



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	岩原, 直也
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2680 他
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/2115/86040
Type	doctoral thesis
File Information	IWAHARA_Naoya_summary.pdf



学位論文（要約）

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)

2022年3月

北海道大学
岩原 直也

学位論文（要約）

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)

2022年3月

北海道大学
岩原 直也

【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り、生活の質、生命予後は透析患者に比べ優れている。近年の腎移植は、免疫抑制剤の開発により急性拒絶反応の制御が可能となり、短期移植腎生着率は向上した。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い。そのため、移植腎長期生着にはCAAMRの克服が必要である。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と考えられている。しかし、CAAMRの正確な発症機序は未だに解明されていなく、CAAMRと診断した時には有効な治療法がない。そのため、CAAMRの克服にはCAAMRとなりうる患者を未然に発見することが可能な免疫学的モニタリング法の開発が必要である。この早期診断法の開発はCAAMRとなる前の治療的介入を可能とする。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。MLR試験は、臨床移植において急性拒絶反応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が、近年の研究では移植臓器の慢性組織障害にも寄与することが報告された。本研究では、CAAMRの早期診断法を確立することを目的に、腎移植患者でMLR試験による直接認識経路を介したT cellの反応を解析した。

【対象と方法】対象は、1999-2020年の期間に生体腎移植を施行した100例。70例がDSA陰性で移植後安定した経過であり(stable群)、30例がDSA陽性(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。2019-2021年の期間に、stable群およびDSA+群は移植腎生検時に、ESRD群は腎移植前で免疫抑制剤開始前に末梢血を採取し、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を用い解析した。MLR試験は、従来の方法であるPBMC法ではレスポンダーにPBMCを、当教室で開発したT cell法ではT cellを使用した。レスポンダーをcarboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester(CFSE)で染色し、スティミュレーターと5日間共培養し、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。次に機能的解析が必要と考え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。そのためMLR試験の改良が必要と考え、レスポンダーにT cellを用いるMLR試験(T cell法)を実施した。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。この結果からMLR試験(T cell法)はDSA+群の診断法として有用と考えられ、MLR試験(T cell法)を用いさらなる解析を実施した。ドナーに対する反応とサードパーティーに対する反応の比較では、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。次に、DSA+群はstable群と比べどのCD4⁺ T cellサブセットが活性化しているのかを解析した。結果、DSA+群では1型ヘルパーT細胞(type 1 helper T cell: Th1)と17型へ

ルパーT細胞(type 17 helper T cell: Th17)のドナーに対する反応が亢進していた。最後に、stable 群、DSA 群+を DSA+ without rejection 群と DSA+ with CAAMR 群の3群に分け、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たことから、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。本研究では、T cell をレスポンドーとして使用した 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つた。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 の直接認識経路を介した活性化が、腎移植患者における 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 CAAMR の組織学的所見が出現する前から活性化していることを明らかにした。CAAMR となる患者を未然に発見することが可能な免疫学的モニタリング法の開発は、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(T cell 法)は、CAAMR を引き起こす DSA が陽性である腎移植患者で、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、CAAMR 診断に必須である腎生検よりも早期に CAAMR を診断できる可能性を示した。