

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18114

研究課題名（和文）腎移植拒絶反応における補体制御に関する探究的研究

研究課題名（英文）Investigative study on complement regulatory factor in renal transplant rejection.

研究代表者

山中 和明 (Yamanaka, Kazuaki)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10648017

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：腎移植急性細胞性拒絶反応時の補体制御因子の低下に炎症性サイトカインの影響するかを検証するため、尿細管細胞株とIL-6や可溶性IL-6 receptorとの培養しCD46、CD55、CD59の発現変化について検討した。CD46はIL-6に加え、IL-4とIL-2とで48時間共培養を行うと発現が低下した。CD55とCD59の発現については、IL-6の濃度・時間依存的に発現の低下を認めた。

以上から炎症性サイトカインが補体制御因子の発現低下に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに我々は腎移植後急性細胞性拒絶反応における補体制御因子の低下が移植腎予後に関連することを報告してきた。その原因として、本研究では炎症性サイトカインであるIL-6が関与し、補体制御因子の発現が低下することが示された。また一部では、IL-6以外にIL-2やIL-4といった炎症性サイトカインも関与することが示された。現在、様々な拒絶反応治療薬が開発されているが、いまだ満足いく治療効果ではなく、新規の治療薬が期待される分野であるが、炎症性サイトカインを制御する薬剤は他疾患において、すでに臨床応用されているものがあり、拒絶反応分野においても応用可能となる光明を見出した研究であると考えられた。

研究成果の概要（英文）： To investigate whether inflammatory cytokines influence the reduction of complement regulatory factors during acute cellular rejection of renal transplantation, tubular cell lines were cultured with IL-6 and soluble IL-6 receptors and the expression of CD46, CD55 and CD59 were assessed. The expression of CD55 and CD59 was down-regulated by the concentration- and time-dependent involvement of IL-6. CD46 expression was reduced when co-cultured with IL-4 and IL-2 for 48 h in addition to IL-6.

These results suggest that inflammatory cytokines are involved in the decreased expression of complement regulatory factors.

研究分野：腎移植

キーワード：補体制御因子 腎移植 拒絶反応 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

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、抗体抗原反応の結果、古典経路が活性化される。古典経路の代謝産物である C4d が傍尿細管毛細血管(PTC)への沈着することを証明することが、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た。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が、以前に我々はラット細胞性拒絶反応モデルを用いて、ATMR でも補体の第 2 経路の活性化が関与することを指摘し、その活性化には補体制御因子の低下が関連することが示唆されることを報告した。また ATMR を発症した腎移植患者でも補体制御因子 membrane cofactor protein(MCP)の発現が低い症例では、移植腎生着率が低下することを確認した。以上から、補体制御因子の発現が保持されることにより、ATMR の制御に有利となることが予想されるが、現在まで発現低下に関連する因子は解明されていない。

2. 研究の目的

ATMR における補体制御因子低下を抑制することができれば、ATMR に対する新規治療薬の創薬につながることを期待される。補体制御因子低下に関するメカニズムを解明し、新規の治療ターゲットを探索する。

3. 研究の方法

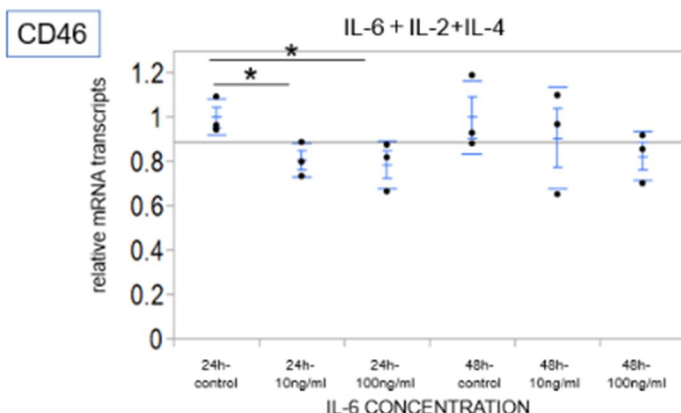
ATMR において炎症性サイトカインが上昇することがすでに報告されていることから、その中でも IL-6 に注目し、ヒト尿細管細胞株モデルと IL-6 を共培養することで補体制御因子の発現が低下するかを検討した。尿細管上の膜結合型蛋白である補体制御因子の CD46、CD55、CD59 の発現の変動について検討した。まず、至適な IL-6 の培養濃度と培養時間を決定するため、様々な濃度、時間で培養を行い、real time PCR 法で補体制御因子の発現について、評価した。さらに、IL-6 の作用には IL-6 が直接作用する経路と IL-6 が可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) に結合した後に間接的に作用する経路があるため、IL-6 のみ、IL-6 に sIL-6R を加えたもの、さらにそれらの阻害のため、抗 IL-6R 抗体を投与し、IL-6 の作用を検討した。さらに IL-6 以外の炎症性サイトカインの作用も確認するため、IL-2 と IL-4 に追加した検討も行った。

4. 研究成果

(1) CD46

CD46 の発現について、IL-6 の様々な濃度や 24 時間、48 時間までの培養を行い発現の評価をしたが、結果にばらつきが認められ、さらに条件の設定が必要と考えられた。しかし、IL-2、IL-4、IL-6 といった複数の炎症性サイトカインとの培養を行うことにより、容量・時間依存的に CD46 の発現が低下していた (図 1: * P<0.05)。

図 1

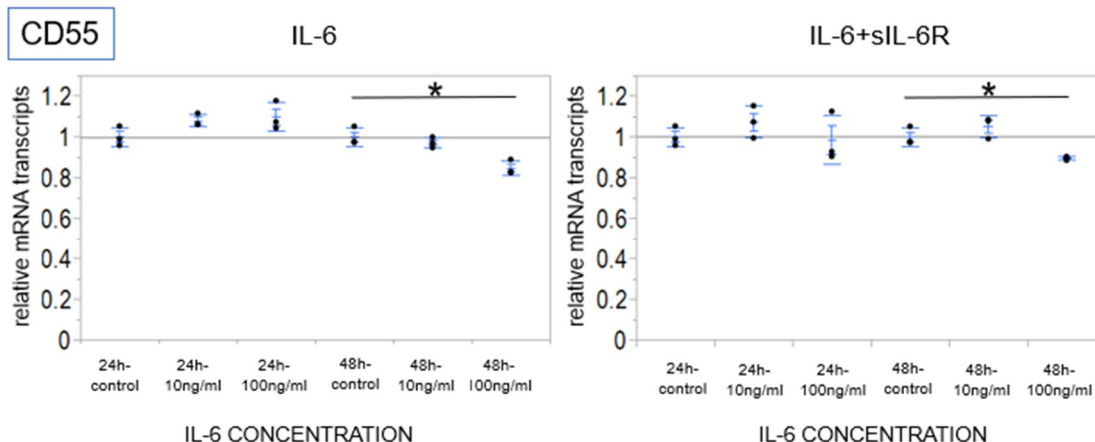


(2) CD55

CD55 の発現は IL-6 や sIL-6R を加え、48 時間まで培養すると IL-6 の用量依存的に発現の低下を認めた。ただし、IL-6 のみを加えた場合と、さらに sIL-6R を加えた場合で、明確な差が認められなかったために、IL-6 の間接的な効果が上乘せられるのかどうかは、不明であった。また、それぞれの系に抗 IL-6 receptor 抗体を加えることで、発現低下が抑制さ

れたことから、IL-6がCD55の発現低下に関与したことが示唆された(図2)。

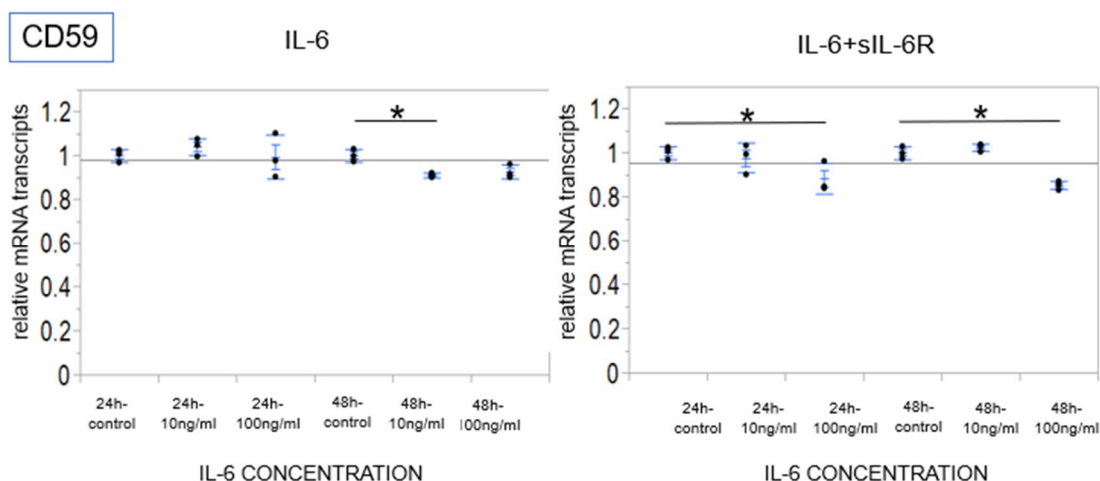
図2



(3) CD59

CD59の発現についてもCD55と同様に検討したところ、IL-6の用量・時間依存的に発現の低下を認めた。また、抗IL-6 receptor抗体を加えることで、発現低下が抑制されたことから、IL-6がCD59の発現低下に関与したことが示唆された(図3)。sIL-6Rを加えることで24時間後のCD59の発現も低下していたため、IL-6の直接的な作用に加えて、sIL-6Rを介した間接的な作用でもCD59の発現が低下すること考えられた。

図3



以上の結果から、炎症性サイトカインにより補体制御因子の発現が抑制されることが示唆された。これらの炎症性サイトカインに対する抗体は、すでに他疾患領域においていくつかは臨床応用されているものがあり、ATMRに対する新規薬剤として、有望な候補となりうることを示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kazuaki Yamanaka
2. 発表標題 IL-6 is involved in the suppression of complement regulatory factors on the renal proximal tubule
3. 学会等名 第101回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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