定法では、移植後の抗体関連型拒絶反応を正しく予測できないことが問題であった。赤血球と腎血管内皮細胞ではA型抗原、B型抗原をもつタンパク質が異なることを我々は過去に報告した。本研究により、新規に開発された腎血管内皮細胞特異的なタンパク質であるCD31にA抗原、B抗原を結合させた糖タンパクアレイを用いた抗A、抗B抗体測定法により、移植前に急性抗体関連型拒絶反応のリスクを正しく評価することができる可能性がある。移植前の免疫抑制療法を過度にやりすぎることによって惹起されうる重篤な感染症や、不十分な免疫抑制療法で起こりうる急性抗体関連型拒絶反応を抑制することが可能になる。

研究成果の概要(英文)：It is important to examine about antibody titer against donor ABO blood group antigen before ABO-incompatible kidney transplantation in order to control acute antibody mediated rejection. However, the results of existing method using red blood cells is not often correlated to clinical outcomes. In the present study, we developed the novel method to examine antibody titer against ABO blood group antigens specifically expressed on kidney endothelial cells. This method showed significant predictive value of acute antibody mediated rejection after ABO-incompatible kidney transplantation.

研究分野：腎移植

キーワード：ABO血液型不適合腎移植

1. 研究開始当初の背景

抗A抗B抗体による抗体関連型拒絶反応 (antibody mediated rejection; ABMR) が起こるため、「免疫学的禁忌」とされてきたABO血液型不適合腎移植だが、現在では、高い成功率と長期移植腎生着が可能となり、生体腎移植の25%を占め、慢性腎不全の治療に多大な貢献をしている。しかし、未だに制御不能のABMRにより、移植後早期に移植腎を摘出せざるを得ない症例があるのも事実である。

ABO 血液型不適合移植においてドナー血液型抗原に対する抗体価測定は ABMR を予測する唯一の手段である。抗 A、抗 B 抗体の測定には、tube test、column agglutination technique、flow cytometry、solid phase red cell adherence technique など、これまで報告されている方法はすべて赤血球に対する反応を指標にしている。実際に、赤血球を指標にした抗体価は ABO 血液型不適合腎移植後の ABMR のリスク評価に有効であるとされ、赤血球も腎臓の血管内皮細胞も ABO 血液型抗原は類似していると考えられる。しかし、赤血球を用いて測定した抗体価と臨床の経過に相関性がない症例もしばしば経験される。すなわち抗体価が高いにも関わらず経過良好の症例がある一方で、抗体価上昇が軽微であっても激しい ABMR のために移植腎を摘出しなければならない症例が存在する。

われわれは、赤血球と腎血管内皮細胞上の血液型抗原は構造上異なることを報告している (Tasaki M, et al. Transplantation. 2009, 87(8), 1125-1133.)。腎血管内皮細胞上では PECAM1 (CD31) が ABO 血液型抗原を保有する中心的なタンパク質であり、赤血球の Band3 などとは異なることが分かった。そこで、CD31 に ABO 血液型抗原を結合させた新しい抗体価測定方法を開発することにより、赤血球ではなく腎血管内皮細胞に特有な血液型抗原に対する免疫応答を解析することが、ABMR を正しく予測する手段となり、より安全に ABO 血液型不適合腎移植を行うことが可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腎血管内皮細胞特異的 ABO 血液型抗原による新しい抗体価測定を開発し、ABO 血液型不適合腎移植前に ABMR の高リスク患者を識別する手法となり得るか検証することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト腎血管内皮細胞に発現する ABO 血液型糖鎖抗原を模倣した糖タンパクアレイ (CD31-ABO アレイ) の開発をする。

PECAM1 (CD31) の糖鎖結合領域を発現ベクターにクローニングし、プラスミドを作成した。ABO 糖鎖抗原を発現させた HEK293 細胞にトランスフェクションさせ、目的のタンパク質に ABO 糖鎖抗原が発現しているか免疫沈降と westernblot で検証した。作成は研究協力者である産業技術総合研究所の創薬基盤研究部門で行った。

ヒト腎正常組織を用い (腎癌で根治的腎摘出術を行った患者の正常腎実質を少量使用。Anti-CD31 antibody (sc-1505-R, SantaCruz) を使用した免疫沈降法 (Protein A/G HP SpinTrap Buffer kit, GE ヘルスケア) を行い、腎血管由来の CD31 を精製した。使用する腎臓は A 型、B 型、O 型の患者からのものをそれぞれ 3 例ずつ使用することとした。精製した CD31 に A 抗原、B 抗原が発現しているか westernblot にて確認した。

HEK293 細胞に発現させた CD31 と、ヒト腎組織から精製した CD31 の ABO 血液型糖鎖構造を、質量分析器を用いて解析し差異がないかを検証する。

検証した HEK293 培養細胞 (CD31-ABO 抗原発現) の培養上清中の分泌タンパク質を採取し、プレートに固相化し CD31-ABO アレイを作成した (Tateno H, et al. Glycobiology.2008, 18(10), 789-798)。市販されている抗 A 抗体、抗 B 抗体 (Ortho clinical diagnostics) や健康者血清を用いて、その特異性を検証した。

(2) 実際のヒト由来の血漿を使用し CD31-ABO アレイの検証を行う。

健康者血漿、各血液型 30 人ずつ計 120 人と、腎移植を待機されている透析患者 80 名の血漿を使用し、作成した CD31-ABO アレイに反応させ、二次抗体を用いて IgG と IgM 別々に測定し、A 型アレイ、B 型アレイ、O 型アレイそれぞれの反応を解析した。同じ検体を用い、赤血球を使用した凝集反応による従来の抗体価測定を行い、アレイとの反応と比較した。赤血球を用いた抗体価測定は、実際の臨床現場で測定し熟練した手技をもつ二人の検査技師により行われた。これにより、ヒトの血中の存在する抗 A 抗体、抗 B 抗体の反応が、赤血球と腎臓とで異なるかなどを IgG、IgM それぞれについて詳細に解析した。

実際の ABO 不適合腎移植患者の血漿を用いて抗体関連型拒絶反応のリスクを予測できるか検討した。ABMR がなかった患者 31 名とあった患者 21 名の 2 群による比較を行った。

4. 研究成果

(1) CD31-ABO アレイの作成と特異性の検証

図 1 のように CD31 を作成した。120 名の健康者血漿と 80 名の腎移植待機患者 (透析患者) の血漿を用いて、特異性を解析した。表 1、2 のように、抗 A 抗体、抗 B 抗体の検出に関して血液型特異的に検出できることが分かった。また、健康者と腎移植待機患者の 2 群間において抗 A 抗体、抗 B 抗体のレベルに有意差はなかった。

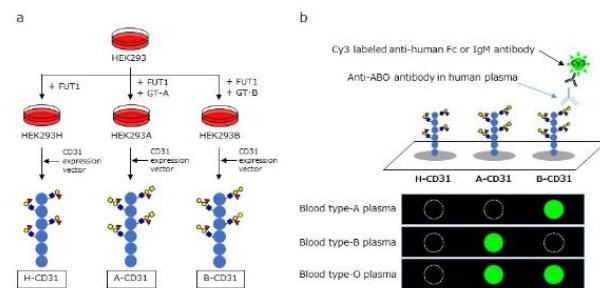


図1. CD31-ABOアレイの作成
a: CD31の糖鎖結合領域を発現ベクターにクローニングしたプラスミドを作成し、O型 (FUT1)、A型 (FUT1/GT-A)、B型 CD31 (FUT1/GT-B) を発現させた HEK293 培養細胞にトランスフェクションさせた。
b: a で作成した O 型、A 型、B 型抗原をもった CD31 シンタクソームをアレイに固相化し、血漿をアレイに反応させ、二次抗体で検出。

表 1. CD31-ABO アレイによる抗 A 抗体の検出結果

	Anti-A Ab (IgG)			Anti-A Ab (IgM)		
	Healthy Volunteers	Hemodialysis patients	p-value	Healthy Volunteers	Hemodialysis patients	p-value
O	58199 (3235-62235)	62146 (5810-65535)	0.596	14666 (1572-59954)	12344 (1819-29384)	0.268
A	0 (0-224)	0 (0-1548)	0.382	0 (0-0)	0 (0-445)	0.314
B	4924 (0-22223)	6687.5 (1436-54723)	0.243	12967 (489-55322)	17157.5 (2859-59642)	0.403
AB	0 (0-891)	0 (0-98)	0.571	0 (0-878)	0 (0-0)	0.791

表 2. CD31-ABO アレイによる抗 B 抗体の検出結果

	Anti-B Ab (IgG)			Anti-B Ab (IgM)		
	Healthy Volunteers	Hemodialysis patients	p-value	Healthy Volunteers	Hemodialysis patients	p-value
O	32564 (0-65416)	17311 (1677-65244)	0.575	4877 (201-61871)	3466 (341-62727)	0.339
A	173 (0-7421)	89 (0-10772)	0.883	4346 (0-28812)	4422 (0-31820)	0.634
B	0 (0-614)	0 (0-1614)	0.791	0 (0-0)	0 (0-2762)	0.134
AB	0 (0-1271)	0 (0-1)	0.382	0 (0-2893)	0 (0-572)	0.837

(2) 質量分析計による ABO 血液型糖鎖抗原の解析

IGOT 法 (Kaji H, et al.; Nat Biotechnol. 2003;21(6):667-672.) と Glyco-RIDGE 法 (Togayachi A, et al. J Am Soc Mass Spectrom. 2018; 29(6):1138-1152) による糖タンパク質の解析を行った。我々が作成したリコンビナント CD31 とヒト人組織から精製した CD31 を比較し、MS/MS スペクトルを調べた結果、両者とも共通して存在する糖ペプチド (VLENSTK) に O 型 (H 型)、A 型、B 型糖鎖が存在していることを示唆する結果が得られた。

(3) CD31-ABO アレイと赤血球凝集反応の比較

120 名の健常者血漿と 80 名の腎移植待機患者 (透析患者) の血漿を用いて、抗 A 抗体、抗 B 抗体測定を CD31-ABO アレイと赤血球凝集反応で比較検討した (図 2、3)。CD31-ABO アレイによる抗 A、抗 B 抗体の結果は、従来臨床で行われている赤血球凝集反応を用いた抗体価測定結果と緩やかな相関関係を示した。しかし、同じ赤血球凝集反応による抗体価の検体も CD31-ABO アレイでは抗体のレベルにかなりのバラツキがみられた。

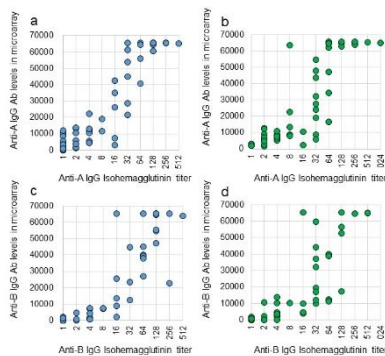


図2. CD31-ABOアレイと赤血球凝集反応の比較(健常者、透析患者)
 抗A抗体のCD31-ABOアレイ(縦軸)と赤血球凝集反応(横軸)の比較(a:健常者、b:透析患者)、
 抗B抗体のCD31-ABOアレイ(縦軸)と赤血球凝集反応(横軸)の比較(c:健常者、d:透析患者)。

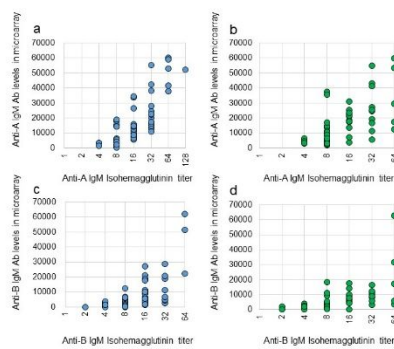


図3. CD31-ABOアレイと赤血球凝集反応の比較(健常者、透析患者)
 抗A抗体のCD31-ABOアレイ(縦軸)と赤血球凝集反応(横軸)の比較(a:健常者、b:透析患者)、
 抗B抗体のCD31-ABOアレイ(縦軸)と赤血球凝集反応(横軸)の比較(c:健常者、d:透析患者)。

(4) 実際に ABO 血液型不適合腎移植を施行した患者における CD31-ABO アレイと赤血球凝集反応の比較

ABO 血液型不適合腎移植を受けた 52 名の患者のうち ABMR を起こさなかった患者 31 名と起こした患者 21 名の腎移植前 (脱感作療法前) の血漿を用いて抗 A 抗体、抗 B 抗体の解析を行った。AUC 曲線を用いた解析により、ABMR を予測する CD31-ABO アレイの intensity のカットオフを 30,000 に設定した。

A 不適合腎移植を施行した患者のうち、ABMR 陰性の患者 17 名中、CD31-ABO アレイによる抗 A IgG 抗体の intensity が 30,000 超えた患者は 1 名 (5.9%) のみだったのに対し、ABMR 陽性だった患者 12 名中、CD31-ABO アレイによる抗 A IgG 抗体の intensity が 30,000 超えた患者は 10 名 (83.3%) だった (図 4a)。同様に、A 不適合腎移植を受けた患者のうち、ABMR 陰性の患者 17 名

中、CD31-ABO アレイによる抗 A IgM 抗体の intensity が 30,000 を超えた患者は 0 名 (0.0%) だったが、ABMR 陽性だった患者 12 名中、CD31-ABO アレイによる抗 A IgM 抗体の intensity が 30,000 を超えた患者は 4 名 (33.3%) だった (図 4b)。ただし、ABMR 陽性だった 12 名のうち、8 名は CD31-ABO アレイによる抗 A IgM 抗体の intensity が 30,000 以下だったが (図 4b、ピンク)、これらの症例は CD31-ABO アレイによる抗 A IgG 抗体の intensity が 30000 を超えていた (図 4a)。

B 不適合腎移植を施行した患者のうち、ABMR 陰性の患者は全例、CD31-ABO アレイによる抗 B IgG、IgM 抗体の intensity は 30,000 以下だった (図 5)。ABMR 陽性だった患者のうち、3 名 (60%) は CD31-ABO アレイによる抗 B IgG もしくは IgM 抗体が 30,000 以上だった。

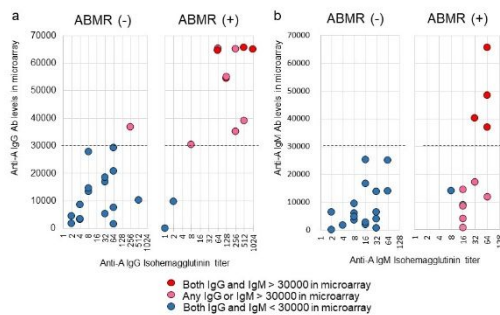


図4. CD31-ABOアレイと赤血球凝集反応の比較(A血液型不適合腎移植患者)
a: 抗A IgG抗体のCD31-ABOアレイ(縦軸)と赤血球凝集反応(横軸)の比較。b: 抗A IgM抗体のCD31-ABOアレイ(縦軸)と赤血球凝集反応(横軸)の比較。
ABMR: antibody mediated rejection

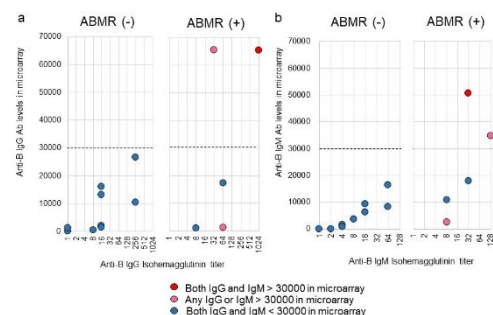


図5. CD31-ABOアレイと赤血球凝集反応の比較(B血液型不適合腎移植患者)
a: 抗B IgG抗体のCD31-ABOアレイ(縦軸)と赤血球凝集反応(横軸)の比較。b: 抗B IgM抗体のCD31-ABOアレイ(縦軸)と赤血球凝集反応(横軸)の比較。
ABMR: antibody mediated rejection

(5) ABO 血液型不適合腎移植における ABMR 発生の予測

従来、行っている赤血球を用いた凝集反応による抗体価と我々が開発した CD31-ABO アレイによる抗体測定の様々なカットオフで ABO 不適合腎移植後の ABMR 発生を予測する感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率を解析した (表 3)。A 不適合腎移植における ABMR 予測は、我々が開発した CD31-ABO アレイにおける intensity 30,000 が感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率が高かった。B 不適合腎移植においては、我々が開発した CD31-ABO アレイにおける intensity 30,000 では、感度は 60% と劣るものの、特異度、陽性的中率は 100% であり、陰性的中率は 81.8% だった。従来、臨床で行われる赤血球を用いた凝集反応による抗体価測定と比較した結果、我々の CD31-ABO アレイにおいて脱感作療法前の抗 A 抗体の intensity が 30,000 を超える症例は、移植後の ABMR をより正確に予測できることが判明した。抗 B 抗体に関しては ABMR を予測する感度は従来法と同等だったが、特異度は 100% だった。本研究では、B 不適合腎移植は検体数が少ないため、抗 B 抗体における CD31-ABO アレイの有用性は、さらなる検討が必要である。

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	齋藤 和英 (Saito Kazuhide) (20262438)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	
研究分担者	舘野 浩章 (Tateno Hiroaki) (30450670)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長 (82626)	
研究分担者	牛木 隆志 (Ushiki Takashi) (80579152)	新潟大学・医歯学総合病院・講師 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関