

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893119

研究課題名(和文) 補体制御因子CD46のT細胞関連型拒絶反応におけるメカニズムの解明と治療への応用

研究課題名(英文) The contribution of complement regulatory factor, CD46, during T cell mediated rejection in kidney allograft

研究代表者

角田 洋一 (Kakuta, Yoichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40710116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：腎移植後のTCMRにおいては第2経路によって補体カスケードが活性化し、補体制御因子が低下することによってさらに活性化され移植腎が障害されるということが判明した。また補体制御因子をさらに低下させることによってTCMRが促進し移植腎の生着率が低下した。Recombinantの補体制御因子の作成が困難であったため、補体制御因子を上昇させる実験は施行できなかったが、ヒト移植腎において補体制御因子の発現が高い移植腎は治療に対する反応性が良好で、生着率も良好であるという結果であった。これらの結果から補体制御因子または補体カスケードを制御することがTCMRの新たな治療手段となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The complement system plays a critical role in both innate and adaptive immune responses. We found locally produced complement component 3 (C3) from renal allografts and downregulation of complement regulatory factor(CRF) activated the complement system during acute cellular rejection in animal models. When anti-CRF antibody was injected, acute cellular rejection was promoted. Moreover, We demonstrated that CD46 expression in human renal tubular cells during acute cellular rejection may influence the outcome of treatment and graft survival. Grafts from older donors may be a risk factor for decreased expression of CD46 in renal tubular cells. The clinical application of complement regulatory protein including CD46 and complement regulatory drugs is considered to have some potential for suppressing acute cellular rejection after transplantation and to improve graft outcome.

研究分野：腎移植

キーワード：腎移植 拒絶反応 補体 補体制御因子

1. 研究開始当初の背景

補体とは免疫反応を触媒する血中タンパク質の一群で、C1~C9の補体タンパク質およびそのサブタイプが連鎖的に反応して免疫反応の一端を担っている。補体の代表的な作用として膜侵襲複合体形成による病原体の排除、抗原のオプソニン化、ケモタクティクスなどが挙げられる。さらには近年になって獲得免疫系にも補体が作用することが報告されており (Nat Med 2002; 8:582) 臓器移植の分野においても拒絶反応への関与が大きな注目を集めている。

腎移植の分野では、抗体関連型拒絶反応 (AMR) において補体カスケードが活性化されることが知られており、その際、傍尿細管毛細血管 (PTC) に沈着する C4d は AMR の診断基準の 1 つとして広く用いられている (Kidney Int 2012; 81: 628-639)。PTC における補体制御因子の発現が移植腎の予後に影響を与えることも報告された (Transplantation 2009; 88(4): 457-64)。また現在、C5 阻害薬である eculizumab の AMR 抑制効果に関する臨床試験が海外では行われている (Nat Rev Nephrol 2012; 8(11):670-8)。一方で、実臨床において最もよく経験する拒絶反応のタイプである T 細胞関連型拒絶反応 (TCMR) における補体の関与は十分に確認されていない。しかし、移植腎自体が C3 を産生し C3 の産生を抑えることで生着率が著明に延長することが動物実験で報告された (Nat Med 2002; 8:582)。またヒトにおいても C3 の拒絶反応への関与が報告されている (Gene 2012; 498(2): 254-8)。さらには C3 の下流にある C5a の受容体を阻害による生着率延長効果も報告されている (J Am Soc Nephrol 2010; 21: 1344-1353)。このような報告により、腎移植後拒絶反応における補体システムのメカニズムを解明し、補体をターゲットとした治療法を開発することが移植腎の予後を改善する有効な手段の 1 つとなる可能性が示唆され、注目を集めてきている。

補体制御因子とは補体カスケードが過度に働き過ぎないように調節する因子である。ヒトにおいては CD46、DAF、CR1、CD59 などが知られている。移植腎の尿細管における DAF の発現が上昇している症例においては、移植腎の機能が良好であり生着率が長いことが報告されており (Transplantation 2009; 88: 457-464)、補体制御因子の発現が移植腎の予後を予測する因子と成り得る可能性が示唆されている。さらには免疫学的にハイリスクと考えられている既存抗体陽性の腎移植モデルにおいて、補体を抑制することによって免疫学的順応が誘導され、その移植腎において

CD46、CD59 が高発現していたことが報告されている (Am J Transplant 2011; 11: 2057-2066)。補体制御因子は補体および獲得免疫系による移植腎のダメージを軽減し予後を改善し得る可能性があり、将来的に有効な治療手段になり得ると考えられる。

CD46 は C3b と C4b を分解し強力な補体制御能力を有している。正常ヒト細胞上では決して C3b は沈着せず補体による細胞傷害反応が生じないが、この理由の 1 つとして CD46 が C3b を直ちに不活化し C3b の沈着とその増幅を防ぐためである。移植腎からは C3 が産生され C3b が尿細管に沈着しオプソニン効果を発揮するため (Nat Med 2002; 8:582)、CD46 は拒絶反応抑制作用を有していることが予想される。さらには CD46 によって免疫抑制能力を有する制御性 T 細胞 (Treg) を誘導することが報告されている (Nature 2003; 421: 388-392)。Treg は臓器移植において究極の目標である免疫寛容を誘導するための手段として注目されているが、腎移植の分野において CD46 による Treg 誘導を検討した報告は過去にない。

2. 研究の目的

(1) TCMR における補体システムの関与を明らかとする：前述のように補体は腎移植後の拒絶反応に対する有効な治療ターゲットとなり得ると考えられるが、TCMR において補体がどのように関与しているかは現在のところ十分に解明されていない。そのため、まずは動物モデルを用いて TCMR における補体システムの関与を解明することを目的とした。

(2) 補体制御因子 CD46 による拒絶反応抑制効果と Treg 誘導作用について検討する：次に補体制御因子 CD46 には拒絶反応を抑制する効果があるという仮説を立て、動物モデルを用いて CD46 の発現を上昇させて検討することを目的とした。また逆に CD46 を抑制した場合における、移植腎の予後も評価しより補体制御因子の効果を検討する。

(3) ヒト腎移植後 TCMR における CD46 の発現と臨床的予後について検討する：最後にヒトへの臨床応用の可能性を評価するために、ヒト移植腎の TCMR 発生時の CD46 の発現と臨床的予後 (移植腎機能、拒絶反応に対する治療の反応性、生着率など) について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

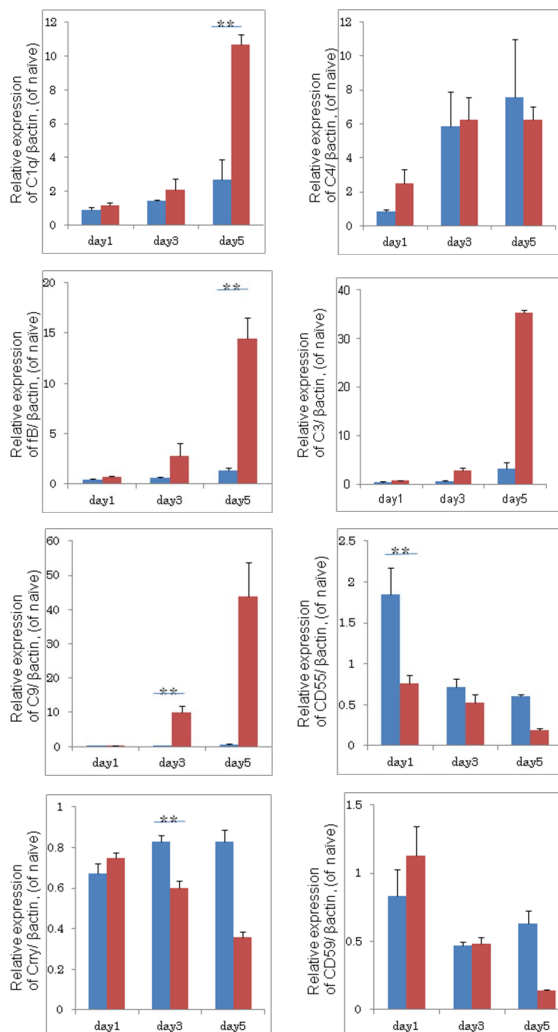
(1) ラット同種腎移植 TCMR モデルにおける補体システムの評価：DA ラットから LEW ラットへの同種腎移植 TCMR モデルにおける補体因子および補体制御因子の発現について、real-time PCR、免疫組織染色を用いて検討する。それによってどの経路で補体カスケードが活性化しているかを明らかにする。

(2) ラット同種腎移植 TCMR モデルにおける C46 の拒絶反応抑制効果の評価と Treg 誘導効果の評価：(1) と同モデルに recombinant Crry および抗 Crry 抗体を投与し、補体制御因子を上昇させた場合と抑制した場合の生着率を検討する。また in vitro でリンパ球混合試験に recombinant Crry を投与し Treg 誘導効果をフローサイトメトリーを用いて評価し、in vivo でも recombinant Crry および抗 Crry 抗体を投与した場合の、末梢血リンパ球における Treg の誘導についてフローサイトメトリーで評価を行う。

(3) ヒト腎移植後 TCMR における CD46 と臨床予後についての評価：ヒト腎移植後 TCMR の標本を免疫組織染色にて動物モデルで証明された結果と同様の経路で補体カスケードが活性化しているかを免疫組織染色で評価する。次に補体制御因子 CD46 の発現を評価し、臨床経過（拒絶反応に対する治療の反応性、生着率）について検討する。

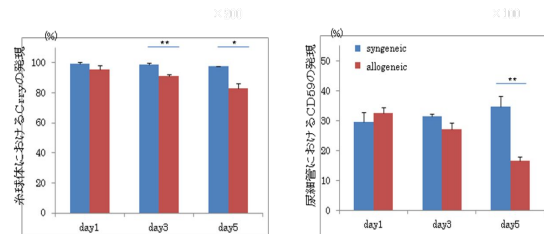
4. 研究成果

(1) ラット同種腎移植 TCMR モデルにおける補体システムの評価



ラット移植腎における補体因子、補体制御因子の発現 (real-time PCR): 棒グラフの左例は上から C1q、factor B、C9、Crry、右例は上から C4、C3、CD55、CD59 の結果を示す。赤色が TCMR モデル、青色が syngeneic モデル (LEW LEW) である。

ラット同種腎移植 TCMR モデルの移植腎を day1、3、5 に摘出し real-time PCR を用いて補体因子および補体制御因子の発現を評価した。C1q、factor B、C3、C9 は syngeneic モデルと比較して経時的に有意差を持って上昇していたが、C4 は syngeneic モデルにおける発現と有意差を認めなかった。以上のことから TCMR においては古典経路ではなく第 2 経路によって補体カスケードが活性化され、MAC を形成し細胞を障害していることが示された。さらに我々は C3aR、C5、C5aR など他の補体因子の評価も行ったが同じ結果であった。次に補体制御因子 CD55、Crry (ヒトの CD46 にあたるラットの補体制御因子)、CD59 の評価を行ったところ、いずれの補体制御因子においても syngeneic モデルと比較して有意差をもって経時的に低下していた。



免疫組織染色による補体制御因子の発現：左図 Crry、右図 CD59、赤色が TCMR モデル、青色が syngeneic モデル。

免疫組織染色をもちいて補体制御因子の発現を評価したところ、real-time PCR の結果と同様に経時的に腎臓における発現が低下していた。

以上のことから TCMR において第 2 経路を介して補体カスケードが活性化し、補体制御因子が低下しさらにカスケードが活性化されていくことが分かった。

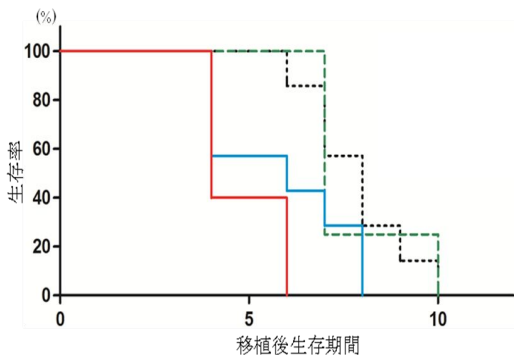
さらに、我々は第 2 経路が活性化されるメカニズムについての検討も行った。通常、補体は肝臓で産生されるため、ラット TCMR モデルの肝臓を摘出し day1、3、5 における補体因子、補体制御因子の発現を real-time PCR で評価した。結果はいずれの補体因子、補体制御因子も拒絶反応によって発現が上昇しておらず、また免疫組織染色で腎臓の尿細管に C3c の沈着が認められたことから、拒絶反応が発生すると移植腎の尿細管から C3 が産生され第 2 経路が活性化することが分かった。

(2) ラット同種腎移植 TCMR モデルにおける C46 の拒絶反応抑制効果の評価と Treg 誘導効果の評価

まず抗 Crry 抗体、抗 CD59 抗体をラット TCMR

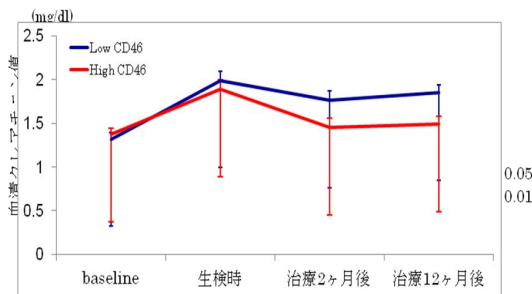
モデルに投与し効果を検討した。抗 Crry 抗体、抗 CD59 抗体の投与によって有意に生着率の低下を認めた。病理組織所見からも補体制御因子を抑制すると拒絶反応が促進されることが分かった。

次に recombinant Crry を投与する予定であったが、作成することが困難であり実験を断念した。そのため Treg 誘導効果については抗 Crry 抗体を用いて行った (Treg 抑制効果)。しかし、コントロールとなる syngeneic モデルにおいて、フローサイトメトリーで末梢血リンパ球中にほとんど Treg の population を認めなかったため、抗 Crry 抗体による Treg 抑制効果の評価は困難と判断した。補体制御因子を抑制すると TCMR が促進することは分かったが、補体制御因子による TCMR 抑制効果については評価できなかった。



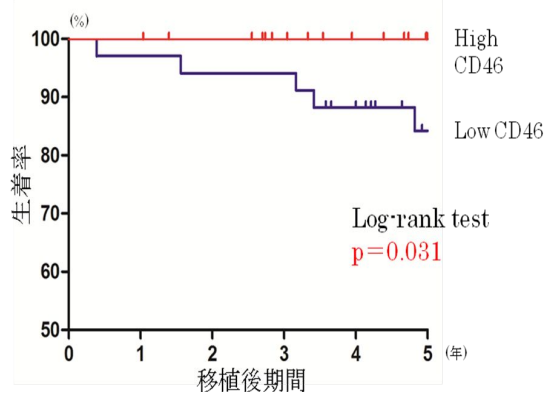
ラット TCMR モデルの生存率 (= 生着率): 赤線が抗 Crry 抗体投与群、青線が抗 CD59 抗体投与群、黒線が無治療群、緑線がコントロール IgG 投与群である。

(3) ヒト腎移植後 TCMR における CD46 と臨床予後についての評価
腎移植後に移植腎生検にて TCMR と診断された 67 例を対象として、免疫組織染色を行い、CD46 の発現が 10% 以上であったものを CD46 高発現群 (n=33)、10% 未満であったものを CD46 低発現群 (n=34) に分類した。2 群間の患者背景はレシピエントの性別、年齢、ドナーの性別、年齢、生体腎/献腎の割合、ABO 適合/不適合の割合、使用免疫抑制剤、TCMR の程度、HLA ミスマッチ数において有意差は認められなかった。まず、免疫組織染色を施行し尿細管に C3c が沈着していることを確認した。C4d の尿細管への沈着は認められず、ヒトにおいてもラットと同様に第 2 経路を介して補体カスケードが活性化していると考えられた。



CD46 高発現群と CD46 低発現群におけるベースライン、生検時 (診断時) 治療 2 カ月後、治療 12 カ月後の血清クレアチニン値の推移: 赤線が CD46 高発現群、青線が CD46 低発現群。

次に TCMR に対する治療の反応性を 2 群間で比較検討した。ベースラインの血清クレアチニン値は低発現群で $1.32 \pm 0.07 \text{mg/dl}$ 、高発現群で $1.37 \pm 0.07 \text{mg/dl}$ 、TCMR と診断されたときの血清クレアチニン値は低発現群で $1.99 \pm 0.10 \text{mg/dl}$ 、高発現群で $1.89 \pm 0.11 \text{mg/dl}$ と 2 群間で有意差は認められなかった (それぞれ $p=0.597$, $p=0.498$)。しかし、



治療 2 カ月後の血清クレアチニン値は低発現群で $1.76 \pm 0.11 \text{mg/dl}$ 、高発現群で $1.4 \pm 0.11 \text{mg/dl}$ 、治療 12 カ月後の血清クレアチニン値は低発現群で $1.85 \pm 0.09 \text{mg/dl}$ 、高発現群で $1.49 \pm 0.09 \text{mg/dl}$ と CD46 が高発現している群において治療の効果が有意に良好であった (それぞれ $p=0.049$, $p=0.009$)。

CD46 高発現群と CD46 低発現群の生着率: 赤線が CD46 高発現群、青線が CD46 低発現群。

CD46 高発現群、青線が CD46 低発現群の生着率を比較したところ 5 年生着率は CD46 高発現群で有意に良好であった。

また CD46 の発現に関与する因子を検討した結果、単変量解析および多変量解析においてドナーの年齢が因子として挙げられた。つまりドナーの年齢が上がると移植腎における CD46 の発現が低下し、ドナーの年齢が下がると CD46 の発現が上昇すると考えられた。

以上のことから移植腎に CD46 が高発現している群は拒絶反応に対する治療の反応が良好で、5 年生着率も良好であった。CD46 の発現にはドナー年齢が関与していると考えられた。

以上の結果より腎移植後の TCMR においては第 2 経路によって補体カスケードが活性化し、補体制御因子が低下することによってさらに活性化され移植腎が障害されるということが判明した。また補体制御因子をさらに低下させることによって TCMR が促進し移植腎の生着率が低下した。Recombinant の補体制御因子の作成が困難であったため、補体制御

因子を上昇させる実験は施行できなかったが、ヒト移植腎において補体制御因子の発現が高い移植腎は治療に対する反応性が良好で、生着率も良好であるという結果であった。これらの結果から補体制御因子または補体カスケードを制御することが TCMR の新たな治療手段となり得る可能性が示唆された。

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)

論文作成中

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田 洋一 (KAKUTA, Yoichi)

大阪大学大学院医学系研究科 器官制御

外科学(泌尿器科)・助教

研究者番号：40710116

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：