

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591805

研究課題名(和文)腎移植患者におけるテーラーメイド免疫抑制のモニタリング

研究課題名(英文)Monitoring of personalized immunosuppression treatment of kidney transplant

研究代表者

水谷 一夫(Mizutani, Kazuo)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20303612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：腎移植におけるテーラーメイド治療の要因の研究を行った。今回の研究でcalcineurin inhibitorの免疫抑制方法や免疫抑制剤の濃度のみでなく各種サイトカイン、長期にわたるHLA抗体の検査、およびMMFの濃度測定が感染症、拒絶反応、移植腎機能及び移植腎生着率に大きな影響を与えることが示され、これら因子が今後のテーラーメイド治療における重要な因子であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to find the application of personalized treatment to each kidney transplant patient. In this study, besides the immunosuppression treatments and the level of calcineurin inhibitor, we found following: 1) The quantification of PHA-induced IL2 mRNA will be a useful tool for the development of personalized medicine diagnostics for measuring the efficacy of immunosuppressive drugs. 2) Kidney patients who rejected transplants had HLA antibodies more frequently than those with functioning grafts. These antibodies found in the peripheral circulation, and their association with failure is consistent in long period. 3) The Measurement of Mycophenolic acid (MPA) trough concentration was associated with kidney function and immunosuppression treatments.

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：腎移植

キーワード：transplant kidney テーラーメイド治療 サイトカイン HLA抗体 MMF

## 1. 研究開始当初の背景

免疫抑制剤の進歩とともに腎移植の急性拒絶反応は低下し、移植腎の生着率は向上してきている。しかし移植後早期の生着率は改善したものの長期にわたる成績は依然として大きな改善はない。その原因として慢性拒絶反応や免疫抑制剤による腎毒性・感染症などの合併症などがあるがこれらは依然として改善されなければならない重要な問題である。また、今後、人口の高齢化に伴い高齢者の腎移植が増加することが予想され、高齢腎移植患者の免疫抑制方法も今後は大きな問題となることが予想される。このように個々の移植患者が個別の問題を抱える腎移植では今後、個々の患者の問題に合わせたテーラーメード治療が必要になってくることが予想される。またテーラーメード治療を行うためには個々の腎移植患者の免疫抑制状態のモニターが必須であるが、現在では薬剤濃度を測定することはできてもその免疫抑制の程度までのモニター方法が確立されたとは言いがたいのが現状である。

拒絶反応としては細胞障害性と抗体関連の拒絶反応があり、腎移植で患者の免疫抑制のモニターリングを行うためには細胞障害性及び液性免疫（抗体関連）による拒絶反応の双方をモニターすることが必要である。現在、拒絶反応の最終診断は病理検査によるが、病理検査のための移植腎生検を頻回に繰り返すことは临床上難しい。したがって移植腎生検の代替として各種サイトカインの測定や免疫抑制剤の濃度、各種抗体の有無などが用いられている。しかし、これら各種サイトカイン、免疫抑制剤の絶対値のみでは個々の患者の反応性を知ることはできない。各個人により免疫抑制剤の最適濃度が異なり、測定方法による差が存在することは臨床的によく経験することである。またサイトカインなどは遺伝子多型において反応が異なるなど個々人の反応性が異なり、画一的なモニターではなく、テーラーメードな免疫抑制と全体的なモニターリングが求められている。特に移植患者では長期にわたって免疫抑制剤を服用するため、拒絶反応を抑え、かつ副作用を起こさないように、徐々に免疫抑制剤を減量していくことが必要である。各患者毎に最適な投与量を決定しながら減量していくことは副作用の発現を抑え、患者の QOL ばかりでなく、医療費抑制の面からも重要な課題である。

特に日本における腎移植は世界的にみても例数が少なく、このような状況の中で腎移植の十分な移植医療のトレーニングが行えるとは言いがたい。今後は科学的根拠にしたがった医療を行っていかなければならない。

そのためには簡便に生体内の反応まで知ることのできるモニター方法の確立は社会的にも大きな意義がある。

## 2. 研究の目的

我々は現在までに 800 例以上の腎移植を行い、臨床データを蓄積してきたが、患者の免疫抑制剤の濃度のみではなく、リンパ球マーカーの変化(4)、HLA 抗体の有無など(5)、移植患者のフォローアップを行ってきた。しかし、既存の方法のみでは依然として種々の合併症などを経験し、患者のモニターリング方法が十分であったとは言いがたい。

今回の研究では以下の検査方法を用いて腎移植におけるテーラーメード治療を行う上での重要な要因を検索決定しテーラーメード治療に向けた方法論を確立することを目的として研究を行った。

- 1) mRNA を用いて ex vivo における抹消血のリンパ球の刺激反応性の検査
- 2) 各種 HLA, non-HLA 抗体の測定
- 3) MMF および代謝産物の濃度測定

これらのモニターリングを同時に行うことで腎移植患者の免疫抑制状態を総合的に判断し、移植患者の全体的な免疫抑制状態を知り、最適な免疫抑制剤を最適な時期に用いることが可能となると考えられる。

## 3. 研究の方法

- 1) mRNA を用いた ex vivo における抹消血のリンパ球の刺激反応性の検査

in vitro においてはヘパリン加末梢全血にリンパ球活性化物質および溶媒をそれぞれ加え 1-2 時間反応させた後にリンパ球活性化に関係する mRNA の発現量を定量し、リンパ球活性化物質による mRNA の発現倍率を計算する。リンパ球を活性化する物質としてレクチン、免疫複合体、抗受容体抗体などを用い、インターフェロン、Tumor necrosis factor super family、サイトカイン、インターフェロンなどの mRNA を定量する。免疫抑制剤投与前の値が基礎値であり、この値が薬剤投与後に低下するが、この低下の程度と薬剤の血中濃度、臨床症候（拒絶反応、薬剤の副作用）との相関を検討する。Ex vivo ではヘパリン加末梢全血に濃度勾配を設けた免疫抑制剤（サイクロスポリン、タクロリムスなど）をそれぞれ 30 分-1 時間反応させ、その後上記と同様にリンパ球活性化物質ないし溶媒を反応させ、発現倍率を計算する。免疫抑制剤の濃度勾配によって、この発現倍率は変化するので、そこから薬剤の 50%抑制濃度 ( $IC_{50}$ ) を上記の mRNA ごとに算出する。同時に  $IC_{10}$

や  $IC_{25}$ 、 $IC_{75}$ 、 $IC_{90}$  など算出する。これらの値と、上記の *in vivo* での効果、薬剤の血中濃度、臨床症状（拒絶反応、薬剤の副作用）との相関を検討する。

## 2) 各種 HLA 抗体の測定

1984 年から 1999 年までの生体腎移植症例の中で移植時よりの血清が検査可能な症例 50 例を検討した。HLA 検査は One Lambda 社の LABScreen Single Antigen test を使用した。

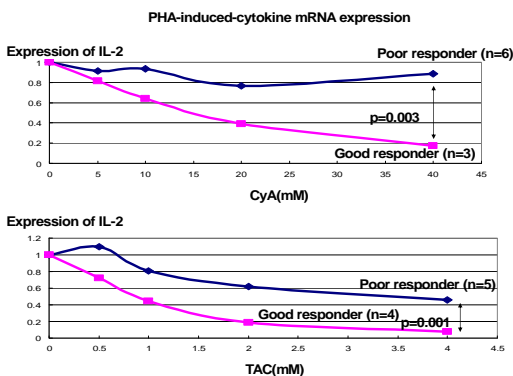
## 3) MMF および代謝産物の濃度測定

免疫抑制剤のミコフェノール酸モフェチル (MMF) の濃度についても検討を行った。今回は当科における MMF 使用群 34 症例を対象とし高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用して活性を持つ血漿中ミコフェノール酸 (MPA) と代謝産物で活性を持たないミコフェノール酸グルクロナイド (MPAG) の外来でのトラフ濃度の測定を行い、臨床データとの関係を考察した。

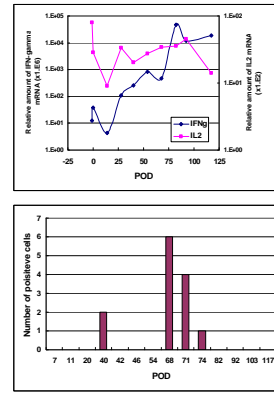
## 4. 研究成果

### 1) mRNA を用いた *ex vivo* における抹消血のリンパ球の刺激反応性の検査

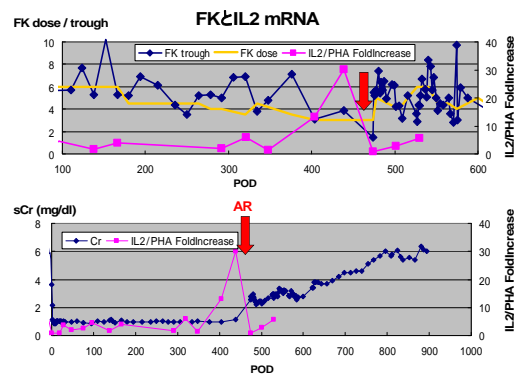
移植前のリンパ球を用いてサイクロスポリンとタクロリムスの濃度により IL2 mRNA の産生を比較するとその反応性により responder と non-responder に分類することができた。サイクロスポリンとタクロリムスの反応性は個々の患者において異なり、またその濃度による反応も異なり、血中濃度の重要性が示唆された。



この手法を用いて腎移植患者の経過を観察したところ以下の症例を得た。腎移植後に CMV 感染を引き起こした症例では上記手法を用いて CMV 感染にてアンチゲネミアの上昇前に IL2mRNA の増加が確認できた。

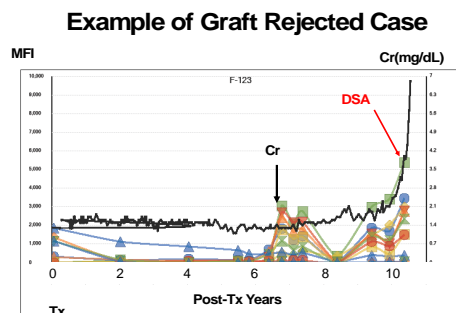


以下の症例では拒絶反応の直前に FK 濃度が下がり IL2mRNA の増加はみられ拒絶反応を通常の検査より早期に確認することができる可能性が示唆された。



### 2) 各種 HLA, non-HLA 抗体の測定

長期の腎移植の生着例の抗 HLA 抗体に関して調査を行った。今回の検討では抗 HLA 抗体は長期にわたり抗体が発現している症例で生着している症例もあるが、統計学的解析では抗 HLA 抗体を発現している群では機能廃絶群に抗 HLA 抗体の発現症例が優位に多かった。 $(p=0.001)$  また抗体の MFI (mean fluorescence intensity) が 10000 以上ある群では機能廃絶症例が優位に多く  $(p=0.039)$ 、抗体の有無だけでなく抗体の強さも腎移植の生着に関係することが示された。



	Antibody Positive	Antibody Negative
Graft Rejected	26	6
Functioning	14	14

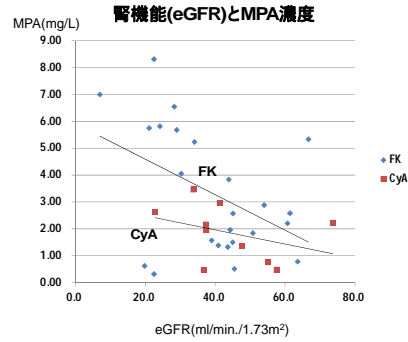
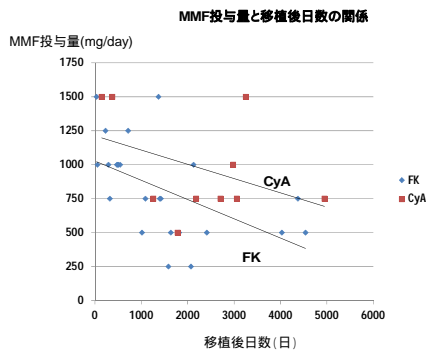
p=0.0001

	MFI 10000>	MFI <10000
Graft Rejected	15	17
Functioning	6	22

p=0.039

### 3) MMF および代謝産物の濃度測定

免疫抑制剤のミコフェノール酸モフェチル (MMF) の濃度についても検討を行った。MMF の平均投与量は 868mg/日 で平均血清クレアチニン濃度は 1.5mg/dl であった。当科の MMF 投与量は患者の体重との間に明らかな関連は認められなかったが、腎移植の経過が長くなるにつれて減量される傾向があった。また MPA と MPAG の間には明らかな関連は認められず、MMF に影響を与えると考えられる MPA の測定のみで十分と考えられた。プログラフ投与群では投与量が増大するとともに MAP の増加がみとめられたが、シクロスポリン投与群ではその傾向はみられず、また腎機能低下群では MPA 濃度の高い症例が多かった。以上より腎機能や免疫抑制剤の種類により MMF の投与量を変更する必要がある可能性が示され、テラレーメド免疫抑制のためには MPA の濃度も考慮しなければならない可能性が示唆された。



上記の結果より各種サイトカイン、長期にわたる HLA 抗体の検査、および MMF の濃度測定が移植腎機能及び移植腎生着率に大きな影響を与えることが示され、これら因子が今後のテラレーメド治療における重要な因子であることが示された。

### 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 2 件)

- 1) 水谷一夫、服部良平、葛谷文孝、後藤百万 名古屋大学における MMF 血中濃度測定の試み 腎移植症例集 2012、査読無 2012、26-28
- 2) 水谷一夫、服部良平、他 献腎移植におけるドナー死戦期の腎機能と1時間生検 腎移植症例集 2011、査読無 2011、251-253

[学会発表](計 13 件)

- 1) Kazuo Mizutani, Ryohei Hattori, Masashi Kato, et al, Phytohemagglutinin-induced Cytokine mRNA as a Useful Marker of Immunosuppressive Drugs. The 13<sup>th</sup> Congress of Asian Society of Transplantation, 2013/9/5 Kyoto
- 2) Kazuo Mizutani, Ryohei Hattori, Momokazu Gotho, et al, Anti-HLA antibody reduced graft survival in living-related transplants.: over 20-years experience. The 13<sup>th</sup> Congress of Asian Society of Transplantation, 2013/9/5 Kyoto
- 3) Kazuo Mizutani, Ryohei Hattori, Momokazu Gotho, et al, eGFR and one-hour biopsy in living-related and deceased kidney transplants with using insitu-cooling double-balloon catheters The 13<sup>th</sup> Congress of Asian

Society of Transplantation, 2013/9/4  
Kyoto

- 4) 水谷一夫 腎移植とMICA/MICB抗体 第19回日本輸血・細胞治療学会 2012/11/16 岡山
- 5) 水谷一夫、服部良平、葛谷文孝、後藤百万 当院におけるMMF血中濃度測定を試み 第45回日本臨床腎移植学会 2012/2/2 軽井沢
- 6) 水谷一夫、丸山彰一、他 腎移植レシピエントの腎機能に関する1時間生検の病理学的検討 第102回日本泌尿器科学会総会 2012/4/22 神戸
- 7) 水谷一夫、服部良平、葛谷文孝、後藤百万、MMFの血中濃度測定を試み 第57回日本透析医学会総会 2012/6/22 札幌
- 8) Kazuo Mizutani, et al, Phytohemagglutinin-induced Cytokine mRNA as a Useful Marker of Immunosuppressive Drugs 3<sup>rd</sup> International Conference on Transplantomics and Biomarkers in Organ Transplantation 2012.3.9 La Jolla
- 9) Kazuo Mizutani, et al, Effective monitoring of CMV infection by quantitative analysis of Phytohemagglutinin-induced mRNA. Case report in renal transplant 2012.3.9 La Jolla
- 10) 水谷一夫 他 当院におけるMMF血中濃度測定を試み 第45回日本臨床腎移植学会 2012.2.2 軽井沢
- 11) 水谷一夫 腎移植とMICA/MICB抗体 第45回日本臨床腎移植学会 2012.2.11 大阪
- 12) 水谷一夫 他 長期の腎移植におけるHLA抗体 第20回日本組織適合性学会大会 2011.8.29 静岡
- 13) 水谷一夫 他 生体腎移植におけるHLA抗体と移植腎生着の検討 第56回日本透析医学会学術集会 2011.6.17 横浜

〔図書〕(計 1 件)

水谷一夫、今井圓裕 他、やさしい慢性腎臓病の自己管理 第3版、医薬ジャーナル、2012

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
特になし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

水谷一夫 (MIZUTANI, kazuo )  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 20303612

##### (2) 研究分担者

加藤 真史 (KATO, masashi )  
名古屋大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 10362229

##### (3) 研究分担者

清水 朋一 (SHIMIZU, tomokazu )  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 60307593