

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591403

研究課題名（和文）

抗体関連型拒絶反応における凝固系制御の重要性：新しい検査法および治療法の開発

研究課題名（英文）

Development of pre-transplant assessments that predict Antibody Mediated Rejection (AMR)

研究代表者

三輪 祐子 (Yuko Miwa)

名古屋大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：90572941

研究成果の概要（和文）：

ABO 不適合移植の移植前検査は、レシピエント血清中の赤血球凝集反応による抗体価測定のみが予後を予測する情報であるが、加えてドナー側の血管内皮細胞における抗原量を移植前にあらかじめ予測できたら重要な因子になると思われる。グラフトの ABO 発現を予測するマーカーとしてドナー血小板の ABO 抗原の発現を調べた。血小板は個人差が高く、中央値より30倍高い高発現の患者検体が存在した。しかし血管内皮細胞では、高発現のものが多く、発現に個人差は見られなかった。ドナー側の血管内皮細胞における ABO 抗原量が高発現の場合、レシピエント側の移植前の抗体量の他に、移植後に起こる免疫応答の評価が重要になると思われた。

研究成果の概要（英文）：

Current pre-transplant assessment in ABO-incompatible organ transplantation is only measurement of anti-A/B antibody titer in recipient serum. Although levels of A/B antigen expression on vascular endothelial cells (EC) of donor graft are considered to be important in immune response, there is no method for quantification. We examined A/B antigen expression levels in donor platelet (plt) that might predict levels of A/B antigen expression on EC. Expression levels of A/B antigen in Plt varied among patients. There was over 30-fold difference between the highest and lowest levels. However A/B antigens were constantly expressed in EC, and no inter-individual difference was observed. Effectiveness was not obtained in measurement of A/B expression in donor Plt. This result suggested that the development of novel pre-transplant assessment to predict immune response and clinical outcome would be required.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植外科学、抗体関連型拒絶反応、補体、凝固系制御

1. 研究開始当初の背景

近年の免疫抑制療法の進歩により、細胞性拒絶反応は、減少し、残された課題は抗体関連型拒絶反応の克服である。抗体関連型拒絶反応 (Antibody-Mediated-Rejection:AMR)

のハイリスク移植には、ABO 血液型不適合移植、クロスマッチ陽性 (抗ドナーHLA 抗体陽性) 移植があり、従来は予後不良のため禁忌とされてきたが、ドナー不足の解消、免疫抑制療法の進歩 (移植前抗体除去、脾臓摘出、免疫グロブリン投与、B 細胞制御のための抗 CD20 モノクローナル抗体) により、積極的に移植が試みられ、良好な成績が得られつつある。現在、移植前にこのような抗ドナー抗体の存在する移植に対して、予後を予測する検査方法は、抗体価の測定のみである。移植前に予後を予測するマーカーが、レシピエント側のドナーに対する抗体価のみではなく、ドナー側の要因、血管内皮細胞の抗原量が分かれば有益な情報となる。また、抗体関連型拒絶反応は内皮細胞上で(1)抗原と抗体の接着 (2)補体活性化(3)内皮細胞活性化 (4)凝固系亢進 (procoagulation) (5)微小血栓形成、循環不全、グラフト機能低下(6)静脈血栓、間質出血、グラフト機能廃絶という一連の反応により進展する。そして凝固系は、最終段階でグラフトに影響を与える重要な因子となる。

2. 研究の目的

移植ドナー不足解消への取り組みとして、抗ドナー抗体陽性移植 (ABO 血液型不適合移植、クロスマッチ (HLA 抗体)陽性移植) が組み込まれているが、現在これらの移植前の検査法としては抗体価測定のみである。移植医療の質を高めるため、抗原抗体反応後の補体、炎

症反応、凝固系の亢進を指標にした新しい移植前検査法の開発が本研究の目的である。

3. 研究の方法

移植前の検査法の開発

(1) ドナー血小板を用いた血液型 A, B 抗原量の推定

血小板において、ABO 抗原の発現は赤血球に比べて低く、血小板輸血では、問題にされなかったが、A 抗原, B 抗原、数パーセントの割合で発現が高い血小板があることが報告された。血管内皮細胞には、血液型 A, B 抗原が発現していることは確認されているが、その発現の程度が個人によって差があるかどうか詳しい報告はない。血小板は、巨核球由来の細胞で、血管内皮細胞と A, B 抗原の糖鎖抗原が結合する蛋白 (アンカー蛋白) PECAMI などが共通に発現しているものも報告されており、血小板に見られる A, B 抗原の個人差による発現の違いが、血管内皮細胞の発現に関わるのか検討する。

【測定方法】

腎移植ドナー患者血液検体、132 検体、A 型 87 検体 (内 AB 型 23 検体含む)、B 型 58 検体 (内 AB 型 23 検体含む)、AB 型 23 検体を対象に、血小板、赤血球の血液型 A, B 抗原の発現量を Flow cytometry 法 (FCM) によって比較した。また血管内皮細胞における A, B 抗原の抗原量は、移植腎のバイオプシー検体を用いて、免疫組織染色を行い比較した。

(2) レシピエント検体を用いた ABO IgG subclass 抗体価の測定

ABO 血液型不適合移植での、抗 A, 抗 B 抗体の IgG subclass の解析は ELISA 法、FCM 法など

の測定法で試みられており、その分布が IgG2, IgG1 が高く、IgG3, 4 が低いことが報告されている。またその subclass によって古典経路の補体活性化能が違うことが報告されており、IgG3, IgG1, IgG2, IgG4 の順に活性化能が高く、IgG3 の補体活性化能は、IgM と同等である。そのため、レシピエント患者抗体価の subclass の分布の違いが、臨床移植成績と関係するのに興味深いところだが、まだはっきりとした知見は報告されていない。今回は、ABO 血液型不適合腎移植で AMR を起こした群と non-AMR 群の血清を用いて、抗 A 抗 B 抗体価の IgG subclass 解析を行い、AMR 群と non-AMR 群でどのようなパターンの違いがあるか、解析を行い、IgG subclass 解析が、移植前検査の有用なマーカーとなるか検討した。

【測定方法】

ABO 血液型不適合腎移植患者のうち、A 型ドナーに対する AMR 群 11 名、AMR を起こさなかった群 11 名の、血清中の抗 A 抗体価の total IgG, M, IgG sub class 解析を行った。方法は、赤血球を用いた FCM 法で行った。赤血球は抗原抗体反応による凝集を抑制するため、DMS (Dimethyl suberimidate dihydrochloride) 処理をしたものを用いた。抗体は total IgG, IgM は DAKO 社の製品を用い、IgG subclass 抗体は、Southern Biotech 社の製品を用いた。また FCM 解析は、大量解析のできる BD 社の FACS CantoII High Throughput sampler システムを用いた。

4. 研究成果

(1) ドナー血小板、赤血球の血液型 A, B 抗原の発現は、まず初めに日間差がないかを確認してから、個人差を確認した。まず血小板の A, B 抗原の発現は赤血球に比べ

て変動係数が高く、個人差が高かった。

(表 1) 血小板と赤血球間での A, B 抗原発現に、相関性はなく、AB 型の赤血球では 9 割のドナーで A 抗原の発現が高かったが、血小板では B 抗原の発現が高いドナーのほうが多かった。今まで報告された血小板の A, B 抗原が高発現である割合は、A 抗原 B 抗原で大きな差はなかったが、今回のスタディーでは、A 抗原の高発現の割合は 1.1%, B 抗原の高発現の割合は、13.8%で、B 抗原の方が高発現の割合が高かった。又最高値も B 抗原では中央値の 24 倍、A 抗原では中央値の 9 倍で、B 抗原においてその高発現が目立った。又血小板での A, B 抗原が低発現、高発現のグラフト検体を用いて、血管内皮細胞の A, B 抗原量を免疫染色法で測定したが、その A, B 抗原の発現量に差はなかった。

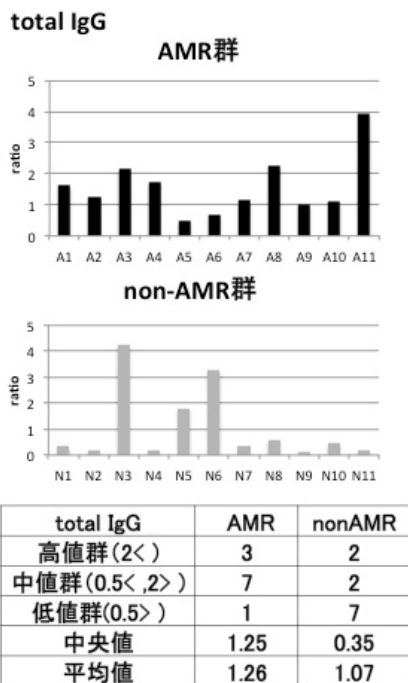
(表 1)

| | 血小板 | | 赤血球 | |
|----------|----------------------|-----------------------|------|------|
| | A抗原 | B抗原 | A抗原 | B抗原 |
| 平均値 | 221.2 | 668.4 | 3211 | 2413 |
| 中央値 | 158.4 | 252.2 | 3220 | 2523 |
| 変動係数 | 0.94 | 1.9 | 0.18 | 0.23 |
| 最高値 | 1364 (中央値 の9倍) | 6134 (中央値 の24倍) | 4937 | 3575 |
| 最小値 | 33.5 | 34.7 | 1432 | 1171 |
| 高発現群 (%) | 1/87 (1.1%) | 8/58 (13.8%) | / | / |

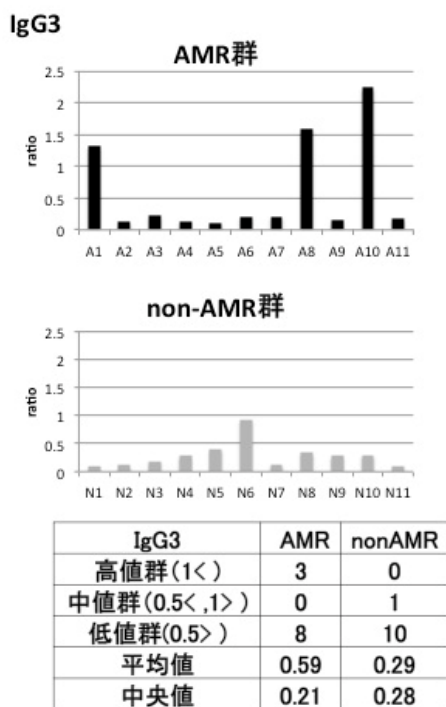
(2) 抗 A 抗体価は、total IgG, IgM subclass IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 いずれも、AMR 群、non-AMR 群で優位差はなかったが、AMR 群が non-AMR 群に比して低値群が少なく中程度以上であった。IgG subclass 解析は、IgG1, IgG2, IgG4 は total IgG の抗体価とよく似た分布を見せた。一方 IgG3 は他の subclass と違い、AMR 群のみで高値群が見られた。(図 1, 2) また赤血球凝集反応

の IgG とも IgG1, IgG2, IgG4 は相関性を見せたが、IgG3 は相関性が見られず、赤血球凝集反応の検出のみでは、その存在が予測できないと思われるため、IgG subclass 解析は、より有用な情報を提供すると思われる。

(図 1)



(図 2)



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)

①Yazaki S, Iwamoto M, Onishi A, Miwa Y, Hashimoto M, Oishi T, Suzuki S, Fuchimoto D, Sembon S, Furusawa T, Liu D, Nagasaka T, Kuzuya T, Ogawa H, Yamamoto K, Iwasaki K, Haneda M, Maruyama S, Kobayashi T.

Production of cloned pigs expressing human thrombomodulin in endothelial cells.

Xenotransplantation 査読あり 19:82-91, 2012

DOI:10.1111/j.1399-3089.2012.00696.x

②Iwasaki K, Miwa Y, Ogawa H, Iwamoto M, Furusawa T, Onishi A, Kuzuya T, Haneda M, Watarai Y, Uchida K, Kobayashi T.

Comparative Study on Signal Transduction in Endothelial Cells after Anti-A/B and HLA Antibody Reaction: Implication of Accommodation. Transplantation 査読あり 93:390-397, 2012

DOI: 10.1097/TP.0b013e3182424df3.

③Iwase H, Kobayashi T, Kodera Y, Miwa Y, Kuzuya T, Iwasaki K, Haneda M, Katayama A, Takeda A, Morozumi K, Watarai Y, Uchida K, Nakao A. Clinical Significance of Regulatory T Cell-Related Gene Expression in Peripheral Blood After Renal Transplantation. Transplantation 査読あり 91:191-198, 2011

DOI: 10.1097/TP.0b013e3181ffbab4.

④Kobayashi T, Maruya E, Niwa M, Saji H, Kohara S, Katayama A, Watarai Y, Takeda A, Uchida K. Significant Association Between Chronic Antibody-Mediated Rejection and Donor-Specific Antibodies against HLA-DRB rather than DQB in Renal Transplantation. Human Immunology 査読あり 72:11-17, 2010

DOI: 10.1016/j.humimm.2010.10.018.

⑤ 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. Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC) 査読あり 391:1210-1215, 2010

DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.042.

[学会発表] (計11件)

① 三輪祐子、鈴木俊一、岩崎研太、羽根田正隆、岩元正樹、大西彰、小林孝彰 ブタ内皮細胞におけるヒト型 Endothelial protein C receptor (hEPCR) と thrombomodulin (hTM) の共発現による凝固系制御の検討、日本異種移植研究会、2012年12月8日、京都

② 三輪祐子、矢崎智子、岩元正樹、岩崎研太、羽根田正隆、大西彰、小林孝彰 異種移植における凝固制御因子トロンボジュリンの抗炎症作用の解明、日本移植学会総会、2012年9月20日-22日、名古屋

③ 三輪祐子、山本貴之、神徳好美、岩崎研太、羽根田正隆、後藤憲彦、渡井至彦、武田朝美、両角國男、小林孝彰 ABO 不適合腎移植の新たなリスクファクター解析の試み、日本移植学会総会、2012年9月20日-22日、名古屋

④ 三輪祐子 抗体関連型拒絶反応 (AMR) を予測する移植前検査法の開発、ABO 血液型不適合移植研究会、2012年7月28日、名古屋

⑤ 三輪祐子、矢崎智子、岩元正樹、山本晃士、丸山彰一、岩崎研太、羽根田正隆、大西彰、打田和治、小林孝彰 ブタ血管内皮細胞における human thrombomodulin の TF の制御、日本異種移植研究会、2011年12月10日、広島

⑥ Yuko Miwa, Satoko Yazaki, Masaki Iwamoto,

Kenta Iwasaki, Koji Yamamoto, Masataka Haneda, Akira Onishi, Kazuharu Uchida, Takaaki Kobayashi Functional difference between membrane-bound and soluble human thrombomodulin, Cell transplant Society International Xenotransplantation Association, 2011年10月23日-26日, Miami (USA)

⑦ 三輪祐子、矢崎智子、岩元正樹、岩崎研太、羽根田正隆、大西彰、小林孝彰 異種移植における可溶性および膜型ヒトトロンボモジュリンの比較検討、日本移植学会総会、2011年10月4日-6日、仙台

⑧ 三輪祐子、矢崎智子、岩元正樹、山本晃士、丸山彰一、岩崎研太、羽根田正隆、大西彰、打田和治、小林孝彰 異種移植における human thrombomodulin の有用性、日本病態プロテアーゼ学会、2011年8月26-27日、大阪

⑨ 三輪祐子、矢崎智子、岩元正樹、大西彰、山本晃士、丸山彰一、岩崎研太、羽根田正隆、打田和治、長坂隆治、劉大革、門松健治、中尾昭公、小林孝彰 凝固系制御に重要なヒトトロンボモジュリンの作用、日本移植学会総会、2010年10月21日-22日、京都

⑩ 三輪祐子、山本晃士、羽根田正隆、岩崎研太、劉大革、矢崎智子、岩元正樹、大西彰、打田和治、中尾昭公、小林孝彰 異種移植における補体の活性化と凝固の促進、補体シンポジウム、2010年9月10-11日、福島

⑪ Yuko Miwa, Satoko Yazaki, Masaki Iwamoto, Akira Onishi, Koji Yamamoto, Kenta Iwasaki, Masataka Haneda, Shoichi Maruyama, Kenji Kadomatsu, Kazuharu Uchida, Takaaki Kobayashi Effective Suppression of Direct Prothrombinase Activity in Porcine Endothelial Cells by

Human Thrombomodulin (hTM) Gene Transfer or
Its Soluble Form. AMERICAN TRANSPLANT
CONGRESS, 2010年5月1-5日, San
Diego (USA)

○取得状況 (計 1件)

名称: 「EndoGalC-hDAF ダブルトランスジェ
ニックブタ」

発明者: 大西彰、小林孝彰、岩元正樹、橋本
径子

権利者: プライムテック株式会社、国立大学
法人名古屋大学、独立行政法人農業生物資源
研究所

種類: 特許

番号: 特願 2007-061011

取得年月日: 2012年10月5日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/tx-immunology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三輪 祐子 (MIWA YUKO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・研究員
研究者番号: 90572941

(2) 研究分担者

小林 孝彰 (KOBAYASHI TAKAAKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座
教授

研究者番号: 70314010

羽根田 正隆 (HANEDA MASATAKA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座
講師

研究者番号: 50436995

岩崎 研太 (IWASAKI KENTA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講
座講師

研究者番号: 10508881

(3) 連携研究者なし