

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09680

研究課題名(和文)腎移植におけるBKウイルスモニタリングシステムによるグラフト長期生着への取り組み

研究課題名(英文)Improvement of BK virus monitoring system in renal transplantation with the aim of graft long-term survival.

研究代表者

三輪 祐子(YUKO, MIWA)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：90572941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腎移植後のBKウイルス(BKV)の再活性化は、BKVに対する特効薬がなく、過剰免疫抑制により腎症に進展しうる。本研究は、腎移植後に起こるBKV再活性化をモデルに、BKV腎症に進展させず、なおかつde novo DSA (de novo Donor Specific Antibody (DSA))の産生を促さない適切な免疫抑制療法達成をするために、腎移植前のドナー/レシピエント(D/R)の尿、血液検体を用いた、移植前スクリーニング法を確立し、移植前後のレシピエントのBKVに特異的なT細胞性免疫状態測定法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植前にBKV再活性化のリスクが分かれば、導入期の免疫抑制剤の選択の指標となり、免疫抑制剤の調整ができる。BKV腎症進行阻止の指標となると思われる。また移植後の個々のBKVに対する免疫機能の状態が分かれば、免疫抑制剤の調整ができる。BKVプロープに対する免疫応答を評価し、移植後のモニタリングとして使用する。現在BKV血症と診断されると、免疫抑制剤の中止および減量、他剤への変更が行われるため、de novo DSA産生のリスクが高まる可能性があるが、それを阻止する免疫抑制療法の最適化(過剰及び過小免疫抑制療法の是正)を行える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Reactivation of BK virus (BKV) after renal transplantation can progress to nephropathy due to over immunosuppression without specific drugs against BKV. On the other hand, reduction of immunosuppressive drugs after infection can induce cellular rejection as well as antibody-associated rejection due to the production of de novo donor specific antibodies (DSA), thus preventing long term viability of the transplanted kidney. In this study, using BKV reactivation after kidney transplantation as a model, we established a pre-transplantation screening method using urine and blood samples of donor/recipient (D/R) before and after kidney transplantation in order to achieve appropriate immunosuppressive therapy that does not promote de novo DSA production and does not lead to BKV nephropathy. We have developed a T-cell immune status assay specific for BKV in recipients before and after transplantation.

研究分野：移植免疫

キーワード：腎移植 BKウイルス再活性化 免疫抑制剤

## 1. 研究開始当初の背景

免疫抑制状態下にある移植患者は、通常では増大しない体内に常在するウイルスの再活性化が発生しうる。BK ウイルス(BKV)は、ヒトへ感染するポリオーマウイルスの一つで、全長 5.13 kb の DNA ウイルスである。幼少期に初感染し、その後尿路系上皮細胞やリンパ球に潜伏感染しており、抗体保有率は概ね 50-90%とされている。BKV の再活性化は、移植において BKV 腎症の原因となり、グラフト喪失にもつながる。現在のところ BKV に対する**特効薬は開発されておらず**、免疫抑制下の移植患者はウイルス感染のモニタリングが推奨されている。

また移植前の潜在的な BKV 感染の調査として、腎移植後の BKV 再活性化が、ドナー腎が由来なのか、レシピエント由来なのか長らく問われている。2014 年、腎移植後に起こる BKV 再活性化が、ドナー腎からの持ち込みの可能性が極めて高く、移植前の尿中 BKV 排出は、移植後の BKV 腎症、血症のリスクファクターになることが示された。(J. Clin. Virol. 2014) BKV にはサブタイプがあるため、レシピエント体内に存在する中和抗体がドナー腎由来の BKV には効果がない場合もあり、BKV 再活性化の可能性が高いことも考察されている。

また近年 BKV 再活性化 (BKV 血症、BKV 腎症) と新規ドナー特異的 HLA 抗体 (de novo Donor Specific HLA Antibody: de novo DSA) の産生との関連性が報告されている。(J. Am. Soc. Nephrol. 2015, Clinic. Transpl. 2018) 移植医療において、de novo DSA の産生は、抗体関連型慢性拒絶反応の原因となり、de novo DSA を産生する形質細胞を取り除く効果的な治療法が確立されていないため、移植腎(グラフト)の長期生着を阻んでいる。BKV 再活性化 (BKV 血症、BKV 腎症) と、de novo DSA 産生が関連する理由として、BKV 感染症が疑われる場合は免疫抑制剤の減量・中止となるが、その際過小免疫状態のためレシピエント免疫担当細胞のグラフトへの攻撃が惹起され、B 型肝炎ウイルスをはじめ、他のウイルス感染でも HLA 抗原の発現が惹起される報告から、BKV 感染により標的感染細胞において細胞表面 HLA が高発現となりうる。の結果から、最終的に de novo DSA が産生され、少量の DSA でも厳しい抗体関連型拒絶反応が起こる可能性がある。しかしそのメカニズムはまだはっきりと解明されていない。HLA 抗原の発現が高まる場合、我々は代謝拮抗剤として用いられる mTOR インヒビターのエベロリムス (EVR) が HLA-DR 抗原の発現を抑えることを報告している。(Iwasaki K. et al. Transpl Immunol. 2017;40:22-30) BKV 感染による HLA 発現上昇がある場合、薬剤による治療導入も考えられる。

## 2. 研究の目的

### (本研究の目的)

本研究は、腎移植後に起こる BKV 再活性化を、BKV 腎症に進展させず、なおかつ de novo DSA の産生を促さない適切な免疫抑制療法及び治療法を確立し、グラフトの長期生着を目指す。そのため次の3つの点を明らかにする。

- (1) 移植前の潜在的な BKV 感染(ドナー・レシピエント)と BKV 再活性化との関連性。
- (2) BKV 特異的反応性を持つ T 細胞リンパ球測定法の確立。
- (3) BKV 感染による、血管内皮細胞上の HLA class I,II 発現への影響。

## 3. 研究の方法

### (1) 【移植前ドナー/レシピエント (D/R) 尿,血液検体を用いた BKV リスク因子の探索】

【方法】(1)-1 移植前の D/R の尿を採取し、尿中に含まれる BK ウイルス排出量を定量する。BK ウイルス量の定量は、尿中の DNA 抽出はカラム法を用い、すべてのサブタイプを認識できるプライマー、プローブを設定し Taqman プローブ定量 PCR を実施する。(1)-2 サブタイプ解析による BKV の再活性化が D/R 由来かを突き止める。患者検体サブタイプ領域のシーケンスデータを、解析ソフト MEGA7 を用いて近隣結合法 (neighbour-joining (Nj) 法) により系統樹解析を行い、BKV サブタイプを決定する。(1)-3 また、D/R の血中に含まれる、抗 BKV-IgG 抗体を ELISA 法を用いて、腎移植前後の抗体価を測定する。

### (2) 【末梢血リンパ球(PBMC)を用いたレシピエント移植後の免疫機能の評価】

過剰免疫抑制状態に陥りやすいレシピエントの状態を、BKV 特異的免疫機能モニタリング法 (PBMC を BKV ペプチドで刺激後、IFN ELISPOT アッセイ測定) を導入して、移植前後で免疫機能がどれくらい抑制されているかを確認する。また、BKV ペプチド反応 T 細胞の TCR (T-ce II receptor) を同定し、モニタリングとして有用かどうかを確認する。

### (3) 【腎組織及び培養細胞を用いた、BKV 感染と HLA 抗原発現の相関性の確認】

BKV 感染によって、血管内皮細胞上の de novo DSA に対する抗原 (HLA class I, II 抗原) の発現上昇があるか明らかにする。また BKV 血症を起こしたレシピエントの腎グラフトにおいて、HLA class II の発現が上昇しているかどうか

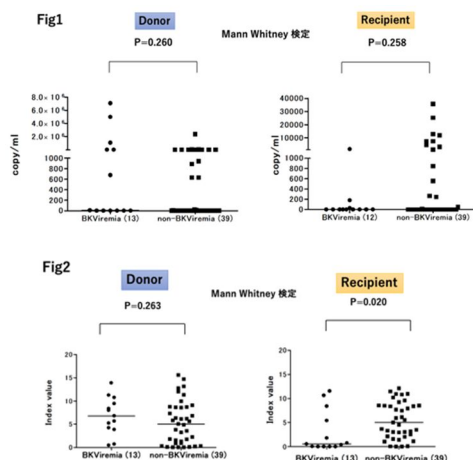
#### 4. 研究成果

##### (1) 【移植前ドナー/レシピエント (D/R) 尿, 血液検体を用いた BKV リスク因子の探索】

【結果】(1)-1 移植前の D/R の尿検体排出量は、BKV 血症のリスク因子にはならなかった。(BKV viremia vs.non-BKV viremia D:P=0.260, R:P=0.258)(Fig 1)

(1)-2 サブタイプの解析は、BKV 血症群で、III 型が健常人の割合より多い傾向にあった。(健常人群 (3%), BKV 血症群(30%))

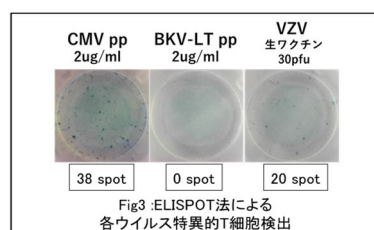
(1)-3 移植前の BKV に対する抗体価は、recipient の anti BKV IgG が低い場合、リスク因子となりうる事がわかった。(D:P=0.263, P=0.020)(Fig 2)



##### (2) 【末梢血リンパ球(PBMC)を用いたレシピエント移植後の免疫機能の評価】

【結果】細胞性免疫の測定は、BKV の他に、CMV, VZV の特異的 T 細胞性免疫を ELISPOT 法で行ってきた。CMV (38 spot), VZV (20 spot) に比較して、BKV (0 spot) は、特異的 T 細胞の検出感度が低かった。その理由として BKV 特異的 T 細胞の数が少ないこと、使用した BKV の peptide pool (pp) が日本人の HLA 型に十分に結合していない可能性も考えられた。(Fig 3)

また BKV ペプチド反応 T 細胞の TCR (T-cell receptor) を同定については、現在 Intra cellular FCM および single cell 解析の検討を行っている。



##### (3) 【腎組織及び培養細胞を用いた、BKV 感染と HLA 抗原発現の相関性の確認】

【結果】BKV 血症 (+・-) レシピエント患者の腎組織 (腎移植 1hour 後組織、BKV 血症時に近い日時の腎組織) を anti DRB1, DQB1 のウサギモノクローナル抗体で染色したが、その抗原の発現差が BKV 感染によるものか同定はできなかった。

##### 【結果のまとめ】

R の血中抗 BKV-IgG 抗体価が R(-) であると BKV 血症のリスクが有意に高まる。

抗 BKV-IgG が R(+) であっても、BKV のサブタイプが D/R で異なる場合、BKV 血症のリスク因子となる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwasaki K, Kitahata N, Miwa Y, Uchida K, Matsuoka Y, Horimi K, Kobayashi T.	4. 巻 41
2. 論文標題 Suppressive effect of everolimus on IL-2, IL-10, IL-21, and IFN levels: Implication for successful minimization of calcineurin inhibitor use in transplantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ther Drug Monit.	6. 最初と最後の頁 371-375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/FTD.0000000000000630.	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 Akihiro Maenaka , Iwasaki Kenta , Akinobu Ota, Yuko Miwa , Wataru Ohashi , Kosei Horimi , Yutaka Matsuoka , Masafumi Ohnishi, , Kazuharu Uchida, Takaaki Kobayashi.	4. 巻 10
2. 論文標題 Interferon- induced HLA Class II expression on endothelial cells is decreased by inhibition of mTOR and HMG-CoA reductase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio .	6. 最初と最後の頁 927-936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12854.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakamoto S, Iwasaki K, Tomosugi T, Niemann M, Spierings E, Miwa Y, Horimi K, Takeda A, Goto N, Narumi S, Watarai Y, Kobayashi T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Analysis of T and B Cell Epitopes to Predict the Risk of de novo Donor-Specific Antibody (DSA) Production After Kidney Transplantation: A Two-Center Retrospective Cohort Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 2000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.02000	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shimabukuro S, Iwasaki K, Kawai S, Shirouzu T, Miwa Y, Iida Y, Nakajima F, Horimi K, Matsuoka Y, Ashimine S, Ishiyama K, Kobayashi T.	4. 巻 67
2. 論文標題 Improved detection of donor-specific HLA-class II antibody in kidney transplant recipients by modified immunocomplex capture fluorescence analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transpl Immunol.	6. 最初と最後の頁 101418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trim.2021.101418	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三輪祐子、堀見孔星、今本由紀、岩崎研太、松岡裕、友杉俊英、渡井至彦、丸山彰一、小林孝彰
2. 発表標題 グラフト長期生着を目指した腎移植前後のBKV-DNAスクリーニングの有効性
3. 学会等名 第55回 日本移植学会総会 広島2019/10/11
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三輪祐子、岩崎研太、鈴木俊一、岩元正樹、大西彰、小林孝彰
2. 発表標題 抗凝固因子、Endothelial protein C receptor (EPCR)におけるヒト-ブタ間のmolecular incompatibility (分子不適合) 解析
3. 学会等名 第22回 日本異種移植研究会 仙台2020/2/15
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三輪祐子、岩崎研太、岡田学、友杉俊英、渡井至彦、堀見孔星、奥村真衣、木下航平、石山宏平、小林孝彰
2. 発表標題 ABO血液型不適合腎移植における抗体関連型拒絶反応 (ABMR) の移植前リスク評価
3. 学会等名 第56回日本移植学会総会 秋田2020/11/1-30 リモート開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三輪祐子、岩崎研太、岡田学、渡井至彦、岩瀬勇人、長坂隆治、奥村真衣、安次嶺聡、石山宏平、小林孝彰
2. 発表標題 ABO血液型不適合腎移植に起因する急性抗体関連型拒絶反応 (ABMR) の移植前リスク評価におけるIgG サブクラスおよびC1qの潜在的価値
3. 学会等名 第29回日本組織適合性学会 オンライン (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三輪祐子、安次嶺聡、岩崎研太、奥村真衣、石山宏平、小林孝彰
2. 発表標題 腎移植におけるBKウイルス再活性化リスク因子の探索
3. 学会等名 第57回日本移植学会総会 東京2021/9/20 リモート参加
4. 発表年 2021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	齋藤 尚二 (SAITOH SHOJI) (00635609)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  (13901)	
研究分担者	岩崎 研太 (IWASAKI KENTA) (10508881)	愛知医科大学・医学部・准教授  (33920)	
研究分担者	小林 孝彰 (KOBAYSHI TAKAAKI) (70314010)	愛知医科大学・医学部・教授  (33920)	

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
---------	---------