

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791377

研究課題名(和文)HLA特異的IgM抗体価による新しい肺移植後免疫学的モニタリングの検討

研究課題名(英文)Immunological monitoring after lung transplantation by measurement of serum human leukocyte antigen specific IgM

研究代表者

三好 健太郎(Miyoshi, Kentaroh)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：50534773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではHLAに対するIgM抗体価が肺移植後拒絶反応の活動性の指標となるかを検討した。まず任意の被験者の血清を利用してFlow PRA法による患者血清中のIgM価測定法を確立した。次に肺移植患者の血清について急性拒絶反応発症時と非発症時の測定値に差があり拒絶反応に伴う上昇を認めることを確認した。さらに一般胸部外科手術後患者の血清を利用し、HLA-IgM価が手術侵襲にて非特異的に変動する可能性はあるが、肺移植後と比較すると上昇は軽微である可能性が示唆された。以上よりHLA-IgMモニタリングが肺移植後拒絶反応の発症予測、免疫抑制剤投与量の決定に役立つ特異的マーカーとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to examine that HLA-specific IgM in lung transplant recipient's sera can be a reasonable marker for immunological activity of acute rejection. As a methodology for HLA-IgM detection, the Flow PRA method was employed and reasonable detectability was confirmed. HLA-IgM value at the time of development of acute rejection was significantly higher than that of immunologically stable condition. Furthermore, the serum HLA-IgM value was unaffected by nonspecific inflammatory response caused by acute stress of common thoracic surgery. This study indicates that monitoring HLA-IgM can contribute to predicting the development of acute lung transplant rejection and determining optimal immunosuppressive management.

研究分野：移植免疫

キーワード：急性拒絶反応 肺移植 液性免疫 細胞性免疫 モニタリング

1. 研究開始当初の背景

臓器移植術後の周術期管理に共通する大きな問題として拒絶反応の制御と、免疫抑制下における感染のリスク管理の両立が挙げられる。肺は気道を介して外気に直接暴露されており、リンパ組織が非常に発達した臓器である。このような臓器特性が理由で、特に肺移植後においては他臓器と比して拒絶反応、感染症発症のいずれのリスクも高いとされており、周術期管理に難渋することが少なくない。実際、最新の国際心肺移植学会の registry report によると、肺移植後患者の 35% が移植後 1 年以内に急性拒絶反応を発症し、また移植後急性期から亜急性期の主な死因が感染症 (30 日以内死亡の 20.1%、30 日-1 年死亡の 35.3%) と報告されている。一般的に肺移植では拒絶反応制御のために他臓器と比して強い免疫抑制状態において管理されることが感染のリスクをさらに助長していると考えられるが、潜在的な過免疫抑制状態を回避することでこのリスクを軽減することができる可能性がある。現在のところ臓器移植後の免疫抑制制御は、カルシニューリン阻害薬の血中濃度モニタリング (therapeutic drug monitoring; TDM) のみを頼りに行われているのが現状である。一方で、グラフトに対する免疫学的活動性は、個体間、移植後の時期により変化する。従って免疫抑制剤の至適 AUC、投与量も個体間、移植後時期により異なる。移植後グラフトに対する免疫学的活動性に応じた免疫抑制剤の目標血中濃度、AUC を設定していくのが理想であるが、現状では免疫学的活動性を非侵襲的に評価する方法は実用化されていない。

2. 研究の目的

肺移植において移植後急性期から亜急性期におけるレシピエントのグラフトに対する免疫学的活動性を評価する新しい方法として、HLA 特異的 IgM 抗体価のモニタリングの妥当性を検討し、同方法により免疫抑制剤の至適投与量を決定し、潜在的な過免疫抑制を回避し免疫抑制剤の安全な減量が可能かを評価する。本研究では、細胞性免疫反応の派生産物としての HLA 特異的 IgM の意義に着目し、移植後のグラフトに対する特異的な免疫学的パラメータとしての臨床応用性について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) まず Flow PRA 法による患者血清中の HLA-IgM の検出が可能か確認し、測定法の確立を行う。Flow PRA (One Lambda) HLA class I および II パネルビーズとコントロールビーズを使用する。これらを患者血清と混合してインキュベートした後、抗ヒト IgM FITC 標識抗体をもちいてビーズ上の HLA-IgM 抗体を同定する。このサン

プルを Flowcytometer にて解析し、HLA パネルビーズの染色の平均蛍光強度を測定する。コントロールビーズをもちいることでバックグラウンドの非特異的 IgM 結合を評価して、これを差し引きして IgM 価とする。Autoantibody を有する任意の被験者の血液サンプル (10 検体) を利用して HLA 特異的 IgM を測定し、この方法の妥当性を検証する。

(2) 臨床肺移植患者を対象とし、Flow PRA-IgM 法にて移植後 HLA 特異的 IgM 価を測定する。気管支鏡所見および画像所見で急性拒絶反応と診断された症例と拒絶非発症例について、移植後 14 日間の連続的な HLA 特異的 IgM 抗体価の推移を評価し、拒絶反応に一致して同抗体価が上昇していることを確認する。急性拒絶反応の臨床的診断基準は以下のように設定する。

炎症マーカーの上昇
動脈血酸素分圧の低下
高分解能 CT による小葉中心から拡大するすりガラス影の出現
CT での胸水増加所見

(3) HLA 特異的 IgM 価が手術侵襲や感染など拒絶以外の自然免疫不活化因子に影響を受けないことを確認する。開胸での肺葉切除以上の手術侵襲のある手術を受けた患者 10 名 (男女 5 名ずつ) について術前および術後 2 週間の Flow PRA-IgM 法による IgM 価測定を行う。C reactive protein、procalcitonin 値を同時にモニターし、HLA 特異的 IgM 価と相関がないことを確認する。また肺移植拒絶非発症例においてもこれらのパラメータと相関がないことを確認する。

4. 研究成果

(1) Flow PRA (One Lambda) HLA class I, II パネルビーズおよびコントロールビーズと血清をインキュベートしたのち、抗ヒト IgM-FITC 抗体を用いてラベルして Flow cytometry を行う。これにより HLA パネルビーズの染色の平均蛍光強度を測定する。コントロールビーズをもちいることでバックグラウンドの非特異的 IgM 結合を評価して、これを差し引きして IgM 価とする。以上の手法で血清中の HLA IgM 抗体価を測定することが可能であった。

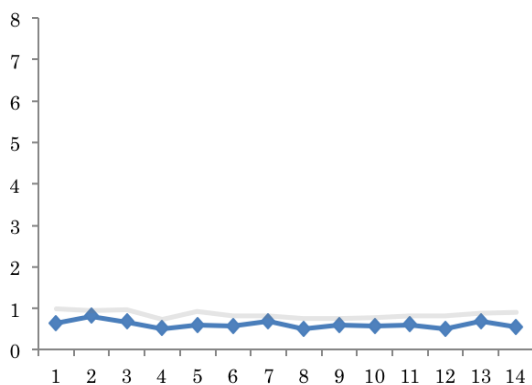
(2) 臨床脳死肺移植患者の移植後急性期 14 日間の血液検体について 25 症例のサンプル回収および臨床情報 (炎症マーカー、免疫抑制剤濃度推移、腎機能値、併発する感染症 status) についてデータベースの作成を行った。うち急性拒絶反応を同期中に発症した 10 例について抗 HLA-IgM 価の Base line 値からの上昇を認めている。一方急性拒絶反応非発症 15 例においても拒絶発症例で認めた

レベルの上昇は認めないものの、変動を認めており、免疫学的活動性に依りて抗HLA-IgM 価が日々変動している可能性が示唆された。

肺移植後 HLA-IgM 価推移

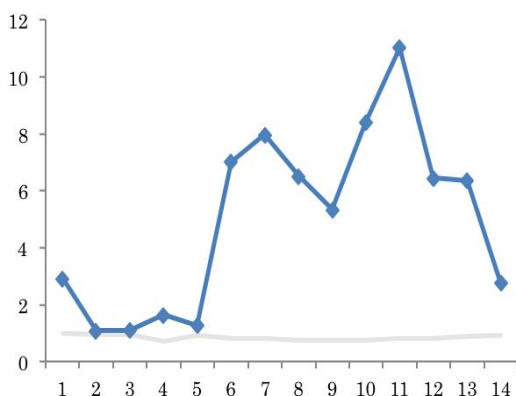
非拒絶反応症例

19y F IPAH



拒絶反応症例

53y F IPF



(3)コントロール群として設定した開胸肺切除を行った患者5名について術後急性期の血液サンプルを採取し、同様に抗HLA-IgM 価測定を行ったところ、変動幅は肺移植後と比較して小さく、術後の炎症マーカーなどの推移と相関していなかった。手術侵襲などの自然免疫系の賦活がHLA-IgM 価に与える影響が小さい可能性が示唆された。

以上の結果から Flow PRA 法により HLA-IgM 価の測定が可能であり、術後の HLA-IgM 価が臓器移植による獲得免疫反応

に特異的な活動性の指標となる可能性が示唆された。さらに統計学的解析に耐えうるよう症例蓄積中である。また症例およびサンプル集積速度の問題で研究期間中の着手が困難であったが、タクロリムス (TAC) 使用、7 日目までに目標トラフ値 10-12ng/mL に達した症例、7 日目までに急性拒絶反応を発症しなかった肺移植症例を対象とし、HLA-IgM を用いた免疫学的モニタリング下にてタクロリムス製剤の積極的減量法の前向き検討を継続、論文作成を実施していく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

(1)三好健太郎, 大藤剛宏, 杉本誠一郎, 山根正修, 三好新一郎. 肺移植後 Posterior leukoencephalopathy syndrome 発症例におけるタクロリムス徐放剤による免疫抑制管理. 第 29 回日本呼吸器外科学会総会 (2012 年 5 月 17-18 日, 秋田)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

三好健太郎 (MIYOSHI Kentaroh)

岡山大学病院・呼吸器外科・助教

研究者番号: 50534773

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：