

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791371

研究課題名(和文) 免疫順応を誘導する、HLA - class II 分子結合タンパク質の同定・機能解析

研究課題名(英文) The identification of HLA class II DR associated molecules contributing to Accommodation

研究代表者

岩崎 研太 (IWASAKI, KENTA)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座講師

研究者番号：10508881

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)：抗A/B抗体存在下では、IFN γ 存在下において補体制御因子などの発現増加に加え、HLA class II DR 発現誘導の抑制がみられ、結果的に内皮細胞活性化に伴うDSA産生抑制、またDSAによる慢性抗体関連型拒絶反応の進展を阻害しうると考えられた。ABO不適合移植では、移植直後の補体・凝固活性化を制御すれば、維持期の抗A/B抗体接着はグラフト生着に有利に作用する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Expression of HLA-DR on endothelial cells was elicited by IFN γ treatment. HLA class I expression was also increased about 4-5 fold. When treated with IFN γ , anti-HLA class I and DR antibody binding to endothelial cells did not show any cytoprotective effect against complement-mediated cytotoxicity (CDC) and activated AKT signal, while pre-incubation with anti-A antibody have resistance to CDC. Anti-HLA class II DR IgG antibody purified from patient sera decreased CD59 expression.

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：免疫順応 シグナル伝達 抗体関連型拒絶反応

1. 研究開始当初の背景

国民医療費が30兆円を超え、国民所得の約10%を占めるまでに至っている現在、腎臓移植を推し進め、30万人を超える透析患者による医療費を削減することは日本における医療体制において重要となる。良質な薬剤を背景にした腎移植の成績は、5年生着率が90%を超えるにいたった。しかし、それでもドナー不足は深刻な状況である。そのため移植臓器に対する抗体が存在しても移植が行われている。現在その成功率は低くは無いもののやはり抗体関連型の拒絶反応を引き起こす例が多く存在する。一方で、移植臓器に対する抗体が存在し、補体の活性化が見られるにもかかわらず移植臓器が機能を維持している状態、Accommodation (免疫順応) が確認されている。しかし、いまだその本質はつかめていない。移植では、グラフト内皮細胞に発現するドナーHLAに対する抗体が、急性・慢性拒絶反応においては主たる原因であると考えられている。

免疫順応 (Accommodation) とは「移植臓器に対する抗体が存在するにもかかわらず、移植臓器が傷害を受けない状態」と定義される。これまで、異種移植、ABO血液型不適合移植で免疫順応が報告されてきた。一方HLAに対する抗体存在下での移植は、ABO不適合移植に比べると予後不良になる確率が高い。そのため、免疫順応は長期予後を規定するキーファクターであると考えられる。しかし現段階ではその本質をつかむまでには至っていない。そこで最近では免疫順応を理解するために、抗体接着が引き金となる内皮細胞の変化を、分子生物学的手法によって、正確に理解する試みがなされつつある。

急性・慢性拒絶反応の主たる原因の一つは免疫反応により産生されたドナーHLAに対する抗体であり、グラフト血管内皮細胞に発現するHLAとの抗原抗体反応によりグ

ラフト傷害を引き起こす。HLA class IIはそのサブユニットの構成からHLA-DR, -DP, -DQの3つに分けられる。私どもは腎移植における慢性拒絶反応ではHLA-DRが最も悪影響を与えると報告した。現在、その理由を解明するには至っていない。

HLA抗体の中には、グラフト内での抗原抗体反応後の障害が軽減出来るものがある。HLA class I抗体接着が引き起こす影響については、UCLAのElaine F. Reedらがその最先端をゆく。HLA class I抗体接着により、内皮細胞を活性化するMEK/ERK経路ではなく、細胞保護に必要なPI3K/AKT経路が活性化されることが、免疫順応獲得に必須であるというのが彼女らの主張である。われわれもほぼ同様の研究結果を得ており、HLA class I抗体接着により、細胞保護遺伝子であるferritinやHO-1が、転写因子Nrf2によってPI3K/AKT経路に依存して活性化することを示した。

一方、ABO不適合移植で見出される抗原抗体接着が引き起こす内皮細胞での研究は、AB糖鎖発現株の不在から世界でも研究が立ち遅れていたが、私どもが糖鎖発現株を樹立し詳細な研究を行う事で、ABO-、HLA-不適合移植における相違点を見出すことに成功した。そこでは免疫順応の一端がAB糖鎖に対する抗体接着によるERKの不活性化と、それに伴う補体制御因子の誘導であると明らかにした。

これまでのHLA class I/ABOに関する研究を更に進展させるには、現在慢性拒絶反応の主な原因と考えられている、HLA class II抗体による、内皮細胞への影響を考える必要がある。本研究では、従来では困難であったHLA class IIを内皮細胞で誘導し、HLA class II抗体接着後の内皮細胞の応答を明らかにすることを目指す。そこから得られる知見は、新たなバイオマーカーの獲得・新規治療薬への応用と多岐に渡ると考

えられる。抗原抗体反応による拒絶反応を克服できれば、現在も行われている抗ドナー抗体陽性移植をより普及させ、抗体存在下での急性・慢性拒絶反応の制御も可能となると考える。また、研究対象が HLA class II 分子であることを踏まえれば、移植医療を飛躍的に発展させ、右肩上がりの国民医療費を削減するのみならず、自己免疫疾患やアレルギーといった分野への波及効果も大きい。

本研究では、HLA 抗体の中でも特に、HLA class II 抗体接着が引き起こす、内皮細胞内でのシグナル伝達・遺伝子発現を分子生物学的手法で解析し、免疫順応を分子レベルで明らかにすることを旨とする。

2. 研究の目的

これまでの HLA class I/ABO に関する研究を更に進展させるには、現在慢性拒絶反応の主な原因と考えられている、HLA class II 抗体による、内皮細胞への影響を考える必要がある。本研究では、従来では困難であった HLA class II を内皮細胞で誘導し、HLA class II 抗体接着後の内皮細胞の応答を明らかにすることを旨とする。そこから得られる知見は、新たなバイオマーカーの獲得・新規治療薬への応用と多岐に渡ると考えられる。抗原抗体反応による拒絶反応を克服できれば、現在も行われている抗ドナー抗体陽性移植をより普及させ、抗体存在下での急性・慢性拒絶反応の制御も可能となると考える。また、研究対象が HLA class II 分子であることを踏まえれば、移植医療を飛躍的に発展させ、右肩上がりの国民医療費を削減するのみならず、自己免疫疾患やアレルギーといった分野への波及効果も大きい。

ABO 糖鎖や HLA class I に結合するタンパク質の同定・細胞内イベントが、抗体接着による影響に対する知見を深めてきた事実が存在し、さらに細胞種が異なれば結合

タンパク質も異なることも報告されている。つまり HLA class II 研究が最も進んでいる抗原提示細胞やがん細胞での機能とは異なることが十分考えられる。

抗体と相互作用した後引き起こされるシグナル伝達が解明できれば、実際の治療戦略を考えることができる。本研究では、HLA class II に相互作用するタンパク質同定・シグナル伝達解析・遺伝子発現を網羅的な解析を第一とし、抗原が異なる抗体接着による一連の反応を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では HLA class II の血管内皮細胞株での発現を目指し、HLA class II 抗原と相互作用している細胞膜上のタンパク質の同定・機能を明らかとする。HLA class II 抗体接着が引き起こすシグナル伝達が、内皮細胞に与える影響に着目する。内皮細胞活性化を引き起こす MAPK 経路、細胞保護を誘導する PI3K/AKT 経路、細胞のエネルギーセンサーである AMPK、細胞増殖に深く関わる mTOR に特に注目し、これまで報告してきた HLA class I/ABO 抗体接着との比較を行う。そしてその下流にある転写因子、またはターゲットとなる遺伝子の調節メカニズムを検討する。さらにこれらの差異を生み出すと考えられた因子を、内皮細胞に導入・抹消することにより、抗原抗体反応後における遺伝子発現さらには免疫応答を観察する。

4. 研究成果

IFN γ 刺激内皮細胞への抗 HLA class II DR 抗体接着により、内皮細胞活性化に関与する ERK の活性化を認めた。細胞保護遺伝子は誘導されず、CD59 が抑制された。抗 A/B 抗体接着状態では、抗 HLA 抗体による細胞障害が軽減されており、CD55/59 の発現上昇とともに、IFN γ による HLA の発現が抑制されていた。

抗 A/B 抗体存在下では、IFN γ 存在下において補体制御因子などの発現増加に加え、HLA class II DR 発現誘導の抑制がみられ、結果的に内皮細胞活性化に伴う DSA 産生抑制、また DSA による慢性抗体関連型拒絶反応の進展を阻害しうると考えられた。新たな免疫順応誘導遺伝子として、細胞内エネルギーセンサーである AMPK に着目し、この分子の活性化により、抗体関連型の細胞傷害を軽減でき、さらにそのメカニズムの一端が AMPK-Nrf2 のコミュニケーションであることを証明した。ABO 不適合移植では、移植直後の補体・凝固活性化を制御すれば、維持期の抗 A/B 抗体接着はグラフト生着に有利に作用する可能性がある。

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 6 件すべて査読あり)

1. Influence of olive-derived hydroxytyrosol on the toll-like receptor 4-dependent inflammatory response of mouse peritoneal macrophages.
Takeda Y, Bui VN, Iwasaki K, Kobayashi T, Ogawa H, Imai K. (6人中3番目)
Biochem Biophys Res Commun. 2014 Apr 18;446(4):1225-30
2. Comparative analysis of drug action on B-cell proliferation and differentiation for mycophenolic acid, everolimus, and prednisolone.
Haneda M, Owaki M, Kuzuya T, Iwasaki K, Miwa Y, Kobayashi T. (6人中4番目) **Transplantation.** 2014 Feb. 27;97(4):405-12
3. AMP-activated protein kinase as a promoting factor, but complement and thrombin as limiting factors

for acquisition of cytoprotection: implications for induction of accommodation

Iwasaki K, et al., (7人中1番目)
Transplant International 2013 Nov;26(11):1138-48

4. Role of AMP-Activated Protein Kinase in Ferritin H Gene Expression by Resveratrol in Human T Cells
Iwasaki K, et al., (6人中1番目)
Biochemistry 2013 Jul 30;52(30):5075-83
5. Transcriptional regulation of the human ferritin gene by coordinated regulation of Nrf2 and protein arginine methyltransferase PRMT1 and PRMT4
Huang BW, Ray PD, Iwasaki K, Tsuji Y. (4人中3番目) **FASEB J.** 2013 Sep;27(9):3763-74
6. Phosphorylation of 4E-BP1 predicts sensitivity to everolimus in gastric cancer cells
Nishi T, Iwasaki K, et al., (10人中2番目) **Cancer Lett.** 2013 May 1;331(2):220-9.

[学会発表](計 4 件)

1. 第 12 回国際異種移植学会(大阪・大阪国際会議場)
Kenta IWASAKI, Jing PING, Yuko MIWA, Masataka HANEDA, Akira ONISHI, Haruko OGAWA, Fumiaki NAKASHIMA, Takaaki KOBAYASHI
Implication of complement regulatory proteins and AMP-regulated kinase for graft accommodation
2013.11.10
2. 第 21 回組織適合性学会(福島・コラッセ福島)
岩崎研太、荊萍、中島文明、三輪祐子、羽根田正隆、小林孝彰
抗 HLA-DR 抗体は補体制御因子の発現を減少させ、補体障害を増強させる

2013.9.14

3. 第 49 回移植学会（京都・京都国際会議場）

岩崎研太、稲永由紀子、中島文明、三輪祐子、羽根田正隆、渡井至彦、片山昭男、打田和治、小林孝彰

シグナル伝達と移植：抗体関連型拒絶反応の克服をめざして

2013.9.5

4. 2013 アメリカ移植学会（シアトル・シアトルコンベンショナルセンター）

Kenta IWASAKI, Jing PING, Takayuki YAMAMOTO, Yuko MIWA, Masataka HANEDA, Yoshihiko WATARAI, Akio KATAYAMA, Kazuharu UCHIDA and Takaaki KOBAYASHI
Analysis of miRNAs in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Potential value of miR-182 as a biomarker of chronic antibody mediated rejection.

2013.5.20

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし