様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 29 年　 5 月 17 日現在

機関番号： 32653
研究種目： 基盤研究(C)（一般）
研究期間： 2014～2016
課題番号： 26462464

研究課題名（和文）腎移植における抗体関連型拒絶反応の早期免疫応答の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Solution of early immune-response and development of new strategies of antibody-mediated rejection in kidney transplantation.

研究代表者
尾本　和也（Omoto, Kazuya）

東京女子医科大学・医学部・准講師

研究者番号：90343558

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：腎移植における抗体関連型拒絶反応の治療戦略として免疫グロブリン大量投与（IVIG）の効果とそのメカニズムの解析のためラット感作モデルを作成した。感作ラット内には大量の抗ドナーIgG抗体が存在するがIVIG単独投与によりこれが低下することを直接証明した。経時的な病理学的変化も解析可能であった。そのメカニズムとしてはB細胞活性化因子の低下、調節性T細胞の増加によりメモリーB細胞や形質細胞の機能低下が考えられた。しかしながらIVIG単独投与により抗ドナー抗体は低下するも腎移植施行した場合の生着延長効果はわずかであり、メモリーT細胞のような、その他の細胞機能を抑制する方法を検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：Intravenous immunoglobulin (IVIG) has evolved widespread use for treatment of antibody-mediated rejection (AMR). In order to investigate the mechanisms of IVIG and sequential fluctuation of donor-specific antibodies (DSA) titer, we administered high dose IVIG to sensitized recipient rats and measured the DSA-IgG levels sequentially. The levels of DSA-IgG in sensitized rats though IVIG gradually decreased. Then we could evaluate sequential pathological findings related to IVIG. Graft survival in IVIG group was significantly longer than that in PS group, but not in nonsensitized group. Additionally, BAFF serum levels successfully decreased, and significant in vivo increasing of proportion of regulatory T cells were observed in IVIG group. Thus, IVIG monotherapy can suppress the production of DSA-IgG and progress of AMR. However, it is insufficient to obtain complete desensitization, so that combination therapies which are targeting to various memory cells might be required.

研究分野： 免疫寛容、移植免疫

キーワード： 腎移植　抗体関連型拒絶　感作　抗ドナー抗体　調節性T細胞　BAFF

１．研究開始当初の背景

現在、腎移植における生着率は5年生着率で90%近くに達してきているが、その中で移植腎機能廃絶の主な原因となっているのが慢性拒絶反応である。これまでの海外の文献から抗ヒト組織適合抗原（HLA）抗体の有無が移植腎の生着率に関与しており、特にドナー特異的抗HLA抗体の存在によって抗体関連型拒絶反応（antibody-mediated rejection: AMR）から慢性拒絶反応にいったん移行してしまうと非常に治療に非常に難渋する。現時点で慢性拒絶反応に対する有効な治療法は確立されていないことからも、AMRの発症を予防することや、発症した場合でも初期治療を成功させて、慢性拒絶反応への移行を抑制することが、移植腎を長期に生着させることになる。これまで我々は抗ドナー抗体を抑制する目的で腎移植の導入期にB細胞をターゲットにした治療を行ってきた。具体的には血液型不適合移植の症例に抗CD20抗体であるリツキシマブを投与した群と、血液型適合移植の症例でリツキシマブを投与しなかった群で比較するとリツキシマブを投与した群のほうが血液型不適合移植の症例であるにも拘わらず､その後のAMRの発症頻度が低く、移植腎も良好な成績を示したのである。しかしながら、その一方で、移植後に抗ドナー抗体が産生される場合のAMRは治療に抵抗性であることが多く移植腎の生着率も抗ドナー抗体が産生されていない症例と比較して低いことを報告している。これらのことは一度完成されたAMRの治療は非常に難しいことを示している。

２．研究の目的

このような背景から免疫抑制剤の発達により生着率が非常に向上した現在の腎移植においても、AMRは治療に難渋し、生着率を悪くしている。このことからAMRの有効な治療法の確立が急務である。しかしながらAMRは補体や様々なケモカインやサイトカインの活性化が複雑に関与しており、その発症機序は不明な点が多々ある。我々はラットの腎移植モデルを用いて、AMRにおける非常に早期の段階からの経時的な病理学的検討モデルを作成した。本研究ではこのモデルを用いて、抗体が移植片と反応後早期からの病理所見、個々の細胞浸潤とその機能を解析することでヒト腎移植のAMR発症の重要なステップを抽出し、それを抑制することでAMRの進行を止められるかを解析する。

３．研究の方法

本研究はラットの腎移植を用いたAMRのモデルを作成し、移植腎に抗体が作用した後の非常に早期の病理学的変化を解析、それを治療に応用することを目的としている。方法として

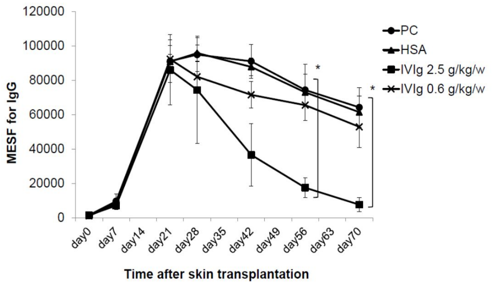
(1) ラットの腎移植におけるAMRを誘導するために適切な感作状態を導入する。
(2) AMRモデルにおいては腎移植後血流再開し、どの時点から病理学的変化が起こるのか解析する。
(3) 病理学的には補体系、細胞表面マーカーを含めた免疫染色、サイトカインアッセイを行う。
(4) ラットに免疫抑制剤、免疫グロブリン、分子標的薬を投与し病理学的解析を行い改善が認められるかどうかを調べる。
(5) ヒト腎移植へのAMRとの関連性を解析し治療への応用を考える。

４．研究成果

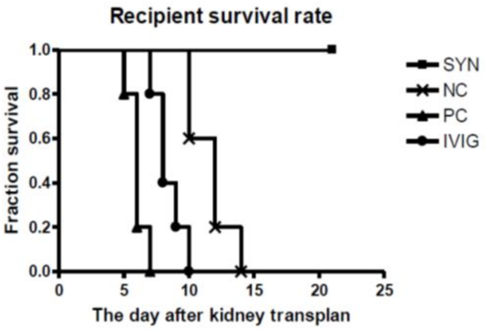
(1) 皮膚感作による抗ドナー抗体の動態：
ラットのドナー皮膚を別の種類のレシピエントに移植し、経時的に血清を採取した。その血清をドナーのT細胞と反応させ、抗ドナー抗体を蛍光量で定量化できるシステム（Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome; MESF）を用いて測定した。結果として皮膚移植後抗IgG抗体が3～4週間をピークに上昇し､その後徐々に低下することをまず確認した。抗体量は信号強度を表すflow intensityとして70,000～100,000程度とややばらついていることも判明した。この抗体はドナーと別種のラット、またはレシピエントラットに対する抗体ではなく、ドナーに対するIgGであり、感作によるドナー特異的IgG抗体であることを確認した。
(2) タクロリムス投与による抗ドナー抗体の推移：
次にこれらの抗体の産生抑制を免疫抑制剤にて抑制できるか検討した。同様の系に臨床で使用されている免疫抑制剤のタクロリムスを皮膚移植3日前から投与し、合計で14日間投与した場合､投与期間中ラットの皮膚移植片が拒絶されず生着したままであり、ドナーに対するIgG抗体も産生されなかった。しかしながらラット皮膚移植2週間後からタクロリムスを14日間投与した場合は、やや抗体産生能が低下するものの、皮膚移植後3~4週間のピークにて抗ドナーIgG抗体の産生が認められた。このことは一旦レシピエントがドナー抗原に感作され、その抗原に対するメモリー細胞が形成された場合は､タクロリムスを投与されてもその抗体産生能を抑制することが難しいことを示唆している。
(3) ラット感作モデルにヒト免疫グロブリン大量投与（IVIG）を行うことで実際に抗ドナー抗体が低下：

皮膚移植を施行した感作ラットにおいてヒト免疫グロブリンを皮膚移植後21日から開始した。0.6 g/kg/週の投与量では抗ドナー抗体はコントロール（PC: positive control）と同様に高いレベルで産生されていたが、2.5 g/kg/週と投与量をさらに増加させることで移植後42日目から低下しはじめ、移植

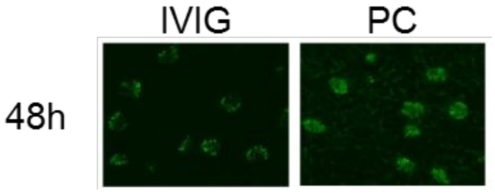
後 70 日目には前感作状態と同等のレベルまで抗ドナー抗体を低下させることが可能であった。その動態は統計学的に投与後 2 週間で抗ドナー抗体は低下しはじめ、投与後 4 週間では有意差をもって低下するようになっていた。また、IVIG の大量投与によって血清が希釈されることによって抗体価が低下する可能性を否定するためにヒト血清アルブミン（HAS）も同様に投与したが、これについては抗ドナーIgG 抗体の低下を認めなかった。



(4) 移植腎生着期間の延長：
そのような IVIG 感作ラットに感作した皮膚と同じ系統のラットの腎移植を行うと 4 日程度であるが、免疫グロブリンを投与していない感作ラットと比較して移植腎生着期間が延長することが判明した。しかしながら感作をしていないラットにアロの腎移植を施行した際の生着期間と比較すると有意な延長効果はなかった。

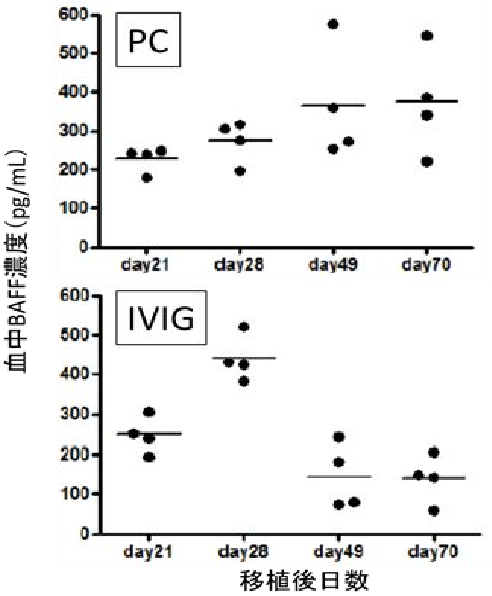


(5) 組織学的所見の改善：
さらに組織学的な検討において抗体関連型拒絶反応（AMR）の所見である糸球体炎、傍尿細管毛細血管炎などの組織所見をみてみると IVIG 感作ラットのほうが、発症自体を抑制させることは不可能であったが、発症時期を遅らせていることが判明した。(図：IVIG は傍尿細管毛細血管に C4d の沈着を認めないが、ポジティブコントロール（PC）では C4d が強く沈着していることを示している。)

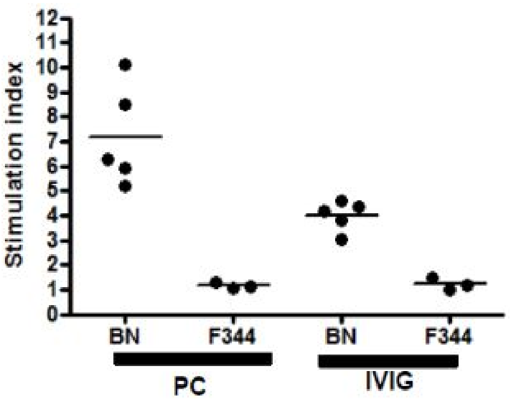


以上これらの結果は感作されて抗ドナー抗体が存在する場合でも大量の免疫グロブリンを使用することで AMR を抑制することができることを直接的に証明できた知見として意義があると考える。

(6) B 細胞活性化因子（BAFF）の低下：
感作ラットに IVIG 大量投与によって抗ドナーIgG 抗体が低下することが判明したことからそのメカニズムの解析を行った。皮膚移植後 21 日目から IVIG を投与することで移植後 28 日目にはいったん血清中の BAFF 濃度が上昇するが 49 日、70 日とたつにつれてポジティブコントロール（PC）群と比較して血清中の BAFF 濃度が低下することが判明した。



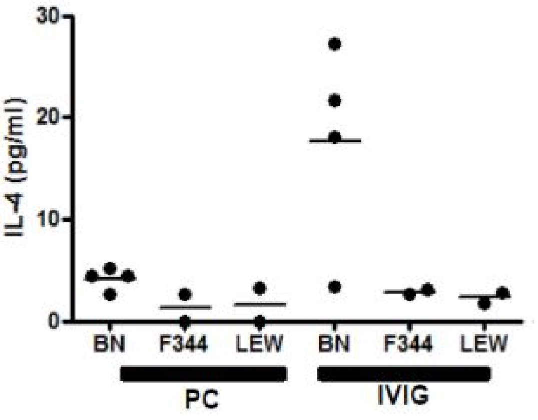
(7) 感作ラットに IVIG 投与後のレシピエントリンパ球のドナー抗原に対する混合リンパ球反応（MLR）：



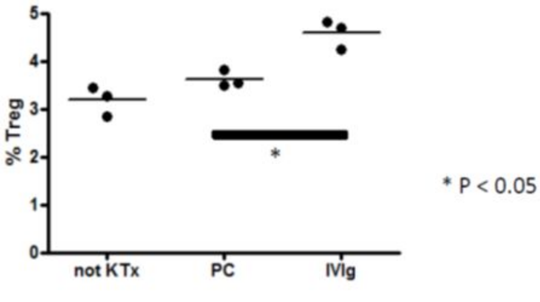
IVIG 投与後のドナーに対する反応を ***in vitro*** で解析するために MLR を行った。その

結果、IVIG 投与群（F344 ラット）におけるドナー（BN ラット）に対する反応は PC 群と比較して有意に抑制されていたが、その効果は部分的であり MLR を完全に抑制することはできなかった。

(8) 混合リンパ球培養上清中のサイトカインプロファイル：
PC 群と IVIG 投与群とにおける MLR の培養上清中のサイトカインのプロファイルを、ELISA 法を用いて解析した。その結果、IFN-γと IL-10 に関しては有意差を認めなかったが、IL-4 に関しては PC 群と比較して IVIG 投与群のほうが有意に上昇していた。



(9) IVIG 投与群における調節性 T（Treg）細胞の解析：
免疫応答を制御する細胞の一つに Treg 細胞があげられるが、今回の感作ラットに IVIG を投与した場合 Treg 細胞に変化があるか解析した。ドナー皮膚移植にて感作ラットを作成し、皮膚移植後 21 日目より IVIG 投与開始感作後 70 日経過した時点で皮膚移植同類ドナーからの腎移植を行い、その 3 日後にレシピエントの脾臓を採取して脾臓内の Treg 細胞の割合を解析したところ有意に IVIG 投与群で Treg 細胞の増加を認めた。



(10) 結果のまとめとその意義：
臨床的には抗ドナー抗体が引き起こす抗体関連型拒絶反応は、それが一旦誘発されるとその治療に難渋することが非常に多い。その観点からラットの感作モデルにおいて、非常に大量の抗ドナーIgG 抗体が IVIG 単独投与によって、大量かつ長期間の投与が必要になるものの、抗ドナーIgG 抗体量が減少する事象を直接証明できたことは非常に意義が高いと考えている。同時に経時的な組織学的変化を解析できた点も非常に重要な所見である。加えて、そのメカニズムとして B 細胞活性化因子の低下と調節性 T 細胞の増加が関与している可能性が高く、IVIG 単独の治療効果の解析を行った点でも意義があると考えている。一方で感作ラットに IVIG を行い、抗ドナー抗体が低下した状態で腎移植を施行した場合、その生着延長効果が IVIG 非投与、すなわちポジティブコントロール群と比較してわずかな延長効果しか認めなかった。このことは感作ラットにおいて IVIG 単独では未感作ラットの腎移植と比較しても有意な生着延長効果をあげることが難しいと考えられ、その他の免疫抑制剤との併用が必要になってくると思われる。このことは感作ラットにおける IVIG 単独投与は、メモリーB 細胞や、最終的に抗体産生を行う形質細胞への機能抑制は効果的である一方、メモリーT 細胞のようなその他の細胞に関しての抑制効果は不十分である可能性が高いと思われる。これについては今後の研究課題であると考えている。

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 2 件）
① 発表者：Yugo Sawada 発表表題：Sequential analysis of donor-specific antibodies and pathological findings using intravenous immunoglobulin in a highly sensitized rat kidney transplant model. 学会：2016 American Transplant Congress 発表年月日：2016 年 6 月 11 日 発表場所：米国・ボストン
② 発表者：沢田勇吾 発表表題：ラット腎移植 AMR モデル用いた IVIG の DSA 脱感作効果と AMR 抑制効果の検討 学会:第 51 回日本移植学会総会 発表年月日：2015 年 10 月 2 日 発表場所：ホテル日航熊本（熊本県・熊本市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
尾本　和也（OMOTO, Kazuya）
　東京女子医科大学・医学部・准講師
　研究者番号：90343558

(2)研究分担者
土岐　大介（TOKI, Daisuke）
　東京女子医科大学・医学部・助教
　研究者番号：60568591

(3)連携研究者
安部　良（ABE, Ryo）
　東京理科大学・生命科学研究所・教授
　研究者番号：20159453

(4)研究協力者
沢田　勇吾（SAWADA, Yugo）
平井　敏仁（HIRAI, Toshihito）