

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11199

研究課題名(和文) 腎移植拒絶反応における新規治療ターゲットとしての補体代謝産物C5aに関する研究

研究課題名(英文) Impact of anti-C5a peptide for acute cellular rejection in renal graft as new therapeutic target

研究代表者

山中 和明 (Kazuaki, Yamanaka)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：10648017

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)：腎移植後の移植腎生着率の向上を目的とし、拒絶反応に対し安全性の高い効果的な治療法を確立するため、補体制御に関する研究を行った。ラット腎移植急性細胞性拒絶反応モデルを作成し、補体因子の一つであるC5aに対する阻害ペプチドを投与し、移植腎生着期間の延長を検討したが、統計学的に有意な差は確認できなかった。より補体活性の強いラット抗体関連型拒絶反応モデルを使用する、または投与方法や投与量の調整など、様々な方法を検討しているが、現在まで有効な治療効果を示す実験結果は明らかにできていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現状の腎移植後の拒絶反応治療は過剰な免疫抑制による副作用の問題もあり、安全性の高い効果的な治療法を確立するため、補体制御に注目し新規治療薬を探求した。ラット腎移植拒絶反応モデルを作成し、拒絶反応に関係するとされる補体因子の一つであるC5aに対する阻害ペプチドを用いて、移植腎生着率の改善を検討した。生着率を改善する傾向はみられるものの、統計学的な有効性までは明らかにできなかった。炎症を制御する他のモデルでは有効性を示すデータが散見され、他剤との併用治療などで有効な治療効果を得られる可能性は残されており、引き続き治療法の確立を目指し研究を継続していく。

研究成果の概要(英文)：We studied on complement regulation to establish a safe and effective treatment for acute rejection with the aim of improving the renal graft survival. We prepared rat acute cellular mediated rejection models of renal transplantation to investigate the prolongation of the transplanted renal grafting period by administering an inhibitory peptide to one of the complement factors, C5a, but no statistically significant difference could be confirmed. Various methods have been investigated, including the use of a rat antibody mediated rejection model with stronger complement activation or adjustment of dosing methods and doses of drug, but to date, no beneficial therapeutic effect has been achieved with this drug.

研究分野：腎移植

キーワード：補体制御 急性細胞性拒絶反応 腎移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

補体とは、抗原抗体反応や細菌、ウイルスを認識することにより活性化し、生体に侵入した異物排除のために機能する一群のタンパクである。補体は、古典経路、第2経路、レクチン経路の3種の経路により活性化し、最終的に膜侵襲複合体(MAC)を形成し、細胞を傷害する。

腎移植領域における補体の関与として、抗体関連型拒絶反応(AMR)において抗体が抗原と反応することにより免疫複合体が形成され、それがC1qと反応することで古典経路が活性化する。古典経路の代謝産物であるC4dが傍尿細管毛細血管(PTC)への沈着を証明することが、AMRの診断基準の1つとして用いられている。そのため近年では、AMRに対し補体をターゲットとした治療薬(抗C5抗体:エクリツマブ)の有効性が報告されており(Am J Transplant. 2015;15: 1293)、補体制御がAMRにおける治療法として注目されている。その一方で、急性T細胞関連型拒絶反応(ATMR)において、補体はほとんど関与しないと考えられてきた。しかし我々は、ラット同系モデルと異系モデルを比較しATMRでは補体因子factorB(fB)の発現上昇から第2経路の活性化が示唆されることを確認した。またATMRの進行には補体制御因子の低下が関連しており、ラットの補体制御因子であるCrryに対する抗体を投与すると、移植後生存期間が有意に短縮した。またATMRを発症した腎移植患者では補体制御因子membrane cofactor protein(MCP)の発現が低い症例では、移植腎生着率は有意に低下することを確認した。これまで補体制御を目的とした様々な研究が行われているが、ATMRと同様に第2経路が活性化し補体制御因子の低下を来す腎虚血再灌流障害では、補体制御因子を補充しても十分に補体の活性化を抑制できなかったと報告されている(J Am Soc Nephrol 2001; 12; 1383)。そのため、現在はC3やC5の解離を阻害することで補体カスケードの活性化抑制を目標に研究が進められている。すでに発作性夜間血色素尿や非典型性血性尿毒症症候群で使用される抗C5抗体には、副作用として髄膜炎菌や肺炎球菌感染症のリスクが問題となる。そのため、補体カスケードのより末端部分を選択的に抑制することで副作用を最小限に抑え、かつ拒絶反応を抑制可能な薬剤が期待される。補体因子C5の代謝産物であるC5aは強力なアナフィラトキシン活性を有し、単球やマクロファージを活性化し、炎症性サイトカインの分泌や肥満細胞や好塩基球からヒスタミンなどのメディエーターを遊離、またT細胞の遊走性を活性化させる(Immunity 2008; 28; 425)。すでに敗血症分野では、C5aの研究が進んでおり、これまでにC5aを阻害するために抗C5a受容体(C5aR)抗体の開発が行われたが、C5aRは炎症細胞に発現しており、炎症病態時に発現量が急増するため効率が悪く十分な効果が認められなかった(J. Biol Chem 2002; 277; 49403)。一方、C5aの作用を直接阻害するC5a阻害ペプチドは、大動物を用いた敗血症モデルで十分な効果が認められ、現在臨床試験が始まっている。しかし、これまで腎移植領域において、C5a阻害ペプチドの有効性を示した報告はない。拒絶反応治療においては、過剰な免疫抑制状態に陥りやすく、重篤な感染症のリスクも伴うが、C5a阻害ペプチドの半減期は極めて短く(Microbiol Immunol 2007; 51; 439)、投与中止とともに効果が消退するため、副作用を考慮した場合にも有用である。以上から、この薬剤は拒絶反応において白血球の炎症部位への導入や活性化に対する抑制効果が期待でき、補体因子は新たな治療のターゲットとして期待される。

2. 研究の目的

近年、移植腎の生着率は飛躍的に向上しているが、依然として拒絶反応は長期予後に影響を

及ぼす主たる問題である。現在拒絶反応に用いられる治療薬は、ステロイドパルスやサイモグロブリンなど限られた薬剤しかなく、感染症など副作用の危険性も大きく十分とは言えない。補体代謝産物の1つである C5a は白血球の走化性や分化に関連するアナフィラトキシンとしての作用が知られ、拒絶反応への関与が報告されている。そこで、ラット同種腎移植モデルに対し C5a 阻害ペプチドを用いて、急性拒絶反応に対する抑制効果およびその生体内での作用機序について解析し、ヒト腎移植拒絶反応への新規治療薬としての可能性を検討する。

3 . 研究の方法

腎移植 ATMR モデルのドナーとして DA ラット、レシピエントとして LEW ラット(ともに雄性、6~8 週齢、180~230g 程度)を用いて、ATMR モデルを作成した。レシピエントの対側腎は摘出し、ドナー腎を腎動静脈・尿管をそれぞれ端々吻合にて移植した。移植後から、C5a 阻害ペプチドを 0.33mg/kg/h や 0.66mg/kg/h など以前の他疾患モデルでの投与方法を参考にし、浸透圧ポンプによる皮下・静注・腹腔内持続投与を行い検討した。投与期間は、1~3 日間で検討した。また、連日頸静脈的もしくは腹腔内への一回投与についても検討した。さらに移植後 3 日目以降から投与を開始するモデルも作成した。コントロール試薬は生理食塩水を用いて検討を行った。さらに腎移植急性抗体関連型拒絶反応(AAMR)モデルでの検討も行うため、ドナーとして BN ラット、レシピエントとして LEW ラット(ともに雄性、5~7 週齢、150~210g 程度)を用いて、ラット AAMR モデルを作成した。ドナーの腹部の皮膚をレシピエントの腹部へと移植し、2 週間後にフロサイトメトリー法(MESF 法)にて抗ドナー特異的抗体(DSA)を測定し、産生が確認されたレシピエントラットにドナー腎を移植し、AAMR モデルを作成した ATMR モデルと同様に C5a 阻害ペプチドを様々な投与方法を用いて検討を行った。また、移植モデルにおける補体動態の確認のため、RT-PCR や免疫組織染色にて C5、C5a Receptor の発現を検討した。

4 . 研究成果

ラット急性細胞性拒絶反応モデルを作成し、同系モデルと比較し補体動態を RT-PCR にて検討した。移植腎における C5a receptor (C5aR) の mRNA の発現は、移植後 5 日目に有意な上昇を示した。しかし、C5 の mRNA 発現は移植後 3 日目から有意な低下を来した。予想に反して、低下していたため、C5 で確認される 3 種類の variant についても、プライマーを作成し、確認したが同様の結果であった。補体産生の中心的役割を担う肝臓での mRNA の発現についても調べたが、C5 に有意な差を認めなかった。また、mRNA レベルで有意な差を認めた C5aR の発現について、蛍光免疫組織染色にて移植腎における発現の検討を行ったが、移植腎内に浸潤するリンパ球表面にも C5aR は発現しており、それらの影響により、C5aR 発現の変化を明確に調べるのが困難であった。次にラット急性細胞性拒絶反応モデルに C5a 阻害ペプチドを投与した。経静脈的に 1 回/日もしくは 2 回/日の投与を行ったが、コントロール群と比較し、若干の生存期間の延長を認めたが、有意に移植後生存期間を延長することはできなかった。ペプチド製剤は半減期が短いために、持続投与の必要性があると考え、移植後 3 日目に皮下もしくは腹腔内に浸透圧ポンプを埋め込み検討を行った。様々な投与量・投与期間を設定し、検討を行ったが、やはり移植後生存期間の延長は認められなかった。薬剤投与後早期に死亡する例もあり、移植後の拒絶反応が生じ衰弱したラットにさらなる外科的侵襲を加えること自体が、実験系に与える影響が考えられた。

C5a ペプチドの投与方法として、腎移植施行時に腹腔内に浸透圧ポンプを埋め込み、1~3日間の持続投与を行った。しかし、有意な生存期間の延長は確認できなかった。拒絶反応が増強してくる移植 3 日目以降に投与が終了してしまうため、効果が得られなかったと考えられた。さらに長期間の投与を試みたが、ポンプが大きくなり、ラットへの使用が困難であったため断念した。

そのため補体活性のより強いラット腎移植 AAMR モデルを作成し、同モデルに C5a 阻害ペプチドを投与し、治療効果を検討することとした。まず、ドナーラットの皮膚をレシピエントラットへ移植し、2 週間後にドナー特異的抗体が産生されているかを Flow cytometry を用いて確認し、その産生量を定量化し MESF 値 10000 以上のモデルのみを使用し、腎移植を行った。C5a 阻害ペプチドにおいて若干の生存期間の延長を認めたが、統計学的に有意な延長を示すまでには至っていない。急性抗体関連型モデルでの補体の関与は病理組織学的にも、補体の産生量の PCR 検査でも明らかに増量を示しているが、その他にも抗体により血管内皮障害を代表とする組織障害が強く、補体制御単剤では十分な治療成績を示すことは困難であると考えられた。今後は抗体の働きを制御するリツキシマブなどの薬剤との併用での検討が必要となると考えられた。

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	今村 亮一 (Imamura Ryoichi) (40456976)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	阿部 豊文 (Abe Toyofumi) (90750894)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	角田 洋一 (Kakuta Yoichi) (40710116)	東京女子医科大学・医学部・講師 (32653)	
研究分担者	中澤 成晃 (Nakazawa Shigeaki) (80759530)	大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤) (14401)	