

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791520

研究課題名（和文）肝移植のレシピエントにおけるドナー特異的抗体と拒絶反応に関する研究

研究課題名（英文）Association between donor specific HLA antibodies and rejection in liver transplantation

研究代表者：

脇 嘉代 (WAKI KAYO)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70505891

研究成果の概要（和文）：肝移植後の拒絶反応における抗 HLA 抗体の役割は不明である。本研究では肝移植における抗 HLA 抗体と拒絶反応、免疫抑制剤の減量との関連性について検討した。その結果、移植後に急性拒絶反応を発症した症例では、急性拒絶反応を発症しなかった疾患に比べて抗 HLA 抗体、中でも、ドナー特異的抗体の陽性率が高いことが明らかになった。更に、肝臓移植前と肝臓移植後早期の抗 HLA 抗体の有無を調べたところ、拒絶反応のリスクが低い症例では、移植前と移植後早期から抗 HLA 抗体が陰性である傾向が認められた。また、拒絶反応のリスクが高い症例では、移植前と移植後早期から抗 HLA 抗体が陽性であり、抗体価も高い傾向が認められた。移植前と移植後早期の抗 HLA 抗体が陰性、もしくは抗 HLA の抗体価が低い症例では、抗 HLA 抗体が陽性の症例に比較して、免疫抑制剤を減量・中止できる可能性が高かった。抗 HLA 抗体の有無のみならず、その抗体価も拒絶反応のリスクと関連があることが示された。以上から、抗 HLA 抗体と拒絶反応の関連性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The role of human leukocyte antigen (HLA) antibodies in graft rejection after liver transplantation remains inconclusive. In order to investigate whether the presence of HLA antibodies was associated with rejection, we retrospectively examined the prevalence of anti-HLA antibodies in living-donor liver transplant recipients both before and after transplantation, and then analyzed the relationship of those antibodies with rejection.

The prevalence of post-transplant HLA antibodies—especially donor-specific antibodies—in patients who experienced acute rejection was higher than in patients who had no rejection, though the difference did not reach statistical significance. In addition, the prevalence of antibodies before and after transplantation in patients who developed operational tolerance after withdrawal from immunosuppression was more likely to be negative than in patients who did not develop operational tolerance. Pre-transplant, the recipients who did not develop operational tolerance tended to have antibodies whose titers were already high. The highest mean fluorescence intensity of antibodies was significantly higher in patients who did not develop operational tolerance than in patients who developed operational tolerance. Therefore, not only the prevalence of antibodies but also their titers were closely associated with rejection.

In our study, post-transplantation HLA antibodies were clearly associated with rejection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

1. 研究開始当初の背景

1963年に肝移植が初めて実施されてから臓器保存方法、手術手技の開発によって肝移植の治療成績は大幅に向上した。特に1980年代に始まる免疫抑制療法の進歩により、移植後1年以内にacute rejection（急性拒絶反応）が原因でgraft failure（グラフト不全）を起こす頻度は著しく減少し、移植予後は大きく改善した。しかしながら、acute rejectionの減少によって改善したのは短期予後であり、移植の長期予後は殆ど改善が見られていない(Waki K, Tamura S, Sugawara Y *et al*, *Clin Transpl*. 2009; p5, 2010)。また、長期にわたる免疫抑制剤の投与により感染症、糖尿病、腎機能障害、悪性腫瘍の発症のリスクが問題となっており、これらのリスクとrejectionのリスクを見極めながら免疫抑制剤を調整する必要がある。Rejectionやoperational tolerance（免疫抑制剤を中止しても長期にわたって拒絶反応が起こらず生着が続く状態）の病態の解明と、それに基づくrejectionの発症の予測と予防、免疫抑制剤の調整は重要な課題である。

一方、rejectionの発症の予測に関して腎移植ではかなり研究が進められている。腎移植では抗HLA抗体と拒絶反応の因果関係が明らかにされ(*Transplantation* 86, p 377, 2009)、抗HLA抗体価が上昇した時に早期にBortezomibを投与することにより慢性拒絶反応を予防できることが示されている(*Transplantation* 87, p 1555, 2009)。更に抗HLA抗体、特にドナー特異的抗HLA抗体の抗体価をモニタリングすることによって、抗体価が上昇した時にのみ免疫抑制剤を投与し、抗体価が安定している場合は免疫抑制剤の中止もしくはステロイドの少量投与のみにより、良好な予後が得られると報告されている(*Transplantation*. 87, p1555, 2009)。

肝移植における抗HLA抗体の重要性は高まりつつある。腎移植と同様に、抗HLA抗体とrejectionの関連を検討することはoperational toleranceの病態の解明にも関連し長期予後の改善に結びつくと考えられる。これまでにoperational toleranceに関連する因子として、制御性T細胞の増加などが指摘されているが、operational toleranceの病態やそれに関わる因子は明らかになっていない。一方で、抗HLA抗体が高値の患者では抗HLA抗体が低値の患者に比較してステロイド抵抗性のrejectionを起こしやすいという報告や、抗HLA抗体陰性の患者では免疫抑制剤を中止できた、という報告がある

(Girnita A, Mazariegos GV, Castellaneta A *et al*, *Hum Immunol* 2010; 71:274)。更に、移植後に出現した抗HLA抗体や、移植前から認められる抗HLA抗体と移植後1年以内の発症したrejectionには関連があるという報告(Kasahara M, Kiuchi T, Takakura K *et al*, *Transplantation*. 1999;67:568)や、chronic rejection（慢性拒絶反応）によりgraft failureに陥った患者はグラフトが生着していた患者に比較して有意に抗HLA抗体の陽性率が高かったという報告があり(O' Leary I. G, *et al*, TTS2010 XXIII Congress)、肝移植における抗HLA抗体とrejection、operational toleranceの関連性を示唆していた。

抗HLA抗体とrejection、更にoperational toleranceの関連性を検討することにより、それらの病態が明らかになればacute rejectionのみならずchronic rejectionのリスクも抑制できる可能性もあり、肝移植の長期予後の改善に結びつくと期待される。

2. 研究の目的

肝移植における拒絶反応(rejection)と抗HLA抗体の関連を明らかにし、抗HLA抗体のモニタリングによりrejectionの発症を予測できるか、抗HLA抗体値の推移からrejection発症のリスクが低いと判断される症例では免疫抑制剤の減量が可能か、HCV感染等、移植後の免疫抑制剤の投与がウイルスの活動性を高め再発が問題となる症例では抗HLA抗体をモニターの上、免疫抑制剤を減量して再発を抑制できるか、更に、抗HLA抗体が長期予後に及ぼす影響を検討することを目的とした。具体的には、移植後早期の抗HLA抗体と、その後のoperational toleranceの導入の有無に関連性があるかを検討した。既存の研究では生体肝移植を対象に、抗HLA抗体の種類とその役割を個別に検討したものは限られているため、本研究ではそれぞれの抗HLA抗体(HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP抗体)とoperational tolerance導入の関連性も個別に検討した。

3. 研究の方法

倫理委員会の承認を得た後、本研究について患者に説明し、本研究参加への同意書を取得した。対象症例の移植前、移植後(1ヶ月後、3ヶ月後毎に2年後まで)の定期検査で使われた血清の残り(1ml)を本研究の血清検体とし、抗HLA抗体を測定した。抗HLA抗体

価の時系列推移と肝機能等の検査所見の時系列変化、および移植後の合併症、graft failure等の臨床所見・臨床経過について明らかにした。

対象者

1996年4月から2000年12月までに生体肝移植を受けた52名の小児患者を2011年7月まで追跡し、その結果を検討した。この間に1例のグラフト不全が認められた。グラフトが生着している51名のうち、血清検体の得られた40名について抗HLA抗体の有無を調査した。また、そのうち30名については移植前後の両時期の血清があり、移植前後の抗HLA抗体が測定された。

免疫抑制剤の投与と離脱のプロトコール

タクロリムスとステロイド剤を中心とした免疫抑制療法が行われた。血中トラフ値は移植後1週間では15-20 ng/mlを目標にし、6か月後までに5-8 ng/mlに減量された。ステロイド剤は20 mg/kgを移植前から投与し、徐々に維持量まで減量された。移植後2年以上経過した症例で、カルシニューリン阻害薬（タクロリムス）単剤で管理され、過去1年間の肝機能（ALT）が正常であることを条件に免疫抑制剤の離脱が開始された。免疫抑制剤（タクロリムス）の減量は、7段階に分け、前半のステージ1~3までは4か月、後半のステージ4~7までは3か月の期間として、肝機能とその他の臨床所見の変化をモニタリングしながら徐々に行われた。トライアル中に、原因不明の肝障害が出現した場合は、肝比護剤（ウルソデオキシコール酸、グリチルリチン酸）の投与や免疫抑制剤の一時的増量（メチルプレドニゾロン1週間）が行われた。1ヶ月以上続く肝障害や中等度以上の肝障害（ALT \geq 100）がみられた場合、離脱は中止された。ヒアルロン酸の持続的な上昇（ \geq 25ng/ml）が認められた場合は肝生検が行われ、活動性の炎症反応や進行性の線維化の所見があればトライアルを中止し免疫抑制剤が強化された。免疫抑制剤を中止後も1年以上にわたって肝機能が正常であった場合をoperational toleranceと定義した。更に、肝生検を行い、組織学的にも拒絶反応が認められないことが確認された。

抗HLA抗体の測定

LABScreen mixed beads (One Lambda)を用いて抗HLA抗体の有無をスクリーニングした後、LabScreen single antigen class I beadsとLabScreen single antigen class II beadsを用いて抗HLA抗体の種類を特定した。MFIのトリム平均値(normalized MFI)を算出し、1000以上を陽性と判定した。ドナーとレシピエント間でのHLAミスマッチを基にドナー特

異的抗HLA抗体の有無も判定した。この際、殆どの抗HLA抗体陽性の患者で複数の抗HLA抗体が認められたため、それぞれの抗HLA抗体のMFI値を比較し、最も高いMFI値を最高MFI値と定義した。

統計解析

生体肝移植を受けた小児患者を、移植後にoperational toleranceに導入となった群(OT群)と導入に至らなかった群(非OT群)の2群に分類した。両群の患者の特徴は、カテゴリ変数（レシピエントの性別と原疾患、ドナーの性別、レシピエントとドナーの血縁関係、クロスマッチの結果、acute rejection発症の有無）についてはカイ二乗検定、連続変数（レシピエントの年齢、ドナーの年齢、PELDスコア、冷虚血時間、温虚血時間、HLAミスマッチ数、移植後の期間）についてはウィルコクソンの符号順位検定を用いて検討した。MFI値は、対数変換した値を検討した。全ての解析はStata version 10 (Stata, College Station, TX)を用いて行われた。

4. 研究成果

40名のうち17名がOT群であり、23名が非OT群であった。レシピエントの年齢、基礎疾患、急性拒絶反応の既往歴、HLAミスマッチの数、追跡期間など、レシピエント、ドナー、移植の条件に関して、OT群と非OT群の2群間であまり大きな差は無かったが、非OT群に比べてOT群は女性の割合が有意に高かった(88.2% vs. 47.8%; $p=0.008$)。また、有意差は認められなかったものの、OT群は非OT群に比べて移植後の急性拒絶反応を発症した割合が低かった(33.3% vs. 50.0%; $p=NS$)。

移植前の血清では、OT群と非OT群の両群とも抗HLA抗体の保有率は高かった。一方、移植後の血清では、OT群に比較して非OT群は抗HLA抗体の保有率が有意に高かった(73.3% vs. 95.2%; $p<0.001$)。また、移植前後の血清を比較すると、移植前ではOT群では非OT群に比較して、抗HLA抗体クラスI及びクラスIIの両方の保有率がずっと低く(12.5% vs. 52.6%)、その違いは移植後に更に広がっていた(0.0% vs. 66.7%)。ドナー特異的抗体は術前、術後とも両群で陰性であった。

次に、殆どの抗HLA抗体陽性患者で、複数の抗HLA抗体が認められたため、最高MFI値をOT群と非OT群の2群間で比較した。その結果、移植後の血清では、抗HLA抗体クラスI及びクラスII共に、OT群に比較して非OT群では有意に最高MFI値が高かった。

また、OT群と非OT群の2群間で各種抗HLA抗体(HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP抗体)の保有率を比較した結果、非OT群ではOT群に比較して、HLA-B抗体、HLA-C

抗体、HLA-DQ 抗体、HLA-DR 抗体の有率が有意に高く、HLA-A 抗体と HLA-DP 抗体は両群で有意差が認められなかった。

これまでの報告と同様に、他の臓器移植後の患者と比較すると、本コホートでも operational tolerance 導入が可能であった患者でも、抗 HLA 抗体の陽性率は極めて高かった。その理由の一つとして生体肝移植の患者は術前や術後に血液製剤を投与されることが多いことが考えられた。一方で、抗 HLA 抗体の有無のみならず、その種類や MFI 値も operational tolerance と関連があることが示され、他の臓器移植と同様に、生体肝移植においても抗 HLA 抗体と rejection の因果関係が示唆された。

本コホートでは殆どの抗 HLA 抗体がドナー非特異的抗体であり、ドナー特異的抗体を保有するのは移植前で 2 名、移植後でも 3 名と極めて少数であった。本コホートでは移植時に HLA-A、HLA-B、HLA-DR のタイピングしか行っておらず、特に本コホートで陽性率が高かった HLA-DQ 抗体についてはドナー特異的か非特異的かの判定が出来なかった。従って、HLA-DQ 抗体の中にはドナー特異的抗体が含まれていると考えられ、本研究ではドナー特異的抗体の operational tolerance への影響を過小評価している可能性がある。また、腎移植ではドナー非特異的抗 HLA 抗体も拒絶反応と関連があり生着予後の悪化を引き起こすという報告もあり、生体肝移植でも非特異的抗 HLA 抗体が rejection を引き起こし、operational tolerance に影響していると推測された。

従来の報告では急性拒絶反応があると operational tolerance が導入しにくいとされていたが、本研究では明らかではなかった。恐らく、本研究のコホートが小児であり、殆どの患者において基礎疾患が胆道閉鎖症であったことが、これまでの報告との結果の違いに影響していると考えられるが、患者数が少ないこともあり、今後、更に患者数を増やして検討する必要があると考えられた。

肝移植のみならず、腎移植など他の臓器移植でも、抗 HLA 抗体が陽性であるにも関わらず長期間にわたって拒絶反応を引き起こすことなく経過する症例があることが分かっている。抗 HLA 抗体の有無だけでなく、抗 HLA 抗体の免疫系における反応の強さ (MFI 値など) や他の自己抗体 (anti-angiotensin type 1 受容体抗体など) の存在、患者の年齢や性別など様々な因子が影響し合って最終的に拒絶反応を発症させると考えられており、特に腎移植後の患者を対象に研究が進められている。本研究でも腎移植と同様に、MFI 値は operational tolerance と関連していることが明らかになっており、腎移植の患者のみならず、肝移植後の患者でも自己抗体などの

影響についても検討する必要があると考えられる。

本研究では「HCV 感染等、移植後の免疫抑制剤の投与がウイルスの活動性を高め再発が問題となる症例では抗 HLA 抗体をモニターの上、免疫抑制剤を減量して再発を抑制できるか」という点については研究の対象者が小児中心であり、十分な検討が出来なかった。本研究成果を基に、今後、対象者を増やし、更に追跡期間を延ばして検討する予定である。

以上から、拒絶反応のリスクが低い症例では、移植前と移植後早期から抗 HLA 抗体が陰性である傾向が高いことが明らかとなった。また、拒絶反応のリスクが高い症例では、移植前と移植後早期から抗 HLA 抗体が陽性であり、抗体価も高い傾向にあることが分かった。移植前と移植後早期の抗 HLA 抗体が陰性、もしくは抗 HLA の抗体価が低い症例では、抗 HLA 抗体が陽性の症例に比較して、免疫抑制剤を減量・中止できる可能性が高かった。

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 1 件)

1. Waki K, Sugawara Y, Mizuta K, Taniguchi M, Ozawa M, Hirata M, Nozawa M, Kaneko J, Takahashi K, Kadowaki T, Terasaki PI, Kokudo N. Predicting operational tolerance in pediatric living-donor liver transplantation by absence of HLA antibodies. Transplantation. 2013 Jan 15;95(1):177-83.

[学会発表] (計 3 件)

1. American Transplant Congress 2012(Boston, USA. 2012.05) Kayo Waki, Yasuhiko Sugawara, Kouichi Mizuta, Masaru Hirata, Junichi Kaneko, Takashi Kadowaki, Taku Aoki, Kiyoshi Hasegawa, Norihiro Kokudo, Paul I. Terasaki Association of preformed anti-HLA antibody with operational tolerance in pediatric living-donor liver transplantation: a possible evidence of humoral sensitization (oral presentation)

2. 16th International HLA and Immunogenetics Workshop Kayo Waki, Yasuhiko Sugawara, Kouichi Mizuta, Masaru Hirata, Junichi Kaneko, Takashi Kadowaki, Taku Aoki, Kiyoshi Hasegawa, Norihiro Kokudo, Paul I. Terasaki Association of preformed anti-HLA antibody with operational tolerance in pediatric living-donor liver transplantation: a possible evidence of humoral

sensitization (oral presentation)

3. The Transplant Society 2012 (Berlin, Germany) Kayo Waki, Yasuhiko Sugawara, Kouichi Mizuta, Masaru Hirata, Takashi Kadowaki, Masumi Nozawa, Norihiro Kokudo, Paul I. Terasaki: Association of preformed anti-HLA antibody with operational tolerance in pediatric living-donor liver transplantation: a possible evidence of humoral sensitization (oral presentation)
〔図書〕 (計 1 件)

Waki K, Sugawara Y, Mizuta K, Fujita H, Kadowaki T, Kokudo N. Living-donor liver transplantation at the University of Tokyo, 1996-2011: the impact of HLA matching and a positive crossmatch on long-term survival and tolerance. Clin Transpl. 2011:223-35.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

脇 嘉代 (WAKI KAYO)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70505891