

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 若手研究(スタートアップ)
 研究期間： 2008 ～ 2009
 課題番号： 20890098
 研究課題名(和文) 内皮細胞における抗原抗体反応後に起こるシグナル伝達に関する研究
 研究課題名(英文) The Study of the signaling pathway on the endothelial cells after antibody-antigen binding.

研究代表者

岩崎 研太 (IWASAKI Kenta)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教
 研究者番号：10508881

研究成果の概要(和文)：本研究では抗ドナー抗体陽性腎臓移植において、移植臓器が拒絶されない状態の確立法を目指している。これまでに大動脈内皮細胞において一定量の抗 HLA 刺激で誘導される遺伝子発現が補体活性による障害を減弱できることを見いだした(業績 1)。この現象は PI3K/AKT 経路活性化に伴うサイトプロテクティブによるもので、この遺伝子発現は PI3K/AKT を負に制御する PTEN の発現レベルに依存することも見いだした(業績 2)。また血液型抗原と HLA 抗原に対する抗体接着による遺伝子発現には差異が存在することも見いだしており、現在その詳細なメカニズムについてさらに研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：It has been observed that a graft organ continues to survive and function normally even in the presence of anti-graft antibodies. However, the mechanisms behind acquirement of this condition remain unknown. Here we report that the anti-HLA ligation on endothelial cells induces PI3K/AKT activation followed by antioxidant gene induction. Activation of PI3K/AKT endothelial cells by a low concentration of anti-HLA ligation enhances protection against complement attack (ref 1 and 2). On the other hands, in ABO-incompatible renal transplantation, we frequently observed C4d deposition on organ without any injury, while C4d binding is related to graft rejection in HLA-incompatible transplantation (not published yet). In future experiment, we will compared signaling events in endothelial cells between anti-ABO and anti-HLA antibody binding and tried to elucidate the mechanisms of accommodation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 ・ 外科学一般

キーワード：移植免疫、生体防御、補体制御、シグナル伝達、転写

1. 研究開始当初の背景

臓器移植医療における大きな問題は、移植臓器の廃絶にある。良質な免疫抑制薬の開発のおかげで移植直後に発生する細胞性拒絶反応は制御できるようになり、その成績は飛躍的に上昇した。腎臓移植の適応に伴い世界中でドナー不足が大きな問題となっており、その解決方法としてこれまでは禁忌とされてきた抗ドナー抗体陽性移植が盛んに行われている。

抗原抗体反応では、自己を構成する抗原に対しては免疫応答を示さない。一方、異種抗原であっても抗体の接触の時期や方法によっては、その後の拒絶反応に対して反応性を示さない状態を誘導するといった報告がある。これを免疫順応と定義している。

グラフト血管内皮細胞における抗体接着によって引き起こされるシグナル伝達は、抗体量によって異なる経路が活性化されると報告されている。少量の抗体量では PI3K/AKT 経路の活性化によるサイトプロテクティブな遺伝子発現や抗アポトーシス関連遺伝子の発現及び活性化が達成され、細胞保護へと向かうが、多量の抗体接着では、MAPK 経路の活性化により炎症・凝固を引き起こし、拒絶反応へと進行する。つまり接着する抗体量により、異なるシグナルが活性化され、最終的に正反対の結果をもたらしている。腎臓移植においてはすでに抗体陽性移植が試みられているが、予後の経過に差異が存在することが近年明らかとなってきた。HLA 抗体陽性移植では補体が活性化するとすぐさま拒絶へと進行するが、ABO 抗体陽性移植では補体活性が確認されてもグラフト機能は維持され、免疫順応に近い状態を保っている。このことから、抗体量だけでなくその種類によってもグラフトへの影響は異なることが考えられている。

免疫順応・自己免疫疾患の原因解明に関する研究は近年盛んに行われてきたが、未だに免疫順応を誘導する有効な手段は確立されていない。免疫順応の機構を分子レベルで解明できれば、移植医療における免疫抑制剤の減量や抗ドナー陽性移植の安全な実施など現在抱えている問題を解決できると考えられる。またこの研究は移植医療に限らず、アレルギー／自己免疫疾患の治療・抗腫瘍免疫剤の開発への応用も期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、血管内皮細胞への抗体接着後のシグナル伝達、その中でも酵母から植物・高等生物にいたるまで広く真核生物に保存

されている ERK/MAPK と、細胞保護作用を獲得する PI3K/AKT に特に注目し、その下流にある転写因子、さらに遺伝子発現の相互関係について解析することを主とする。その際、抗炎症・抗補体を発揮する遺伝子に特に注目する。そして、拒絶反応／免疫順応それぞれに移行する際に重要と思われる因子を同定し、抗体関連型拒絶反応を軽減するための指針を考案することを目的とする。

3. 研究の方法

抗原抗体反応後に内皮細胞活性化から拒絶反応を引き起こすと思われる MAPK 経路、反対に抗アポトーシス関連遺伝子を制御し細胞保護を誘導していると考えられている PI3K/AKT 経路に注目し、それらが抗体量・抗体の種類に依存した反応においてどのように制御されているか、そしてその下流にある転写因子、またはターゲットとなる遺伝子、特に補体制御因子と細胞保護遺伝子に注目し、それらがどのように調節されているかについて、分子生物学的手法を用いて検討する。さらにこれらの差異を生み出すと考えられた因子を、内皮細胞に導入・抹消することにより、抗原抗体反応後における免疫応答を観察する。

4. 研究成果

大動脈内皮細胞において一定量の抗 HLA 刺激で誘導される遺伝子発現が補体活性による細胞障害を減弱できることを見いだした（業績 1）。この現象は PI3K/AKT 経路活性化に伴うサイトプロテクティブな遺伝子、特に ferritin H と HO-1 の発現が転写因子 Nrf2 により制御されることによるものであると考えられた。また、この PI3K/AKT 経路を遮断することで ferritin H と HO-1 の発現が低下し、さらに補体による抵抗性を失ったことから、両遺伝子が細胞保護に寄与していることが考えられた。さらに、このサイトプロテクティブ遺伝子発現は PI3K/AKT を負に制御する PTEN の発現レベルに依存することも見いだした（業績 2）。その際、ヒストンのアセチル化が転写活性をより強固にすることも証明できた。しかしながら HLA の抗体量が増えるに従って、遺伝子発現による障害軽減は消失した。その際に起こるシグナル伝達を調べたところ、多量の HLA 抗体接着では AKT の活性化が低下し、逆に ERK の活性化がより顕著に上昇していた。

これまでの様々な報告から、ERK の活性化は内皮細胞の活性化と密接に関わっているため、ERK の活性化が補体による細胞障害を亢

進している可能性が示唆された。実際、大量の HLA 抗体接着により補体制御因子の発現低下が確認され、このことから HLA 抗体接着のみで内皮細胞の活性化を励起することが考えられ、HLA 陽性移植では免疫順応を獲得しにくい原因の一つであることが示唆された。一方、抗 ABO 抗体の刺激では内皮細胞の活性化、つまり ERK の活性化は起こらず、むしろ抗体量に依存した ERK の活性低下が確認できた。PI3K/AKT の活性化はいずれの濃度においても確認できなかった。またそのメカニズムは以前不明であるが、補体制御因子 CD55/59 の発現上昇が確認でき、補体による障害を軽減できた。この CD55/59 の発現上昇は ERK のインヒビターにより上昇することも同時に確認でき、ERK を制御することで免疫順応を獲得できる可能性を見出した。さらなる研究による制御メカニズムの解明が求められるが、以上の結果より、臨床で確認される補体活性と予後との関連において、HLA と ABO 抗体陽性移植における差異が説明できると考えられる。

現在、抗 A・B 抗体が引き起こすシグナル伝達・遺伝子発現の研究は無いに等しい。ABO 不適合移植において抗ドナー抗体が引き起こすシグナル伝達・遺伝子発現を解明し、HLA 陽性移植との差異を解明できれば、長期に移植臓器を生着させるための戦略を立てることが可能となる。またこのことは未来の移植医療の一つであり、いまだ抗ドナー抗体が大きな問題となっている、ブタを用いた異種移植においても応用出来ると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Iwasaki K, Miwa Y, Haneda M, Uchida K, Nakao A, Kobayashi T.
Significance of HLA class I antibody-induced antioxidant gene expression for endothelial cell protection against complement attack.

Biochem Biophys Res Commun. (査読有)

Jan 8;391(2):1210-5. 2010

2. Sakamoto K, Iwasaki K, Sugiyama H, and Tsuji Y.

Role of the tumor suppressor PTEN in antioxidant responsive element-mediated

transcription and associated histone modifications.

Mol Biol Cell. (査読有)

Mar;20(6):1606-17, 2009

[学会発表] (計 28 件)

1. 岩崎研太

血管内皮細胞におけるシグナル伝達経路と細胞保護-抗体接着による accommodation の誘導-

第 13 回日本異種移植研究会、2010/3/14 東京

2. 岩崎研太

AMP activating protein kinase の癌細胞増殖抑制機構に関する研究

第 43 回制癌剤適応研究会、2010/3/12 仙台

3. 岩崎研太

MHC class I ligation regulates phase II genes through PI3K/AKT activation, and enhances protection of endothelial cells from complement attack

IPITA-IXA、2009/10/12 ベニス・イタリア

4. 岩崎研太

HLA 抗体の血管内皮細胞接着による PI3K/AKT シグナル経路を介した細胞保護遺伝子群の発現が、過激な細胞障害の減弱を可能にする

第 45 回日本移植学会総会、2009/9/16 大阪

5. 岩崎研太

移植医療におけるポリフェノール研究の意義

第 33 回タンパク質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2009/9/10 佐賀

6. 岩崎研太

転写因子 NFE2-related factor 2 (Nrf2) の移植における役割

第 12 回日本異種移植研究会、2009/3/7 鹿児島

7. 岩崎研太

細胞保護シグナル経路活性化による、抗体関連型拒絶反応回避に関する研究

第 35 回日本臓器保存生物医学会、2008/11/22 東京

8. 岩崎研太

異種移植における PI3K/AKT シグナル伝達的重要性

第 44 回日本移植学会総会、2008/9/19 大阪

〔その他〕

ホームページ等

「研究室ホームページ」

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/tx-immunology/F25CBCD1-6AEA-4505-A2A9-6BD0EB4F0C8C.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 研太 (IWASAKI Kenta)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講

座助教

研究者番号：10508881