

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09156

研究課題名(和文)腎移植における慢性抗体関連型拒絶反応の早期診断法の開発

研究課題名(英文)Development of an immunological monitoring system to predict chronic rejection in kidney transplant recipients.

研究代表者

堀田 記世彦(Hotta, Kiyohiko)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：90443936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腎移植の短期成績は飛躍的に向上しているが、長期的にはドナー特異的抗体による慢性抗体関連型拒絶反応(CAAMR)により移植腎機能廃絶となる症例が多く、この克服が長期成績の向上に必要不可欠である。しかし、CAAMRに対する有効な治療法は未だ確立していない。当研究では、CAAMRとなりうる患者を早期に発見する診断法を開発することを目的とした。

混合リンパ球反応試験(MLR)はT細胞のドナーに対する反応を測定する方法で、急性拒絶反応をモニタリングする方法として報告されてきた。本研究では、はじめてCAAMRをモニタリングし、CAAMR発症を予測できる可能性を持つMLRを開発できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎移植長期成績の向上にCAAMRの克服は必要不可欠である。有効な治療方法もないのが現状であるため、CAAMRとなりうる患者を未然にもしくは可能な限り早期に発見する診断法の開発が必要である。今回我々が開発した手法によりCAAMRの早期診断が可能になったことで、腎移植の長期成績の最大の問題が解決され長期成績の向上に寄与すると思われる。

研究成果の概要(英文)：Chronic active antibody-mediated rejection (CAAMR) is the main cause of graft loss in the long-term. Pathological changes during CAAMR occur gradually even without clinical manifestations, followed by dysregulation of the function of the kidney transplant. Therefore, a reliable immunoresponse monitoring system to identify recipients who will develop CAAMR in the future is required.

A mixed lymphocyte reaction (MLR) assay is a method to measure T cells alloreactivity via direct pathway (DP). Recent studies indicate that DP also contribute the pathogenesis of chronic injury. However, there are no reports of MLR assay to monitor CAAMR. Therefore, we tried to develop a novel MLR monitoring system that predicts CAAMR in kidney transplant recipients. To this end, we measured the anti-donor response using our novel MLR in 150 kidney recipients whose graft status were evaluated by graft biopsy and analyzed the relationship between the anti-donor response and pathological findings of allograft.

研究分野：免疫学

キーワード：移植免疫 腎移植 慢性抗体関連型拒絶反応 早期診断 Tリンパ球 長期成績 リンパ球混合反応 CD4陽性T細胞

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫抑制剤の開発に伴い急性拒絶反応の発症は激減し、腎移植の短期成績は飛躍的に向上している。一方で、長期的にはドナー特異的抗体(DSA)による慢性抗体関連型拒絶反応(CAAMR)により移植腎機能廃絶となる症例が多く、この克服が長期成績の向上に必要不可欠である。

(2) CAAMR のメカニズムはほとんど明らかになっておらず、また、有効な治療方法もないのが現状である。そのため CAAMR となりうる患者を未然にもしくは可能な限り早期に発見する診断法を開発できれば、腎移植の長期成績の向上に寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は CAAMR となりうる患者を未然にもしくは可能な限り早期に発見する診断法を開発することである。この診断法が確立され CAAMR 発症前または治療可能である時点で診断できれば腎移植の長期成績向上に大きく貢献すると思われる。また、実際に CAAMR となった患者の免疫学的解析をすることにより CAAMR のメカニズムを解明することにより、未だ確立されていない CAAMR の治療法の開発に寄与すると思われる。

3. 研究の方法

(1) 腎移植後経過が安定している stable(n=70)、DSA が陽性である DSA+(n=30)、control として移植前の末期腎不全患者 ESRD(n=40)の3群を対象として、免疫反応を比較検討した。また、DSA 陽性群には病理学的に CAAMR と診断された 22 例と病理学的にまだ変化を認めない Pre-CAAMR8 例が存在し後の検討ではこの2群も分けて検討した。

患者群	DSA	病理診断	n
Stable	陰性	正常	70
DSA+ CAAMR	陽性	CAAMR	22
DSA+ Pre CAAMR	陽性	正常	8
ESRD	陰性		40

(2) まず、末梢血におけるリンパ球のサブセットの違いについて評価した。次に混合リンパ球反応試験(MLR)は急性拒絶反応をモニタリングする方法として報告されているため、この MLR の手法を用いてドナーに免疫反応を評価した。従来報告されている MLR では Responder に末梢血単核細胞を用いるが、今回は我々がカニクイザルの腎移植モデルで確立した T cell の反応をより鋭敏に検出できる Responder に T cell を用いた MLR を実施した*。

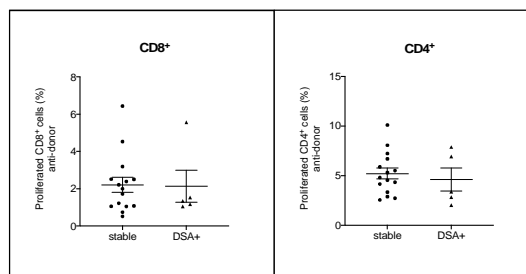
4. 研究成果

(1) 末梢血におけるリンパ球サブセットの評価

末梢血より末梢血単核細胞を分離し、フローサイトメトリーにて T 細胞 (CD3+), B 細胞 (CD19+), NK 細胞 (CD3-CD56+), NKT 細胞 (CD3+CD56+)の実数を計測し、各群で比較したが3群間に違いはなかった。次に、T細胞をさらに詳しく naïve (CCR7+CD45RO-), central memory (CCR7+CD45RO+), effector memory (CCR7-CD45RO+)に分けて、CD4+T細胞、CD8+T細胞それぞれで評価したが、やはり違いはなかった。B細胞についても Transitional B cell(CD19+ CD24 high CD38 high)、Naïve B cell(CD19+ CD24low CD38 low)、Memory B cell(CD19+ CD27+)、Plasma cell(CD38+ CD138+)に分類する染色を行い評価したが3群間に違いはなく、末梢血のリンパ球を評価しても DSA 陽性症例の診断はできないことが明らかになった。

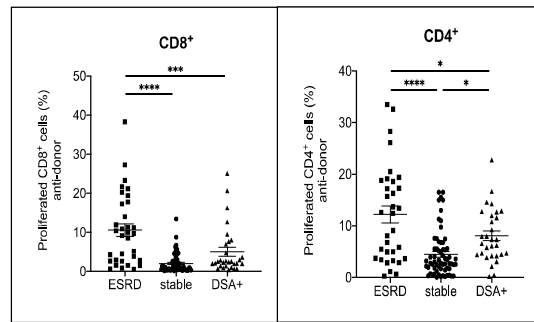
(2) 従来法 MLR によるドナーに対する T 細胞の反応の評価

従来報告されている MLR では Responder に末梢血単核細胞を用いており、急性拒絶反応をモニタリングする方法として報告されている。DSA 陽性症例に対して従来法が有用かを評価した。結果、右図の様に stable の患者と DSA 陽性患者で CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞ともに両群間のドナーに対する反応に違いはなかった。これにより従来法では DSA 陽性症例を早期に診断できないことが判明した。



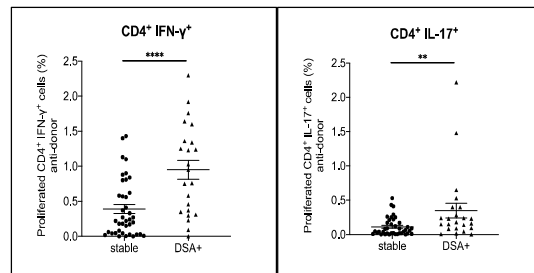
(3) 新規 MLR によるドナーに対する T 細胞の反応の評価

次に、レシipientの PBMC より T 細胞を分離し、これを Responder に使用する新規 MLR にて同様にドナーに対する反応を評価した。結果、右図の様に CD8 陽性細胞の反応は stable 群と DSA 陽性で差はなかったが、CD4 陽性細胞の反応は stable 群に比べ有意に DSA 陽性群で高かった。以上より CD4 陽性細胞の反応をモニタリングすることにより、DSA 陽性患者の早期診断ができる可能性が示唆された。



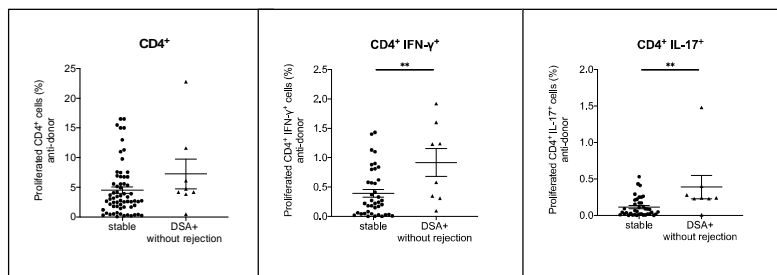
(4) ドナーに反応する CD4 陽性細胞のサブセット解析

次に、活性化した CD4 陽性 T cell 中の、Th1 cell (INF- γ +), Th2 cell (IL-4+), Th17 cell (IL-17+), Treg (FOXP3+) の割合を評価した。結果、右図の様に Th1 cell と、Th17 cell のドナーに対する反応が、stable 患者に対して DSA 陽性患者で高かった。また、Th2 cell, Treg に関しては両群間に差はなかった。以上より、DSA の産生、CAAMR の発症に CD4 陽性細胞、特に Th1, Th17 が強く関与していることが示唆された。



(5) Pre-CAAMR 症例を早期診断可能か検討

最後に CAAMR の前段階である DSA 陽性であるが組織学的に CAAMR に至っていない 8 症例 (Pre-CAAMR: DSA+ without rejection) と Stable 群と比較し、新規 MLR assay が Pre-CAAMR の時点で診断可能かを検討した。結果上記の図の様に CD4 陽性細胞の反応は両群間に差はなかった。一方、Th1 cell (INF- γ +), Th17 cell (IL-17+) の反応は stable に比較し、Pre-CAAMR 群で有意に高い結果であった。Pre-CAAMR 群は 8 症例と少ないにも関わらず、有意に差を認めたことより、CD4 陽性細胞のサブセット解析を行うことにより CAAMR の早期診断が可能であることが示唆された。



引用文献 *

Hotta K, Aoyama A, Oura T, Yamada Y, Tonsho M, Huh KH, Kawai K, Schoenfeld D, Allan J, Madsen J, Benichou G, Simth RN, Colvin R, Sachs D, Cosim A, Kawai T Induced regulatory T cells in allograft tolerance via transient mixed chimerism.: JCI insight 1 (10) e86419 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oura T, Hotta K, Rosales I, Dehnadi A, Kawai K, Lee H, Cosimi AB, Kawai T	4. 巻 -
2. 論文標題 Addition of Anti-CD40 monoclonal antibody to nonmyeloablative conditioning with belatacept abrogated allograft tolerance despite induction of mixed chimerism.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/TP.0000000000002417.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hotta K, Oura T, Dehnadi A, Boskovic S, Matsunami M, Rosales I, Smith RN, Colvin RB, Cosimi AB, Kawai T,	4. 巻 102
2. 論文標題 Long-term non-human primate renal allograft survival without ongoing immunosuppression in recipients of delayed donor bone marrow transplantation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 e128-e136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/TP.0000000000002078.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 堀田記世彦、岡田宏美、岩見大基、樋口はるか、高田祐輔、篠原信雄	4. 巻 38
2. 論文標題 【臨床研究報告】小児腎移植における慢性抗体関連型拒絶反応治療後の長期成績の検討。	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本小児腎不全学会雑誌	6. 最初と最後の頁 118-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 堀田記世彦、守屋仁彦、森田 研、岩見大基、篠原信雄	4. 巻 34
2. 論文標題 【特集 小児腎不全 - 移行期医療の管理】12先天性腎尿路異常(CAKUT)管理の現況。	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床透析	6. 最初と最後の頁 1149-1154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 堀田記世彦、岩見大基、岩原直也、高田祐輔、篠原信雄
2. 発表標題 腎毒性に対してカルシニューリン阻害剤減量、離脱を目的としたエペロリムス導入
3. 学会等名 第52回日本臨床腎移植学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田記世彦、河合達郎
2. 発表標題 免疫寛容誘導の臨床応用と将来の展望
3. 学会等名 第28回日本組織適合性学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田 記世彦、大浦 哲、岩原 直也、岩見 大基、篠原信雄、A. Benedict Cosimi、河合 達郎
2. 発表標題 血液キメリズムにより誘導された同種腎移植免疫寛容の免疫モニタリング
3. 学会等名 第55回日本移植学会 総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hotta K, Iwami D, Furumido J, Morita K, Tanabe T, Mochizuki T, Higuchi H, Iwahara N, Abe T, Shinohara N
2. 発表標題 Retroperitoneoscopic native nephrectomy in renal transplant recipients with autosomal dominant polycystic kidney disease.
3. 学会等名 American urological association annual meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hotta K, Iwami D, Furumido J, Morita K, Tanabe T, Mochizuki T, Higuchi H, Iwahara N, Abe T, Shinohara N
2. 発表標題 Retroperitoneoscopic native nephrectomy in renal transplant recipients with autosomal dominant polycystic kidney disease.
3. 学会等名 American Transplant Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田記世彦、岩見大基、樋口はるか、篠原信雄
2. 発表標題 生体腎移植ドナーの長期予後と腎機能推移の検討
3. 学会等名 第51回日本臨床腎移植学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀田記世彦、岩見大基、古御堂純、森田研、望月端吾、田邊起、佐々木元、広瀬貴行、樋口はるか、高田祐輔、金川匡一、篠原信雄
2. 発表標題 腎移植時における多発性嚢胞腎に対する後腹膜鏡下腎摘術
3. 学会等名 第34回腎移植・血管外科研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀田 記世彦
2. 発表標題 腎移植における免疫寛容の最前線
3. 学会等名 第34回腎移植・血管外科研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀田記世彦、岩見大基、樋口はるか、篠原信雄
2. 発表標題 生体腎移植ドナーの長期予後と腎機能推移の検討
3. 学会等名 第93回北海道透析療法学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀田記世彦、岩見大基、岩原直也、高田祐輔、篠原信雄
2. 発表標題 生体腎移植ドナーの長期予後と腎機能推移の検討
3. 学会等名 第404回日本泌尿器科学会北海道地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀田記世彦、岩見大基、古御堂純、森田研、望月端吾、田邊起、佐々木元、広瀬貴行、樋口はるか、高田祐輔、金川匡一、篠原信雄
2. 発表標題 腎移植時における多発性嚢胞腎に対する後腹膜鏡下腎摘術
3. 学会等名 第27回日本腎不全外科研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀田記世彦、岩見大基、田邊起、岩原直也、古御堂純、森田研、金川 匡一、篠原信雄
2. 発表標題 常染色体優性多発性嚢胞腎に対する腎移植の自己腎容量に応じた手術手技の選択
3. 学会等名 第54回日本移植学会
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hotta K, Iwami D, Harada h, Fukasawa Y, Okada H, Higuchi H, Hirose T, Fukuzawa N, Shinohara N
2 . 発表標題 Pre-existing allograft diabetic nephropathy from diabetic donor is reversible after kidney transplantation in non-diabetic recipient.
3 . 学会等名 American Transplant Congress 2018 (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hotta K, Oura T, Dehnadi A, Matsunami M, Rosales I, Smith RN, Colvin RB, Benichou G, Cosimi AB, Kawai T
2 . 発表標題 Long-term non-human primate renal allograft survival without ongoing immunosuppression in recipients of delayed donor bone marrow transplantation
3 . 学会等名 American Transplant Congress 2018 (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hotta K, Oura T, Dehnadi A, Matsunami M, Benichou G, Cosimi AB, Kawai T
2 . 発表標題 T cell immunomonitoring including donor specific Treg expansion prospectively predicts renal allograft tolerance induced by transient mixed chimerism
3 . 学会等名 American Transplant Congress 2018 (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hotta K, Oura T, Dehnadi A, Matsunami M, Rosales I, Smith RN, Colvin RB, Benichou G, Cosimi AB, Kawai T
2 . 発表標題 Long-term Nonhuman Primate Renal Allograft Survival Without Ongoing Immunosuppression in Recipients of Delayed Donor Bone Marrow Transplantation
3 . 学会等名 27th International Congress of The Transplantation Society (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Hotta K, Iwami D, Shinohara N.
2. 発表標題 Current topics and next challenge in kidney transplantation- Hokkaido University perspective
3. 学会等名 Kidney Transplant Asian Summit (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoya Iwahara, Kiyohiko Hotta, Daiki Iwami, Yusuke Takada, Haruka Higuchi, Hajime Sasaki, Tatsu Tanabe, Nobuo Shinohara
2. 発表標題 A novel immunoresponse monitoring system to predict chronic antibody- mediated rejection in kidney transplant recipients.
3. 学会等名 American Transplant Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩原直也、堀田記世彦、田邊起、岩見大基、篠原信雄
2. 発表標題 安定した腎移植患者はドナー特異的に免疫反応が抑制される
3. 学会等名 第56回日本移植学会総会
4. 発表年 2020年

〔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	村上 正晃 (Murakami Masaaki) (00250514)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	岩見 大基 (Iwami Daiki) (80581115)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究分担者	篠原 信雄 (Shinohara Nobuo) (90250422)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	

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