



Title	腎移植患者における慢性活動性抗体関連型拒絶反応早期診断法の開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	岩原, 直也
Description	配架番号 : 2680
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14936号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85759
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	IWAHARA_Naoya_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 岩原 直也

学 位 論 文 題 名

腎移植患者における慢性活動性抗体関連型拒絶反応早期診断法の開発

(Development of immune response monitoring system to predict chronic active antibody mediated rejection in kidney transplant recipients)

【背景と目的】腎移植は末期腎不全に対する腎代替療法の一つである。近年の腎移植は、免疫抑制剤の開発により、急性 T 細胞性拒絶反応 (acute T cell mediated rejection: ATCMR) の制御が可能となり、短期の移植腎生着率は著明に向上した。しかし、現在の免疫抑制剤を使用しても長期的には慢性活動性抗体関連型拒絶反応 (chronic active antibody mediated rejection: CAAMR) により移植腎機能廃絶となる患者が多く、移植腎の長期生着が課題となっている。CAAMR は腎臓を提供したドナーに対する抗体、ドナー特異的抗体 (Donor specific antibody: DSA) により引き起こされる。しかし、CAAMR の正確な発症機序は未だに解明されていない。また、臨床の現場では移植腎生検が CAAMR の唯一の診断方法であるが、移植腎生検を行い CAAMR と診断した時点にはすでに確立した治療法がないのが現状である。そのため、CAAMR となりうる患者を未然にもしくは可能な限り早期に発見する診断方法の開発が望まれる。混合リンパ球反応 (Mixed lymphocyte reaction: MLR) 試験は同種の主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) 分子に対する直接認識経路を介した T cell の反応を評価する方法である。蛍光色素である carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester 用いた MLR (CFSE-MLR) 試験が登場し、分裂している T cell をより正確かつ詳細に分析することを可能とした。さらに、サイトカイン細胞内染色法を併用することで、T cell サブセットを同時に評価することを可能とした。CFSE-MLR 試験は、臨床移植において ATCMR の診断に有用と報告されている。直接認識経路を介した T cell の反応は、移植初期の急性拒絶反応に関与すると考えられてきた。しかし、近年の研究では直接認識経路が移植臓器の慢性組織障害に寄与することが報告されている。本研究では、従来の方法より感度高くレシピエントの T cell の反応の評価が可能な MLR 試験 (T cell 法) を開発した。そして、MLR 試験 (T cell 法) を用い、CAAMR の直接認識経路を介した T cell の反応を明らかにし、CAAMR の早期診断法を確立することを目的とした。

【対象と方法】対象は、1999 年-2020 年の期間に生体腎移植を施行した 100 例。70 例が移植後安定した経過であり (stable 群)、30 例が DSA 陽性であった (DSA+群)。腎移植前の末期腎不全患者 (end stage renal disease: ESRD 群) 40 例をコントロールとした。対象患者の末梢血を採取し、末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMC) に分離し回収した。分離した PBMC をそれぞれの表面抗原に対する抗体染色、細胞内染色を実施し、FACSverse (BD Biosciences) を用い解析した。MLR 試験では、PBMC 法ではレスポンダーに PBMC を用い、T cell 法では T cell を用い実施した。レスポンダーを CFSE で染色し、スティミュレーターと 5 日間共培養した。抗体染色後、CFSE による細胞分裂の程度を評価した。

【結果】定期移植腎生検の病理診断の結果は、stable 群は全例拒絶なし、DSA+群は 9 例が拒絶所見なし (DSA without rejection)、21 例が CAAMR の診断であった (DSA with CAAMR)。まず、ESRD 群、stable 群、DSA+群の 3 群における末梢血中リンパ球、T cell、B cell サブセットの比較を行ったが違いを認めなかった。次に、MLR 試験を実施した。まず従来の報告にならないレスポンダーに PBMC を用いた MLR 試験 (PBMC 法) を実施したが stable と DSA+群のドナーに対する反応に違いを認めなかった。次

に、レスポonderに T cell を用いる MLR 試験 (T cell 法) を実施し、DSA+群は stable 群と比べドナーに対する CD8 陽性 T 細胞 (CD8 positive T cell: CD8⁺ T cell) の反応に違いを認めなかったのに対し、CD4 陽性 T 細胞 (CD4 positive T cell: CD4⁺ T cell) の反応の亢進を認めた。続いて、ドナーに対する反応とサードパーティーに対する反応を比較し、stable 群では CD8⁺ T cell および CD4⁺ T cell のドナー特異的な反応の抑制を認めた。対して、DSA+群では CD8⁺ T cell のドナー特異的な反応の抑制は認めるものの、CD4⁺ T cell のドナー特異的な反応の抑制は認めなかった。DSA+群でドナーに対する CD4⁺ T cell の反応の亢進が亢進していたことから、DSA+群においてどの CD4⁺ T cell サブセットが活性化しているのかを検討した。結果、DSA+群では 1 型ヘルパー T 細胞 (type 1 helper T cell: Th1) と 17 型ヘルパー T 細胞 (type 17 helper T cell: Th17) のドナーに対する反応が stable 群と比べ亢進していた。最後に、stable 群、DSA 群+を DSA+ without rejection 群と DSA+ with CAAMR 群に分け、3 群で CD4⁺ T cell、Th1、Th17 の反応を比較した。ドナーに対する Th1 の反応は stable 群と比べ、DSA+ without rejection 群および DSA+ with CAAMR 群は共に亢進していた。Th1 が DSA+ without rejection 群ですでに反応が亢進していることから、MLR 試験 (T cell 法) による Th1 のモニタリングは、CAAMR の早期診断法として有用である可能性が示唆された。

【考察】CAAMR は DSA によって引き起こされる移植腎機能廃絶の最大の原因である。そして、この CAAMR に対する有効な治療法は未だ確立していない。そのため、CAAMR の早期診断法の確立が望まれる。MLR 試験は同種の MHC 分子に対する直接認識経路を介した T cell の反応を評価する方法である。この MLR 試験により CAAMR をモニタリングした報告は現在までない。本研究では、まず PBMC 法の MLR 試験を実施し stable 群と DSA+群の反応を比較したが違いを認めなかった。そのため、T cell をレスポonderとして使用した MLR 試験 (T cell 法) を開発し、DSA+群ではドナーに対する CD4⁺ T cell の反応が stable 群と比べ亢進していることを確認した。次に、CD8⁺ および CD4⁺ T cell のドナー特異的な T cell 反応の抑制を stable 群で確認した。そして、DSA+群ではドナーに対する CD4⁺ T cell の反応が亢進していることで、ドナー特異的な T cell の反応の抑制を認めないことを確認した。腎機能が安定している腎移植患者において、このドナー特異的な反応の抑制が認められることを報告したものがある。しかし、このドナー特異的な反応の抑制が移植後長期においても継続していること、DSA+群では CD4⁺ T cell のドナー特異的な T cell の反応の抑制を認めないことを、本研究は初めて確認した。DSA+群の CD4⁺ T cell サブセットの解析では、ドナーに対する Th1 および Th17 の反応が stable 群と比べ亢進していることを確認した。これらの結果から、炎症性 T 細胞であり CAAMR に対する関与が報告されている Th1 および Th17 が、腎移植患者における DSA および CAAMR の病態に関与している可能性を示した。MLR 試験 (T cell 法) の CAAMR 早期診断法としての有用性の検討では、DSA+ without rejection 群のドナーに対する Th1 の反応が stable 群と比べすでに亢進していることを確認した。この結果から、MLR 試験 (T cell 法) は CAAMR の早期診断法として有用な可能性が示唆された。そして、Th1 は組織学的に CAAMR に至る前から分裂していることを明らかにした。CAAMR となる患者を未然に特定できるモニタリング法は、CAAMR が形成される前の治療介入を可能とする。そして、CAAMR 発症を予防または遅らせることができる可能性がある。

【結論】本研究で開発した MLR 試験は、DSA 陽性の腎移植患者ではドナーに対する CD4⁺ T cell の反応が亢進していることを明らかにした。そして、臨床では CAAMR 診断に必須と考えられている腎生検よりも早期に CAAMR を診断できる可能性を示した。