

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08949

研究課題名(和文)臓器移植における免疫学的ハイレスポンダーと拒絶反応との関連性

研究課題名(英文) Association between immunological high-responder and rejection in organ transplantation

研究代表者

齋藤 満 (Saito, Mitsuru)

秋田大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80400505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：腎移植においてドナー非特異的抗HLA抗体(non-DSA)を高価で保有している症例がある。特に交叉反応性抗原(CREG)に対する抗体を有する症例での脱感作は議論が分かれる。同じアロ抗原(H2-Kb)を有するBL/6マウス間の皮膚移植では生着し、別のアロ抗原(H2-Kd)を有するマウス間での皮膚移植では拒絶反応が見られ、一度Balb/c(H2-Kd)の皮膚移植をされたBL/6マウス(H2-Kb)に再度Balb/cの皮膚を移植すると拒絶反応がより早く出現した。一方で、当方の臨床データで輸血による感作リスクについても検討し、輸血群でde novo DSA産生が多く移植腎生着率も低い傾向にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、腎代替療法を受ける患者の高齢化、そして移植成績向上に伴うHLAミスマッチの多い夫婦間移植が増加している。高齢者への強力な免疫抑制療法はときに重篤な感染症を引き起こすことがあり、CREG保有例などにおいて正確な免疫学的リスク判定が必要である。

また、生体腎移植は基本的に最善の状態に合わせて手術を行うことが出来る。腎移植待機者が腎性貧血ガイドラインに記載されている様な適切な貧血管理がなされていれば輸血を行う頻度が少なくなるため、周術期輸血de novo DSA 移植腎予後悪化、という悪循環に陥らなくなる。腎移植レシピエントの長期成績の向上は社会的にもインパクトが大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Little is known about the impact of posttransplant blood transfusion (BT) on the sensitization of anti-HLA antibodies and the formation of dnDSAs. Consecutive 241 patients who underwent KTx at Akita University Hospital were enrolled in this study. Of these, 61.4% received BT. There were significantly more women, preemptive cases, and immunologically high-risk cases in the transfusion group than those in the nontransfusion group. The Hb level of patients in the transfusion group immediately before KTx was significantly lower compared with that of patients in the nontransfusion group. In this study, Hb < 11 g/dL immediately before KTx, blood loss > 300 mL at KTx, preemptive cases, female, were independent risk factors for transfusion therapy. Incidence of dnDSA in the transfusion group tended to be more than the nontransfusion group, and graft survival in the transfusion group tended to be worse than the nontransfusion group. BT may be an independent risk factor for dnDSA formation.

研究分野：腎移植、移植免疫

キーワード：抗HLA抗体 CREG de novo DSA 皮膚移植 マウス 輸血

臓器移植における免疫学的ハイレスポンダーと拒絶反応との関連性

1. 研究開始当初の背景

従来、臓器移植領域ではレシピエントがドナー特異的抗体を保有し、移植後に拒絶反応を起こすかどうかのリスク(免疫学的リスク)の判定方法の一つとしてダイレクトクロスマッチ(リンパ球交差試験)が行われてきた。しかし感度が低く偽陰性が多かったため、近年はフローサイトメトリークロスマッチや Luminex 法などで、より精密にレシピエントの保有抗体の評価、つまり拒絶反応を起こし易いかどうかの「免疫学的リスク」を評価できるようになった。その結果、ドナーとレシピエントとの間の免疫反応強度や抗体価(normalized Mean fluorescence Intensity: nMFI)などで、抗体関連型拒絶反応(液性拒絶反応とも呼ばれる強力な拒絶反応で発症すると高確率で移植腎廃絶もしくは機能が著しく低下する)発症のリスクを層別化し、リスクに応じた脱感作療法が行われるようになった。

一方で、免疫学的リスクの判定が困難な例にしばしば遭遇する。例えば、レシピエントがドナー特異的ではないものの、抗 HLA 抗体を高力価で且つ多数保有している場合(便宜的に「免疫学的ハイレスポンダー」と仮称する)である。免疫学的ハイレスポンダーでは de novo 抗体産生亢進や交叉反応(cross reaction)が起こりやすく移植腎予後が不良となるとの報告(Lachmann N et al, Transplantation 2009, Lee PC et al, Clin Transplant 2013)もあるが、影響は無いとする報告(Krishnan NS et al, PLoS One 2013)もあり controversialである。

免疫学的ハイレスポンダーは「抗体を産生し易いアロ応答性の強い個体」なのか、ドナーが「交叉反応性抗原(Cross reactive group antigens: CREG)を有するときのみ拒絶のリスクが高い」のか、またその脱感作の必要性について明確な根拠となるエビデンスは無い。

近年、腎移植を含めた腎代替療法を受ける患者の高齢化が進み、移植成績の向上も相俟って HLA ミスマッチの多い夫婦間移植、つまり、高齢の免疫学的ハイレスポンダー(夫から妻の場合)にも腎移植療法を行う機会が増加しているが、高齢患者に強力な免疫抑制を行えば時に重篤な感染症を引き起こし、移植腎のみならず生命予後をも悪化させる危険性がある(Knoll GA, Am J Kid Dis 2013)。

そこで本研究では「免疫学的ハイレスポンダーは拒絶反応を起こしやすいのか、またその交叉反応との関連性」に焦点を充てて検証を進める。

2. 研究の目的

本研究では、ドナー非特異的な同種異抗原(アロ抗原)に対する抗体を多く保有した個体(免疫学的ハイレスポンダー)が、実際にその個体とは別のアロ抗原を有するドナーから臓器移植を受けた場合に拒絶反応がより起きやすくなる(重篤化する)のかどうかを検証することを目的とする。

臓器移植領域における拒絶反応は一般に獲得免疫系の反応であり、理論的には抗原抗体反応は 1 対 1 対応のはずであるが、抗原性が近い(似通っている)場合は交叉反応を起こして移植臓器に何らかの影響を与える可能性があるため CREG に関する研究も併せて行う。

まず、HLA-A2 または HLA-A2 の CREG と考えられている A24 や A69 (中島文明, MHC 2006) を有するヒトのリンパ球を、C57BL/6 マウス(黒マウス MHC; H-2K^b) に輸注して、マウスに HLA-A2 または A24、A69 に対する抗体を産生させる(免疫学的ハイレスポンダー化)。フローサイトメトリーでこの感作マウスが HLA-A2 または A24、A69 に対する特異的抗体を産生していることを確

認め、同マウスに HLA-A2 を発現しているトランスジェニックマウスの皮膚を移植し、免疫応答がどのように変化するのか(またはしないのか) 非感作マウスの結果と比較する(図 1)。また、本実験系の中でリンパ節や脾臓といった 2 次リンパ組織でどのような変化がみられるのか、sacrifice して B 細胞レポーター(CD20(プレ B 細胞から活性型 B 細胞) CD27(記憶 B 細胞) CD79a (B 細胞全般) CD138 (形質細胞)) の population やその局在の変化の有無などもフローサイトメトリーや免疫染色で確認する(図 1)。

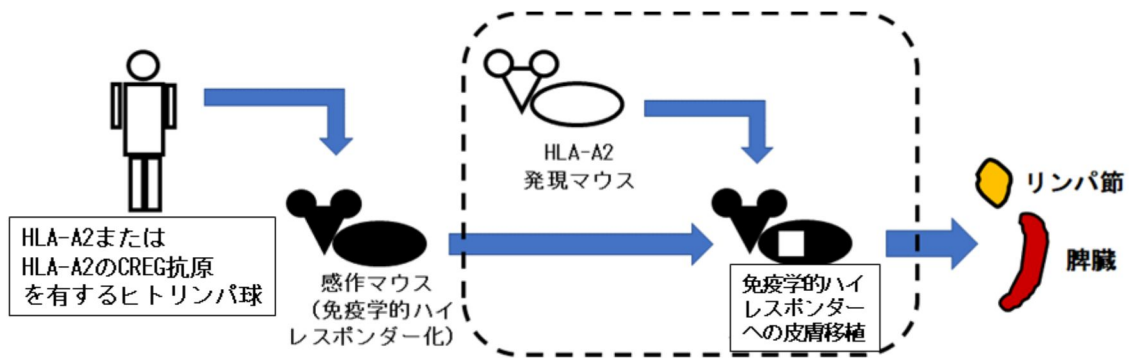


図 1

3. 研究の方法

一部上述でも触れているが、アウトラインとしては下図 2 の通りである。

まず、マウス皮膚移植モデルを確立すべく、同じアロ抗原 (H2-Kb) を持つマウス (Wild type (BL/6) Wild type (BL/6)) 間の皮膚移植では生着し、異なるアロ抗原 (H2-Kb と H2-Kd) を有するマウス (白マウス (Balb/c) Wild type (BL/6)) 間での皮膚移植では拒絶反応が発生することを確認する(図 3)。また、一度白マウスの皮膚を移植された感作 Wild type (BL/6) マウスに再度白マウスの皮膚を移植した際、その拒絶反応が早く、強く発現するのかどうかを確認する(図 3)。

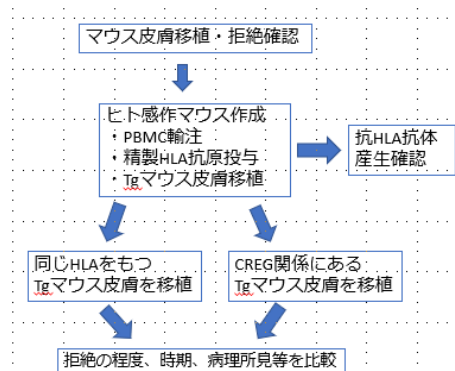


図 2

①マウス皮膚移植モデル・感作マウスモデルの確立

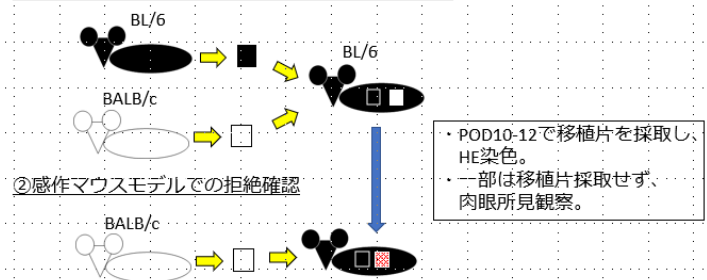


図 3

4. 研究成果

同じアロ抗原 (H2-Kb) を有する Wild type (BL/6) マウス間の皮膚移植では拒絶反応が起こらず生着が得られ、別のアロ抗原を有するマウス間での皮膚移植 (白マウス : Balb/c (H2-Kd) Wild type : BL/6 (H2-Kb)) では術後 15 日前後で拒絶反応が見られた。本実験では BL/6 マウスと Balb/c マウスの皮膚を同一個体 (BL/6 マウス) に皮膚移植を行うことで生着と拒絶を同時に観察した。以下にマクロ所見と病理所見(図 4) を提示する。生着モデル側の皮膚は創縁モクリアで徐々に体毛も生えていたが、拒絶モデル側の皮膚では術後 10 日頃からマクロ所見に萎縮・乾燥などの変化が生じていた(図 4)。同部位の病理標本では生着モデル側の皮膚は正常の所見を示しているものの、拒絶モデル側の皮膚では著明な炎症細胞浸潤が見られている(図 4)。

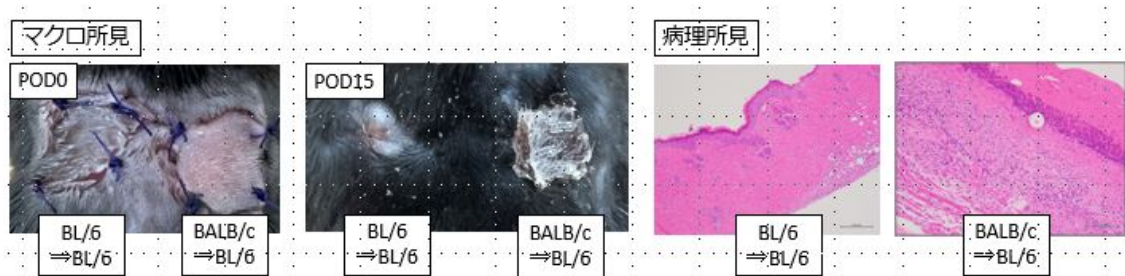


図 4

一度、Balb/c マウスの皮膚を移植されている感作 BL/6 マウスに、再度 Balb/c マウスの皮膚を移植すると、術後 5 日目くらいから萎縮・乾燥などの変化が目立ち始め、同部位の病理標本では著明な線維化が認められた（図 5）。感作マウスでは 1 回目の移植時よりも早く、強い拒絶反応が生じることが示唆された（図 5）。



図 5

次に、本実験系における感作法について、できるだけ pure な HLA 抗原のみで感作した方が他の抗原の影響を受けにくいただろうと判断し、商業的に HLA 抗原を精製している企業から購入できる見込みとなった。また、当初の実験計画の通り、ヒト PBMC（リンパ球）での感作実験も同時進行で行っている。HLA 情報が判明している本実験の担当グループメンバーによるボランティアの採血を行い、マウスに PBMC を輸注する予定である。

一方で、当方の臨床データで輸血による感作でのリスクについても検討した。生体腎移植症例 241 例の検討では 148 例（61.4%）で輸血されていた。背景因子の比較では輸血施行群で非施行群と比較して有意に女性が多く、先行的腎移植が多く、免疫学的リスクが高く、紹介時・入字・腎移植前日の Hb 値が低値であった。

	輸血無し群 (n=93)	輸血有り群 (n=148)	p-value
年齢 (歳)	48.5 ± 11.9	49.3 ± 12.4	0.619
性別 (男性/女性)	72 / 21	81 / 67	< 0.001
原疾患 (腎炎/それ以外)	56 / 37	86 / 62	0.746
原疾患 (糖尿病性腎症/それ以外)	15 / 78	37 / 111	0.103
透析期間 (カ月)	48.5 ± 57.8	33.2 ± 51.0	0.038
先行的腎移植 (%)	9.7 (9 / 93)	25.7 (38 / 148)	0.002
HLAミスマッチ数	3.25 ± 1.63	3.34 ± 1.45	0.661
紹介時Hb (g/dL)	11.3 ± 1.5	10.7 ± 1.7	0.008
腎性貧血ガイドライン達成率 (%)	81.7 (76 / 93)	58.8 (87 / 148)	< 0.001
入院時Hb (g/dL)	11.2 ± 1.5	10.1 ± 1.5	< 0.001
腎性貧血ガイドライン達成率 (%)	74.2 (69 / 93)	48.6 (72 / 148)	< 0.001
入院時Hb - 紹介時Hb (g/dL)	-0.12 ± 1.76	-0.63 ± 1.77	0.032
移植前日Hb (g/dL)	11.2 ± 1.2	9.9 ± 1.4	< 0.001
免疫学的ハイリスク (%)	21.5 (20 / 93)	36.5 (54 / 148)	0.014

表 1

輸血の危険因子について多変量解析したところ、女性、先行的腎移植、移植前日のHb 11g/dL未満、腎移植手術時の出血量 300mL以上が独立した危険因子であった(表2)。

	Univariate			Multivariate		
	OR	95%CI	p-value	OR	95%CI	p-value
年齢 (50歳 vs. 51歳以上)	0.948	0.564 - 1.593	0.840			
性別 (女性 vs. 男性)	2.685	1.497 - 4.817	0.001	2.311	1.192 - 4.481	0.013
原疾患 (腎炎 vs. それ以外)	0.916	0.540 - 1.554	0.746			
糖尿病 (有り vs. 無し)	1.733	0.890 - 3.374	0.106	2.004	0.917 - 4.386	0.081
透析期間 (24カ月未満 vs. 24カ月以上)	1.656	0.978 - 2.801	0.060			
先行的腎移植 vs. 維持透析	3.224	1.478 - 7.034	0.003	3.153	1.263 - 7.868	0.014
HLAミスマッチ数 (4-6 vs. 1-3)	1.103	0.652 - 1.866	0.716			
移植前日Hb (11 g/dL未満 vs. 11 g/dL以上)	5.780	3.268 - 10.204	< 0.001	4.878	2.604 - 9.091	< 0.001
免疫学的ハイリスク	2.097	1.154 - 3.810	0.015	1.831	0.922 - 3.637	0.084
移植時出血 (300 mL未満 vs. 300 mL以上)	2.719	1.586 - 4.659	< 0.001	3.296	1.738 - 6.250	< 0.001

表2

また、輸血群で de novo DSA 産生が多い傾向にあり (data not shown) 移植腎生着率も低い傾向にあった(図6)。術前治療で適切に Hb 値を 11g/dL 程度まで十分に上昇させておくべきと考えられた。

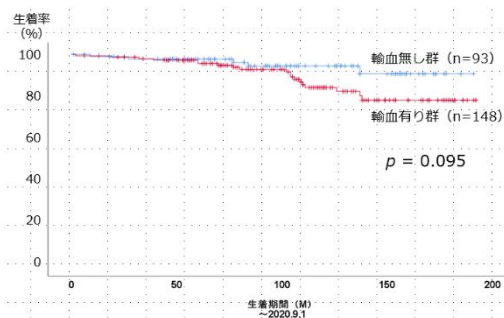


図6

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

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