

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293335

研究課題名(和文)腎移植における慢性抗体関連型拒絶反応制御のための総合的戦略

研究課題名(英文)Comprehensive study on control of chronic antibody-mediated rejection after renal transplantation

研究代表者

小林 孝彰(KOBAYASHI, Takaaki)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70314010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性抗体関連型拒絶反応(CAMR)は、移植腎長期生着の障壁となっている。ドナー特異的HLA抗体(DSA)検出時の腎生検所見で約4割にsubclinical CAMRを認め、治療に抵抗性であった。DSAのC1q(補体)結合能とCAMRの関連を示した。末梢血PBMCのmiR-142-5p, miR-486-5pは抗体産生、CAMRと関連した。末梢血B細胞培養でHLA抗体検出に成功した。抗A/B抗体、mTOR阻害剤、AMPK活性化剤には、内皮細胞保護効果が認められた。CAMRを制御するためには、DSA産生に向かう段階での早期診断が不可欠であり、従来とは異なる革新的な治療方法を開発する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Donor specific HLA antibody (DSA)-induced chronic antibody-mediated rejection (CAMR) is an obstacle to long-term graft survival. Approximately 40% of renal transplant recipient with de novo DSA without graft dysfunction demonstrated biopsy-proven subclinical CAMR, and failed to respond to anti-rejection therapy such as anti-CD20 monoclonal antibody and double filtration plasmapheresis. miR-142-5p and miR-486-5p in peripheral blood mononuclear cells were associated with DSA production and CAMR, respectively. DSA with high complement binding ability showed high risk of CAMR. Anti-A/B antibody, mTOR inhibitor and AMPK activator had protective function against HLA antibody-induced, complement-dependent cytotoxicity. Action at an early stage when immune response starts to move towards DSA production would be essential to control CAMR after kidney transplantation. Furthermore, development of innovative anti-CAMR therapy is necessary.

研究分野：移植外科 移植免疫

キーワード：移植・再生医療 腎移植 慢性抗体関連型拒絶反応 免疫学 マイクロアレイ シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎移植では、免疫抑制療法の進歩、高精度 HLA 関連検査の開発などにより、短期成績が向上した (5 年生着率 92%、2010 年統計) が、長期成績の改善が課題となっている。機能廃絶に陥る原因の多くが慢性抗体関連型拒絶反応であり、ドナー(グラフト)HLA に対する抗体によって引き起こされる。今のところ有効な治療法は開発されていない。

(2) 移植後、一定の免疫抑制療法を実施しても、HLA 抗体を産生する症例と産生しない症例があり、HLA 抗体が産生されても、グラフト機能傷害を引き起こす症例と引き起こさない症例がある。レシピエントの免疫反応だけでなく、グラフト抗体接着後の反応性を解析する必要がある。

(3) 抗体反応を制御するために、世界の研究は T 細胞から B 細胞にシフトし、B 細胞制御に重点が置かれている。In vitro 分化培養システムを確立すれば、B 細胞から形質細胞までの各段階での免疫抑制剤の作用、抗体産生能抑制の評価、さらには早期診断が可能となる。

(4) 炎症、感染などによるグラフト内皮細胞の活性化、向凝固・向炎症状態が拒絶反応に向かう因子として知られ、Graft Accommodation (免疫順応: 抗体が接着してもグラフトが傷害を受けない状態)を誘導することができれば、抗体接着後の拒絶反応を制御できる。

(5) 私どもは、血液型 ABO 不適合移植、ドナー特異的 HLA 抗体陽性移植、ブタ臓器を用いた異種移植による抗体関連型拒絶反応の制御を目指した研究の実績がある。A/B 糖鎖抗原の切断、制御性 T 細胞、FoxP3 mRNA 発現解析、慢性拒絶反応と HLA-DR 抗体の関連、内皮細胞を用いたシグナル伝達、補体制御因子、細胞保護因子の解析、凝固・炎症を制御するトロンボモジュリンの機能解析、遺伝子導入 (ノックアウト) クローンブタ作出などの蓄積された知識・技術を総動員して効率的な研究を推進する準備はできている。

2. 研究の目的

(1) グラフト長期生着は、腎移植医療の重要課題である。その妨げとなっている慢性抗体関連型拒絶反応は、移植後に産生される抗ドナーHLA 抗体がグラフトに接着して補体、凝固、炎症反応、内皮細胞の活性化により引き起こされる。有効な早期診断、治療法の開発は喫緊の課題である。

(2) 抗体接着後グラフト傷害を引き起こさない Graft Accommodation (免疫順応) を獲得すれば、拒絶反応に抵抗することも可能である。

(3) 臨床に直結する情報として、抗体産生

を引き起こさない B 細胞ターゲットとした免疫抑制療法の個別化、抗体産生にシフトした状態を早期診断 (HLA 抗体を産生する前に診断)・治療強化、抗体産生後の Accommodation 誘導処置、グラフト機能傷害発症後の有効な処置等、段階的な治療戦略についての知見を提供する。

(4) 本研究では、慢性拒絶反応の制圧をめざし、HLA 抗体産生の機序、Graft Accommodation 獲得機序を解明し、それらに影響を与える様々な誘導因子を同定し、クローンブタを用いた抗体関連型拒絶反応モデルにて検証するとともに、臨床応用可能な制御方法を開発する。また、本研究で得られた成果は、免疫抑制療法の最小化 (minimization) と適正化につながる。

3. 研究の方法

研究の効率的な遂行のために、3つのプロジェクトに分けてアプローチする。

(1) レシピエント側の OMICS 解析 (プロテオミクス、トランスクリプトミクス、microRNA プロファイリング) であり、de novo HLA 抗体産生、慢性拒絶反応に関わる Biomarker 探索を腎移植後患者の末梢血を用いて行い、診断、治療に応用する。さらに末梢血メモリー B 細胞を用いた in vitro 分化誘導システムを開発し、HLA 抗体産生を制御する効果的な薬物療法、抗体産生状態の正確な把握を試みる。

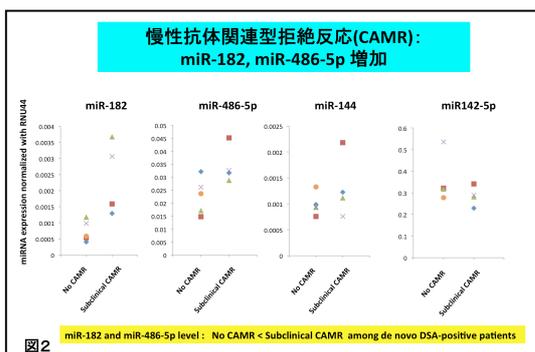
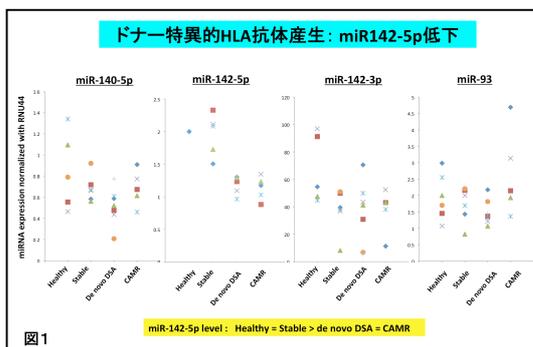
(2) グラフト側の Accommodation 解析であり、培養内皮細胞、腎生検組織を用い、補体、凝固、炎症のクロストークによる内皮細胞のシグナル伝達ネットワーク解析を行い、抗原抗体反応の引き金となる HLA クラス 2 抗原発現を制御する方法を探る。

(3) クローンブタを用いた抗体関連型拒絶反応モデルを開発し、OMICS・シグナル伝達解析から得られたリンパ球感作後の抗体産生、向凝固活性制御と Accommodation 誘導法をブタモデルで検証し、抗体関連型拒絶反応の効率的かつ総合的な制御方法を開発する。

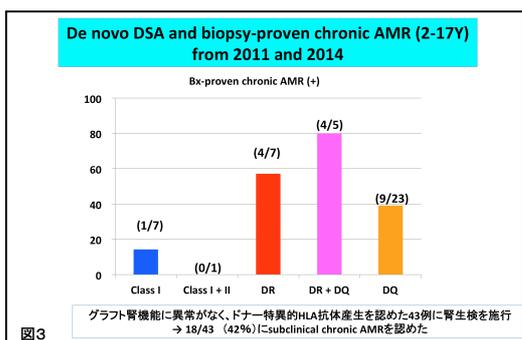
4. 研究成果

(1) HLA 抗体産生制御のための抗体産生メカニズム解明と予防、早期診断のため末梢血 PBMC、血清中の miRNA マイクロアレイ解析を実施し、別の集団の検体で real time RT-PCR により検証作業をおこなった。ドナー特異的 HLA 抗体産生には、PBMC miR-142-5p の減少が関わり (図 1)、その次のステップとしての慢性抗体関連型拒絶反応の進展には、miR-182, miR-486-5p の増加 (図 2) とそのターゲットとなる PTEN/foxo3 mRNA の減少が関連していることが示唆された。血清中の miRNA については、マイクロアレイ解析から miR-550a-3p, mir-155-5p, miR-451a, miR-2110 などが候補にあがり、検証作業によ

り慢性拒絶反応では miR-142-3p、miR-1913、miR-374-5p が増加している傾向がみられた。最終的な結論を得るためにはさらなる解析が必要となる。



(2) 移植腎機能障害を認めずに、de novo HLA 抗体を検出した 43 例の腎生検の結果、約 4 割に病理レベルでの早期の慢性抗体関連型拒絶反応を認めた。Class II とくに DR, DR+DQ 抗体が慢性拒絶反応を引き起こしやすい傾向にあった (図 3)。免疫抑制増量、二重濾過血漿交換、リツキシマブなどの治療に反応する症例は少なかった (約 1 割)。抗体産生を認めてからでは有効な治療法が少なく、もっと早期の診断、治療が必要であろう。



(3) DSA 陽性血清の解析により、新規に産生される HLA Class II 抗体が予後不良であることを明らかにし、C1q アッセイでの新しい補体結合能の判定法として Estimated DSA MFI Values at 1,000 C1q MFI を提唱した。補体結合能の高い抗体 (低い Estimated DSA MFI level, 6000 以下) は、全例(6/6)慢性抗体関連型拒絶反応を引き起こした (図 4)。他の報告と同様 C1q level と拒絶反応の関連を認めなかったが、この方法により慢性拒絶反応

の予測が可能となるかもしれない。

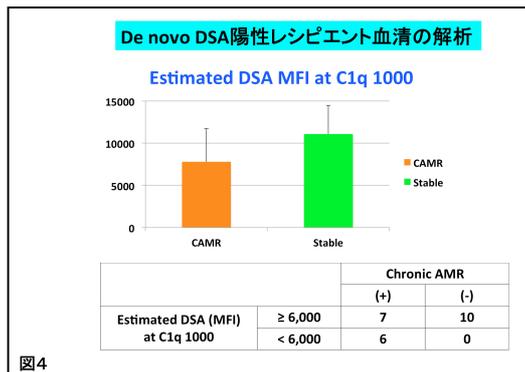


図4

(4) B 細胞培養法として、末梢血 B 細胞 (とくに Naïve) から long-lived plasma cell へ分化誘導する系として APRIL 添加の重要性を報告した。また、Memory B 細胞からは、HLA 抗体の B cell culture medium に、CpGODN, IL-21, CD40L, APRIL Mitogen-induced T cell supernatant を加えることにより、一部の B 細胞において血清中と同じ特異性の HLA 抗体を培養上清中で検出できた (図 5)。従来の分離 CD19 陽性細胞ではなく、より簡便な方法で、効率的に HLA 抗体を検出できるように、PBMC を用い IL-2/R-848 で刺激する系での培養上清中 HLA 抗体検出を試みている。

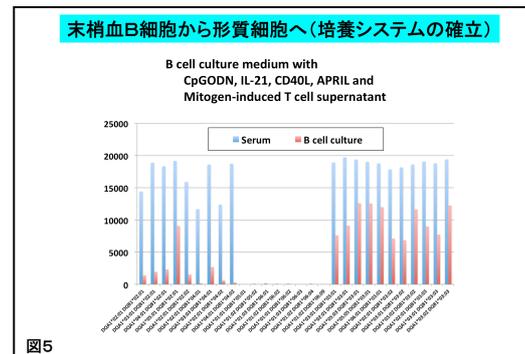


図5

(5) 血液型 A/B 抗原発現培養内皮細胞を用いて、グラフト accommodation 獲得を促進するメカニズムを、抗原発現レベル、補体依存性細胞傷害の変化、シグナル伝達ネットワークから解析した。ERK 抑制による補体制御因子の増加、IFN γ 誘導 HLA class I, II 発現の低下を認めた。また、薬剤投与による影響を調べた結果、mTOR 阻害剤では、IFN γ 誘導 class II 発現増強を抑制し、補体依存性細胞傷害を軽減した。AMPK 活性化薬剤、スタチンにも Accommodation 誘導作用が確認された。

(6) 抗体関連型拒絶反応を確認できた 2 系統の Duroc ブタの保存 fibroblast を用いた核移植を実施しているが、クローンブタ作出には成功していない。ブタの脂肪由来間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell (MSC) を用いた免疫調節作用に着目し、T 細胞活性化を抑制する場合と促進する場合の二面性を有することが明らかになった。ブタの MSC は、ヒ

トのT細胞を抑制し、ヒトのMSCは、ヒトおよびブタのT細胞を抑制するが、ブタのMSCはブタのT細胞の活性化を促進した。そのメカニズムとしてブタMSCがIFN- γ による活性化を受け、クラス2の発現を増加していることが示唆された。これはブタのT細胞が分泌するブタINF γ のみがブタMSCを活性化し、SLAクラス1, 2の発現を増強することが、MSCが持つ抑制作用ではなく活性化に作用する原因かもしれない。

(7) 慢性抗体関連型拒絶反応を制御するためには、末梢血でのde novo HLA抗体が産生されてからでは遅く、抗体産生に向かう段階での診断が不可欠であり、治療においても従来とは異なる革新的な方法を開発する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Iwasaki K, Yamamoto T, Inanaga Y, Hiramitsu T, Miwa Y, Haneda M, Narumi S, Watarai Y, Katayama A, Uchida K, Kobayashi T. MiR-142-5p, miR-182, and miR-486-5p as a biomarker for early detection of chronic antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Biomarker Insights*. 査読有 accepted
- ② Kushihara H, Kuzuya T, Miwa Y, Iwasaki K, Haneda M, Watarai Y, Uchida K, Yamada K, Kobayashi T. Changes in ABCB1 mRNA expression in peripheral blood cells before and after renal transplantation. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 査読有 accepted
- ③ Yamamoto T, Watarai Y, Takeda A, Tsujita M, Hiramitsu T, Goto N, Narumi S, Katayama A, Morozumi K, Uchida K, Kobayashi T. De novo anti-HLA DSA characteristics and subclinical antibody-mediated kidney allograft injury. *Transplantation* 査読有 2015 Dec 4. [Epub ahead of print] PMID: 26636737
- ④ Kurata Y, Kuzuya T, Miwa Y, Iwasaki K, Haneda M, Amioka K, Yamada K, Watarai Y, Katayama A, Uchida K, Kobayashi T. Clinical relevance of post-transplant pharmacodynamic analysis of cyclosporine in renal transplantation. *International Immunopharmacology*, 査読有、22、2014、384-391 DOI:10.1016/j.intimp.2014.07.022
- ⑤ Miwa Y, Yazaki S, Iwamoto M, Suzuki S, Iwasaki K, Haneda M, Yamamoto K, Maruyama S, Onishi A, Kobayashi T. Functional Difference between Membrane-Bound and Soluble Human Thrombomodulin. *Transplantation*, 査読有 99、2015、702-709 doi: 10.1097/TP.0000000000000571
- ⑥ Matsuda Y, Haneda M, Kadomatsu K, Kobayashi T. A proliferation-inducing ligand sustains the proliferation of human naive (CD27⁻) B cells and mediates their differentiation into long-lived plasma cells in vitro via transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor and B-cell mature antigen. *Cellular Immunology* 査読有、295、2015、127-136 doi: 10.1016/j.cellimm.2015.02.011
- ⑦ Haneda M, Owaki M, Kuzuya T, Iwasaki K, Miwa Y, Kobayashi T. Comparative Analysis of Drug Action on B Cell Proliferation and Differentiation for Mycophenolic Acid, Everolimus and Prednisolone. *Transplantation*, 査読有、97、2014、405-412 doi:10.1097/01.TP.0000441826.70687.f6.
- ⑧ Ashimine S, Watarai Y, Yamamoto T, Hiramitsu T, Tsujita M, Nanmoku K, Goto N, Takeda A, Katayama A, Uchida K, Kobayashi T. Neither pre-transplant rituximab nor splenectomy affects de novo HLA antibody production after renal transplantation. *Kidney International*, 査読有、85、2014、425-430. doi: 10.1038/ki.2013.291

[学会発表] (計 51 件)

- ① T. Kobayashi. ABO incompatibility and graft accommodation: Potential strategy to prevent acute/chronic antibody mediated rejection. ABO-I and anti-HLA hyperimmune patient, Pre-Meeting Symposia, 2015 IPITA-IXA-CTS Joint Congress. 2015/11/15-19 Melbourne (Australia).
- ② K. Iwasaki, Y. Inanaga, Y. Miwa, Masataka Haneda, Akira Onishi, Haruko Ogawa, Takaaki Kobayashi. Human Endothelial Cell Activation through ERK by Non-Gal Antibody 2015 IPITA-IXA-CTS Joint Congress 2015/11/15-19 Melbourne (Australia)
- ③ 岩崎研太、三輪祐子、羽根田正隆、小林孝彰. 翻訳後修飾による抗A/B抗体接着

- を介した内皮細胞上 IFN γ 誘導性 HLA class II DR の発現減少. 第 24 回日本組織適合性学会 2015/9/10-12 ホテルレイクビュー水戸 (茨城県水戸市)
- ④ 岩崎研太、北畑奈々、山本貴之、平光高久、三輪祐子、羽根田正隆、片山昭男、山上孝子、鳴海俊治、渡井至彦、武田朝美、堀見孔星、松岡裕、打田和治、小林孝彰. Tfh 依存性活性化 B 細胞をターゲットとした新しい免疫モニタリングの可能性. 第 51 回日本移植学会 2015/10/1-3 ホテル日航熊本 (熊本県熊本市)
- ⑤ 三輪祐子、山本貴之、岡田学、岩崎研太、渡井至彦、武田朝美、丸山彰一、小林孝彰. ABO 血液型不適合腎移植における抗 A/B 抗体価以外のリスク因子の総合解析: レシピエント抗 A/B IgG サブクラス、C1q、ドナー A/B 抗原発現量の評価. 第 51 回日本移植学会 2015/10/1-3 ホテル日航熊本 (熊本県熊本市)
- ⑥ 山本貴之、渡井至彦、武田朝美、黒木聖久、坂本慎太郎、二村健太、永井崇敬、岡田学、辻田誠、平光高久、後藤憲彦、鳴海俊治、小林孝彰. 腎移植後ドナー特異 HLA 抗体と慢性抗体関連型拒絶反応の関係～診断から治療まで～ 第 51 回日本移植学会 2015/10/1-3 ホテル日航熊本 (熊本県熊本市)
- ⑦ K. Horimi, T. Akaza, K. Kuroki, S. Sakamoto, Y. Matsuoka, Y. Watarai, S. Narumi, A. Katayama, K. Uchida, T. Kobayashi. Clinical Significance of Estimated DSA MFI Values at 1,000 C1q MFI for Differentiation Between Harmful and Harmless DSA. American Transplant Congress 2015. 2015/5/2-6 Philadelphia (PA USA)
- ⑧ M. Okada, K. Futamura, K. Itou, T. Yamamoto, T. Hiramitsu, M. Tsujita, N. Goto, S. Narumi, Y. Watarai, A. Katayama, K. Uchida, T. Kobayashi. Favorable Results of ABO Incompatible Renal Transplantation Without B Cell Targeted Therapy: Advantages and Disadvantages of Rituximab Pretreatment. American Transplant Congress 2015. 2015/5/2-6 Philadelphia (PA USA)
- ⑨ T. Yamamoto, Y. Watarai, A. Takeda, M. Okada, M. Tsujita, H. Takahisa, N. Goto, S. Narumi, T. Kobayashi. De Novo DSA Would Not Necessarily Cause Graft Rejection After Renal Transplantation: Characteristics of DSA Developing Biopsy-Proven Chronic Antibody-Mediated Rejection. American Transplant Congress 2015. 2015/5/2-6 Philadelphia (PA USA)
- ⑩ K. Iwasaki, J. Ping, Y. Miwa, M. Haneda, T. Kobayashi. ABO-Incompatible Transplantation Might Have the Potential to Reduce Anti-HLA Class II DR-Mediated CAMR. World Transplant Congress 2014 2014/7/26-31 San Francisco (CA USA)
- ⑪ 稲永由紀子、岩崎研太、安藤麻子、大西彰、丸山彰一、小林孝彰. ブタ脂肪由来間葉系幹細胞はブタ CD8+T 細胞増殖を増強する. 第 23 回日本組織適合性学会 2014/9/13-15 長崎大学良順会館 (長崎県長崎市)
- ⑫ 岩崎研太、三輪祐子、羽根田正隆、片山昭男、鳴海俊治、渡井至彦、武田朝美、小林孝彰. ABO 血液型不適合移植は Graft Accommodation を促進するか? 抗 HLA 抗体による慢性抗体関連型拒絶反応に与える影響. 第 50 回日本移植学会総会 2014/9/10-12 京王プラザ (東京都新宿区)
- ⑬ 山本貴之、渡井至彦、小林孝彰、武田朝美、黒木聖久、岡田学、辻田誠、平光高久、後藤憲彦、鳴海俊治、打田和治. 腎移植後慢性抗体関連型拒絶反応 (Subclinical) と de novo DSA の関係及び Subclinical CAMR に対する治療介入の試み. 第 50 回日本移植学会総会 2014/9/10-12 京王プラザ (東京都新宿区)
- ⑭ T. Yamamoto, Y. Watarai, K. Kuroki, S. Sakamoto, M. Hiramitsu, M. Tsujita, T. Hiramitsu, N. Goto, S. Narumi, K. Uchida, T. Kobayashi. HLA Specificity and Titer Rather Than Complement Fixing Ability of DSA Would Influence the Incidence of Chronic Antibody Mediated Rejection. World Transplant Congress 2014 2014/7/26-31 San Francisco (CA USA)

[図書] なし

[産業財産権] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 孝彰 (KOBAYASHI, Takaaki)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70314010

(2) 研究分担者

岩崎 研太 (IWASAKI, Kenta)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10508881

三輪 祐子 (MIWA, Yuko)
愛知医科大学・医学部・その他
研究者番号: 90572941

丸山 彰一 (MARUYAMA, Shoichi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10362253

大西 彰 (ONISHI, Akira)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：30414890

小川 晴子 (OGAWA, Haruko)
帯広畜産大学・学内共同利用施設等・教授
研究者番号：10400079

羽根田 政隆 (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
平成 27 年 4 月辞退

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

葛谷 孝文 (KUZUYA Takafumi)
松田 佳子 (MATSUDA Yoshiko)
山本 貴之 (YAMAMOTO Takayuki)
平光 高久 (HIRAMITSU Takahisa)
安次嶺 聡 (Ashimine Satoshi)
稲永 由紀子 (INANAGA Yukiko)
堀見 孔星 (HORIMI Kosei)
北畑 奈々 (KITAHATA Nana)
劉 大革 (LIU DaGe)
櫛原 秀之 (KUSHIHARA Hideyuki)
倉田 洋子 (KURATA Yoko)
岡田 学 (OKADA Manabu)
松岡 裕 (MATSUOKA Yutaka)