

混合キメラによる移植腎の免疫寛容における 免疫学的動態と予後予測バイオマーカーに関する研究

松 波 昌 寿

要 約 : 【目的】 混合キメラによる移植腎の免疫寛容における機序解明および移植後の予後予測に有効なバイオマーカーを同定することを目的とした。

【実験方法】 マサチューセッツ総合病院において、1993年から2016年の間に実験した、カニクイザルにおける骨髄移植を併用した腎移植症例のうち、長期経過観察により安定した免疫寛容状態と確定された免疫寛容群 (TOL, 平均生存日数1736 ± 454日) 14例、慢性拒絶群 (CAMR, 899 ± 152日) 13例、急性拒絶群 (TCMR, 130 ± 17日) 15例のプロトコル移植腎生検より得られたホルマリン固定パラフィン包埋切片256検体を対象とし、NanoString 遺伝子発現解析を用いて53種類のmRNAについての移植腎内の動態を解析した。

【結果】 移植腎の各種mRNA発現の経時的変化を観察すると、TOL群においてFOXP3はCAMRとTCMRの両群と比較して、移植後1年以内、1年以降ともに著しく有意に高い発現を示した。さらにIL10やTGFβなどのTregに関連するサイトカインのmRNAも高く、移植腎内のTregが免疫寛容誘導の機序に大きく関わっていることが示唆された。それに対し、TCMR群ではIL1RL1, IL4, IFNG, CXCL11, GNLY, GZMB, FCGR3Aなどの炎症反応に関連したmRNA発現が高いのが特徴的であった。またCAMR群ではCAV1, MALL, VWF, TEK, ROBO4, SOX7, PECAM1などの血管内皮細胞増殖因子が移植後1年以内の早期から有意に高値を示した。一方、これらの拒絶反応を反映するmRNAはTOL群では有意に低く、移植腎内のmRNAを解析することにより、長期予後を予測できることが示唆された。特にFOXP3についてのROC曲線では、TOL群とCAMR群を比較しAUCが0.83であり (カットオフ値:36.5, 感度:0.80, 特異度:0.68), 予後予測する上で優れたバイオマーカーであると考えられた。

【結論】 移植腎におけるFOXP3がTOL群において特異的に高く発現していることから、混合キメラによる免疫寛容誘導においてTregが深く関わっていることが示唆された。さらに免疫寛容あるいは拒絶反応に特異的なmRNAは、移植後の予後予測のための重要な指標であると考えられた。

キーワード: 免疫寛容, FOXP3, 混合キメラ, 腎移植, NanoString 遺伝子発現解析

緒 言

近年における優秀な免疫抑制剤の開発により、移植臓器の短期生着率は飛躍的に向上した。2016年のOPTN/SRTR (Organ Procurement and Transplantation Network/Scientific Registry of Transplant Recipients) Annual Data Reportによると、米国における献腎移植6か月生着率は、2005年は92.5%であったものが2015年には97.4%と、確実な移植成績の向上が認められる。しかしながら、2006年までに施行された移植患者の10年生着率は48.4%と、長期の移植成績は未だ満足できるものとはなっていない(1)。そ

の原因としては、慢性拒絶反応に対する効果的な予防や治療方法がないことや、各種の免疫抑制剤による副作用 (高血圧, 糖尿病, 高脂血症, 腎毒性)(2, 3), そして長期免疫抑制による発がん率の上昇などが挙げられる(4)。このため、今後長期成績をさらに向上させるためには、免疫抑制を必要としない移植, すなわち免疫寛容の誘導を実現するしかないと考えられている(5)。

免疫寛容とは、免疫抑制を行うことなく、特定の移植片にのみ免疫反応が惹起されない状態を言う。この場合、免疫抑制ではないため感染症などに対する生体の防御機能は正常に保たれている。

免疫寛容に関する研究は、1945年ウィスコンシン大学のOwenが双子間で生まれた牛 (フリーマーチン) に赤血球キメラを発見したことに端緒をなす(6)。それは胎生期に骨盤循環を共有することにより双子間の血液が混じりあうことにより引き起こされた現象である。その後Medawarは1952年に、フリーマーチ

ハーバード大学 マサチューセッツ総合病院 Center for Transplantation Sciences
Center for Transplantation Sciences, Massachusetts General Hospital,
Harvard Medical School, 55 Fruit Street, Boston, MA 02114, USA
2018年12月25日受理

ンがその兄弟牛からの皮膚を拒絶しないことを発見した(7)。さらにMedawarは免疫機能が未熟な胎児期あるいは新生児期にドナーの細胞を注入すれば、その後そのドナーの皮膚を拒絶しないことを証明した(新生児免疫寛容)(8)。しかし、Medawarの方法では胎生期あるいは新生児期に将来の臓器不全を予測した上、将来の移植ドナーの細胞を注入しなければいけないので現実的ではなかった。そのため、その後の研究はいかに成体に免疫寛容を誘導する方法を確立するかということに努力が注がれてきた。

最も一般的な免疫寛容の誘導法としては、ドナー骨髄移植によりキメラを誘導する方法がある。Sharabiらは臨床に応用できる非侵襲的なプロトコルにより安定した混合キメラ(mixed chimerism)によるマウスの皮膚移植の免疫寛容誘導に成功した(9, 10)。このマウスにおける基礎研究をもとに、1991年からマサチューセッツ総合病院(Massachusetts General Hospital: MGH)では、カニクイザルを使った腎骨髄同時移植モデルでの免疫寛容の実験が始まった。1995年、Kawaiらは低線量の全身照射、胸腺への局所照射、抗胸腺細胞グロブリンに脾摘と術後1ヶ月間のシクロスポリン投与を加えることにより、霊長類において初めて移植腎の免疫寛容の誘導に成功した(11-13)。この前臨床研究はさらに臨床に応用され、ヒトにおけるHuman leukocyte antigen (HLA) 不適合腎移植において免疫寛容の誘導に世界で初めて成功している。これまでに10例の患者においてHLA不適合腎骨髄同時移植が試みられ、カニクイザルでも観察されたような一時的な混合キメラにより、7人における免疫抑制剤の中止に成功し、そのうちの4人は現在でも免疫抑制剤なしで8年から16年間良好に経過している(14-17)。

免疫寛容誘導の臨床治験は、米国を中心として複数の施設から報告されており、それぞれ目標とするキメラの程度が違っているものの、全てドナー骨髄移植を腎移植に合わせて行うというものである(5, 17)。これらの臨床治験は長期の安定した免疫寛容が人間でも誘導できることを示したが、今後の課題として、免疫寛容の機序解明、そして移植後安全に免疫抑制剤を軽減し中止するための、拒絶反応や免疫寛容を予測できる有効なバイオマーカーの発見が不可欠である。

本研究では、過去25年間にMGHで行われたカニクイザルを使った腎骨髄同時移植モデルにおける256移植腎検体のmessenger RNA (mRNA)を、NanoString 遺伝子発現解析を用いて分析し、混合キメラによる免疫寛容の免疫学的機序を研究するとともに、免疫寛容や拒絶反応を予測できる有効なバイオマーカーについての検討を行った。

実験方法

1. 実験動物

ヒトに最も近い重要な実験動物として、カニクイザル(体重4~7kg, Charles River Primates, Wilmington, MA, USA) 42頭を用いた。実験はMassachusetts General Hospital Institutional Animal

Care and Use Committee (IACUC) における動物実験指針に従って施行された。

2. カニクイザルのMHCタイピング

Wisconsin National Primate Research CenterのO'Connorらが報告した方法(18, 19)にもとづき、カニクイザル主要組織適合遺伝子複合体(Major histocompatibility complex: MHC) 遺伝子を分析した。まず、カニクイザルの末梢血リンパ球よりDNA抽出キットを用いてゲノムDNAを抽出した。カニクイザルcDNA塩基配列におけるMaf領域からPCRにて増幅した後、DNAシーケンス解析プログラムを用いて、MHCクラスIおよびクラスIIを規定する17種類のマイクロサテライトマーカーの多型解析ならびに集団遺伝学的解析を行った。それにより得られたタイピング結果から、表1に示すようにABO血液型適合でMHCが不適合となるようドナーとレシピエントを選択した。

3. 免疫寛容導入プロトコール

カニクイザルに対し、低線量の全身照射(1.5Gy×2)および胸腺への局所照射(7Gy)、抗T細胞抗体としてequine ATG(ATGAM, Pharmacia and Upjohn, MI, USA, 50mg/kg/day)で前処置をした後、腎骨髄同時移植を施行した。術後は短期間の副

表1. 移植不適合と移植腎の生着成績

グループ	実験動物	MHC ミスマッチ		キメラ	DSA	移植腎生着日数	病理組織診断
		クラス I	クラス II				
TOL群 n=14	M1693	ND	ND	+	-	5983	NDAR, C4d (-)
	M2800	Full	Full	+	-	4328	NDAR, C4d (-)
	M496	ND	ND	+	-	3464	NDAR, C4d (-)
	M5898	ND	ND	+	-	2497	NDAR, C4d (-)
	M2496	ND	ND	+	-	1340	NDAR, C4d (-)
	M8907	Full	Full	+	-	1021	NDAR, C4d (-)
	M2702	Full	Haplo	+	-	857	NDAR, C4d (-)
	M4403	Haplo	Haplo	+	-	852	NDAR, C4d (-)
	M393	ND	ND	+	-	834	NDAR, C4d (-)
	M8010	Full	Full	+	-	796	NDAR, C4d (-)
	M2108	Haplo	Haplo	+	-	758	NDAR, C4d (-)
	M4808	Full	Full	+	-	728	NDAR, C4d (-)
	M3312	Haplo	Haplo	+	-	468	NDAR, C4d (-)
	M2611	Full	Full	+	-	378	NDAR, C4d (-)
CAMR群 n=13	M504	Full	Full	+	+	2023	CAMR, C4d (+)
	M1902	Haplo	Haplo	+	-	1825	CAMR, C4d (+)
	M6007	Full	Full	+	+	1260	CAMR, C4d (+)
	M5710	Full	Full	+	150	1143	CAMR, C4d (+)
	M2311	Full	Haplo	+	425	843	CAMR, C4d (+)
	M1900	Haplo	Haplo	+	152	837	CAMR, C4d (+)
	M3208	Full	Full	+	306	791	CAMR, C4d (+)
	M4507	Haplo	Haplo	+	ND	761	CAMR, C4d (+)
	M6601	Haplo	Haplo	+	342	703	CAMR, C4d (+)
	M8110	Full	Haplo	+	ND	663	CAMR, C4d (+)
	M3515	ND	ND	+	385	434<	CAMR, C4d (+)
M505	Haplo	Haplo	+	76	258	CAMR, C4d (+)	
M4916	Full	Full	-	77	148	CAMR, C4d (+)	
TCMR群 n=15	M913	Full	Full	+	112	268	TCMR, C4d (-)
	M4514	Full	Full	+	-	246	TCMR, C4d (-)
	M2208	Full	Full	+	-	217	TCMR, C4d (-)
	M812	Haplo	Full	-	-	158	TCMR, C4d (-)
	M3909	Haplo	Haplo	-	100	141	TCMR, C4d (-)
	M613	Full	Haplo	-	89	135	TCMR, C4d (-)
	M5716	Full	Full	+	91	135	TCMR, C4d (-)
	M3809	Full	Haplo	+	-	125	TCMR, C4d (-)
	M3115	Full	Haplo	+	98	116	TCMR, C4d (-)
	M905	ND	ND	-	-	89	TCMR, C4d (-)
	M3505	Full	Haplo	-	68	72	TCMR, C4d (-)
	M4006	Haplo	Haplo	+	-	71	TCMR, C4d (-)
	M5306	Haplo	Haplo	+	-	69	TCMR, C4d (-)
	M1102	Haplo	Haplo	-	-	64	TCMR, C4d (-)
	M300	ND	ND	+	-	58	TCMR, C4d (-)

TOL: tolerance

CAMR: chronic antibody-mediated rejection

TCMR: T cell mediated rejection

ND: not determined

NDAR: no diagnostic abnormalities

刺激経路ブロック (co-stimulatory blockade) として, anti-CD154 mAb (anti-CD40L, American Type Culture Collection catalog number 5C8.33, 20mg/kg/day) もしくはBelatacept (CTLA4Ig, Bristol-Myers Squibb Company, NY, USA, 20mg/kg/day) の投与と, 28日間のシクロスポリン (目標トラフ値: 250-350ng/ml) を投与した(図1A)(11, 20)。

4ヶ月前に腎移植した症例では, 骨髄移植まで3種類の免疫抑制剤, タクロリムス (目標トラフ値: 15-20ng/ml), ミコフェノール酸モフェチル (200mg/day), ステロイド (1mg/day) を投与した。また骨髄移植後に, 抗CD8抗体 (cM-T807 provided by Centocor Inc., PA, USA, 5mg/kg/day) もしくはAlefacept (LFA3-Ig, AstellasPharma US, IL, USA, 1mg/kg/day) を追加した(図1B)。

4. 血清クレアチニン測定

カニクイザルの全血をヘパリン採血管で採取した後, 全血サンプルをヘパリンリチウム全血セパレーターに移した。全血セパレーターをCatalyst Dx Chemistry Analyzer (IDEXX Laboratories, Inc., ME, USA) にセットして, 血清クレアチニン値を測定した。

5. フローサイトメトリーを用いたDSA解析

ドナーの末梢血から比重遠心法によって分離した末梢血単核細胞 (PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells) 浮遊液にレシピエントの血清を反応させた後, FITC標識抗ヒトIgG・マウスモノクローナル抗体で蛍光染色してフローサイトメーター (BD FACScan) で測定した。レシピエント血清中に抗ドナー抗体が存在すると, 陽性反応 (蛍光強度の右側へのシフト) として検出された。レシピエントの持つ抗体が B細胞特異的なかを判定するため, CD20 に対する蛍光標識抗体 (PE 標識 CD20抗体) で B細胞 (CD20陽性細胞) を検出した。

6. 移植腎検体

MGHにおいて免疫寛容導入プロトコルを用い, 1993年から2016年の間に実験した腎骨髄同時移植モデルのうち, 長期経過観察により完全な免疫寛容状態と確定された免疫寛容群 (TOL: Tolerance平均生存日数1736 ± 454日) 14例, 慢性拒絶群 (CAMR: Chronic antibody-mediated rejection, 899 ± 152日) 13例, 急性拒絶群 (TCMR: T cell mediated rejection, 130 ± 17日) 15例の移植腎プロトコル生検, あるいは剖検によって得られたホルマリン固定パラフィン包埋移植腎組織切片 (FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded) 256検体を比較対象とした(表1)。

7. RNA解析

前述のFFPEサンプルから, 抽出キット (Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いてmRNAを抽出した後, NanoString遺伝子発現解析 (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) を用いて遺伝子発現を定量化した。遺伝子発現量は, nSolver Analysis Software version 3.0 (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) を用いて, 4つの異なるハウスキーピング遺伝子 (ACTB, GAPDH, HPRT1, LDHA) の発現量に正規化して得られた相対的mRNAレベルとして表記した。今回解析した53種類のmRNA

表2. 53種類のmRNA

遺伝子シンボル	遺伝子名	機要	主な用途
BCL2	B-cell lymphoma 2	Anti-apoptotic	TOL
CAV1	Caveolin 1	Endothelium	CAMR
CD34	CD34 antigen	Endothelium	CAMR
CD3D	CD3 delta chain	T cell	Other
CD4	CD4	Th	Other
CD74	Major histocompatibility complex, class II invariant chain	Inflammation	CAMR
CD8A	CD8 alpha chain	CTLs	TCMR
CDH13	Cadherin 13	Endothelium	CAMR
CDH5	Cadherin 5	Endothelium	CAMR
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1 (fractalkine receptor)	NK	CAMR
CXCL11	CXC chemokine ligand 11	IFNG-induced	CAMR, TCMR
DARC	Duffy blood group, atypical chemokine receptor	Endothelium	CAMR
EPO	Erythropoietin	Erythropoiesis	TOL
FCGR3A	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a)	NK	CAMR, TCMR
FGF8P2	Fibroblast growth factor binding protein 2 (KSP37)	NK	CAMR, TCMR
FOXP3	Forkhead box P3	Treg	TOL
GATA3	GATA binding protein 3	Inflammation	TOL
GNLY	Granulysin	NK/CTL	CAMR, TCMR
GZMB	Granzyme B (granzyme 2, CTL-associated serine esterase 1)	NK/CTL	CAMR, TCMR
ICOS	Inducible T-cell costimulator (CD278)	Tfh	Other
IFNG	Interferon, gamma	Inflammation	CAMR, TCMR
IL10	Interleukin 10	Th2	TOL
IL17	Interleukin 17	Th17	Other
IL1RL1	Interleukin 1 receptor-like 1 (IL33R)	Th2	TCMR
IL2	Interleukin 2	Th1	CAMR
IL21	Interleukin 21	Th/NK	TCMR
IL4	Interleukin 4	Th2	TOL
IL6R	Interleukin 6 receptor (CD126)	Tfh	Other
KLF4	Kruppel-like factor 4	Endothelium	CAMR
KLRF1	Killer cell lectin-like receptor F1 (NKG80)	NK	CAMR
MALL	Mal, T-cell differentiation protein-like	Endothelium	CAMR
MS4A1	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1 (CD20)	B cell	TOL
MYB11	V-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1	NK	CAMR
PALMD	Palmadolphin	Endothelium	CAMR
PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31)	Endothelium	CAMR
PLA1A	Phospholipase A1 member A	Endothelium	CAMR
PLAT	Plasminogen activator, tissue	Endothelium	CAMR
PSMB10	Proteasome subunit, beta type, 10	Endothelium	CAMR
RHOJ	Ras homolog family member J	Endothelium	CAMR
ROBO4	Roundabout, axon guidance receptor, homolog 4	Endothelium	CAMR
RORγ1 (RORC)	RAR-related orphan receptor gamma 1/2 (3' portion of RORC)	Immature thymic	TOL
RP56	Ribosomal protein S6	mTOR pathway	CAMR
RP56KB1	Ribosomal protein S6 kinase beta 1	mTOR pathway	CAMR
SELE	Selectin E	Endothelium	CAMR
SH2D1B	SH2 domain containing 1B (EAT2)	NK	CAMR
SOX7	Sex determining region Y-box 7	Endothelium	CAMR
TBX21	T-box 21 (T-bet)	Inflammation	CAMR
TEK	Tyrosine kinase, endothelial	Endothelium	CAMR
TGFβ1	Transforming growth factor, beta 1	Treg	TOL
THBD	Thrombospondin	Endothelium	CAMR
TNF	Tumor necrosis factor	Inflammation	CAMR
TRIB1	Tribbles pseudokinase 1	Inflammation	CAMR
VWF	Von Willebrand factor	Endothelium	CAMR

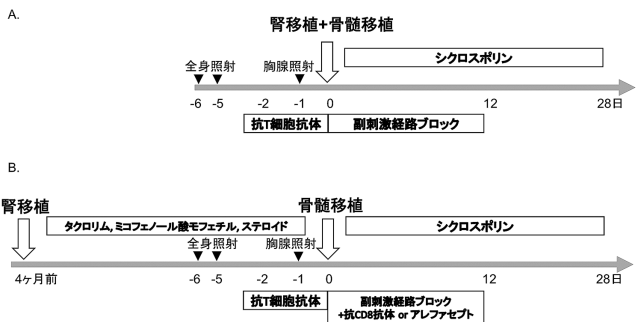


図1. 免疫寛容導入プロトコル

カニクイザルに対し, 低線量の全身照射 (1.5Gy×2) および胸腺への局所照射 (7Gy), 抗 T 細胞抗体で前処置をした後, 腎骨髄同時移植を施行した。術後は短期間の副刺激経路ブロック (抗CD154 mAb もしくはCTLA4Ig) の投与と, 28日間のシクロスポリンを投与し, それ以降は一切の免疫抑制剤を使っていない (A)。4ヶ月前に腎移植した症例では, 骨髄移植まで3種類の免疫抑制剤 (タクロリムス, ミコフェノール酸モフェチル, ステロイド) を投与した。また骨髄移植後に, 抗CD8抗体もしくはアレファセプトを追加した (B)。

セットは、過去の文献に基づいて選ばれたもので、主だった免疫反応に関連する遺伝子、血管内皮細胞増殖因子、炎症反応関連遺伝子などが含まれている (表2) (21-25)。

8. 免疫染色および免疫組織学的染色

Hematoxylin-Eosin (HE) 染色, Periodic Acid-Schiff (PAS) 染色に加え, Tregにおける特異的分子マーカーであるFoxp3に対する抗体 (JK-16S; eBiosciences, San Diego, CA, USA) を用い, Foxp3免疫染色を行った。Treg rich organized structure : TOLS (後述) における Foxp3細胞の分布を検証するため, CD4 (GK1.5; BD Pharmingen) とFoxp3の二重免疫染色を行った。抗体関連拒絶型反応の診断には, 傍尿管毛細血管におけるC4d染色を用いて評価した (図3)。病理組織学的診断は2013年Banff分類に基づき, 急性拒絶反応と慢性拒絶反応を診断した。

9. 統計学的解析

データは平均±標準誤差として表示した。統計解析はTOL群とCAMR群, TCMR群での比較をPiecewise mean differences and unadjusted raw p values of the pair-wise contrastsで検定した (MGH Biostatistics Center Biostatistician, Lee Hang PhDによる)。統計グラフ作成にはGraphPad Prism7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用い, p値は0.05以下を有意差ありとして表示した。

結 果

1. 移植不適合と移植腎の生着成績

1993年から2016年の間に実験した腎骨髄同時移植モデルのカニクイザル42頭のレシピエントを移植後経過, 剖検時の最終的な病理組織学的所見ならびに抗ドナー抗体 (donor-specific antibody: DSA) の有無に基づき, 病理組織学的に拒絶反応がなく, DSAも検知されなかったTOL群 (14例), DSA陽性で慢性拒絶反応を示したCAMR群 (13例), T細胞による急性拒絶反応を示したTCMR群 (15例) に分類した。これらのレシピエントは, ドナー骨髄移植前に図1に示すようなプロトコル (全身照射および胸腺照射, 抗T細胞抗体および副刺激経路ブロック) で治療されてから腎骨髄同時移植を行い, 移植後は28日間のシクロスポリンを投与した。各々のサルにおけるHLAミスマッチ, 術後の混合キメラおよびDSAの有無, 生存期間についての結果を表1に示す。

2. 各グループの移植後血清クレアチニン値の推移と病理組織学的所見

TOL群の腎機能は良好で, 術後378-5983日間の観察期間中, 血清クレアチニン値1.0-1.8 mg/dlで推移した (図2A)。これに対して, CAMR群ではDSAが術後200日以後に陽性となり, 術後200日以後に徐々に腎機能の低下が見られた (図2B)。また, TCMR群ではほとんどの症例で免疫抑制中止後すぐに血清クレアチニン値の急激な上昇が見られたが, 一部の症例は術後200日を超えるまで腎機能の悪化は見られなかった (図2C)。

TOL群の代表的レシピエントであるM8010の術後126日目, 313日目, ならびに796日目の病理組織学的所見を図3A-Cに示す

が, それぞれ急性および慢性の拒絶反応を示唆する所見は認めなかった。しかし, 術後313日目および796日目の興味深い所見として, CD4⁺Foxp3⁺の (図3D, E) 多数の細胞から成る塊状のTregリンパ球集簇 (Treg rich organized structure : TOLS) が間質に観察された (図3B, C)。このTOLSは他のTOL群のレシピエントでも頻回に観察された。

CAMR群の代表的レシピエントであるM8110の術後105日目, 217日目および663日目の病理組織学的所見を図3F-Hに示すが, 術後105日目 (図3F), 217日目 (図3G) の生検では拒絶反応を認めなかったものの, DSAが陽性になった後の生検 (術後663日目) では慢性拒絶反応に特徴的な所見である, 糸球体基底膜の二重化を認め慢性移植糸球体症と診断された (図3H)。C4d染色では, 傍尿管毛細血管に線状沈着を認めた (図3I)。他のCAMR群のレシピエントでもDSA陽性になった後に同様な病理組織学的所見の経過を辿った。

TCMR群のM3115では, 術後54日目に採取した生検ではボーダーライン変化の所見であった (図3J)。しかし, その後急速な

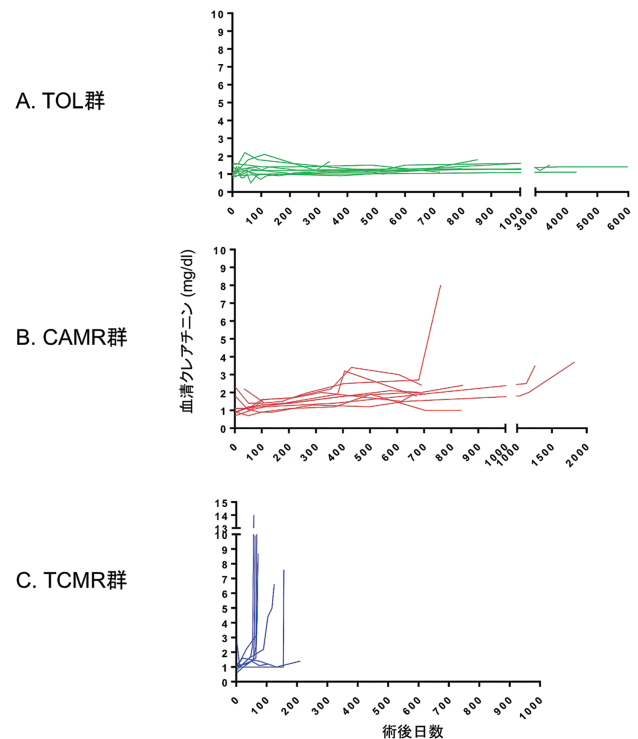
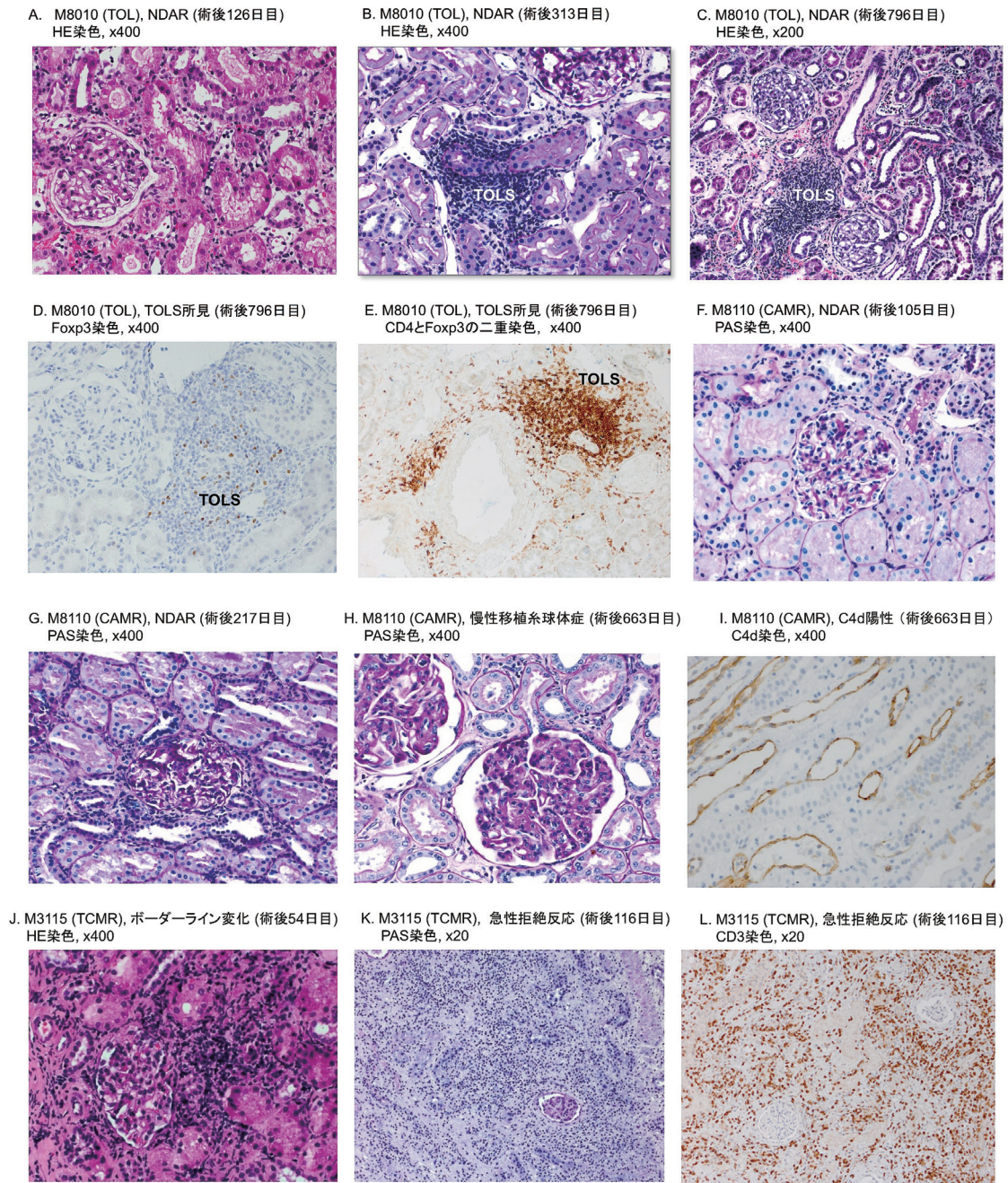


図2. 各グループの移植後血清クレアチニン値の推移

緑線がTOL群, 赤線がCAMR群, 青線がTCMR群のそれぞれの血清クレアチニン値の推移を示す。縦軸に血清クレアチニン値, 横軸に術後経過日数を示す。TOL群の腎機能は良好で, 術後378-5983日間の観察期間中, 血清クレアチニン値1.0-1.8 mg/dlで推移した (A)。これに対して, CAMR群では, 術後200日以後に徐々に腎機能の低下が見られた (B)。また, TCMR群ではほとんどの症例で免疫抑制中止後すぐに血清クレアチニン値の急激な上昇が見られた (C)。

移植腎の免疫寛容における免疫学的動態の機序解明



NDAR: no diagnostic abnormalities recognized, TOLS: Treg-rich organized lymphoid structures

図3. 各グループの病理組織学的所見

TOL群の代表的レシピエントであるM8010の術後126日目 (A), 313日目 (B), ならびに796日目 (C) に採取した移植腎生検では、拒絶反応を示唆する所見は認めなかった。術後313日目および796日目の所見として、間質に塊状のリンパ球集簇が観察され (B, C), Foxp3免疫染色では、Foxp3陽性細胞 (茶色) を認めた (D)。また、Foxp3細胞の分布を検証するため、CD4とFoxp3の二重免疫染色 (二重陽性細胞：青茶色) を行ったところ、CD4⁺Foxp3⁺を多く含む多数のリンパ球から構成されており (E), Treg rich organized structure : TOLS (後述) が示唆された。

CAMR群の代表的レシピエントであるM8110の術後105日目 (F), 217日目 (G) に採取した移植腎生検では拒絶反応と診断されなかったが、術後663日目の移植腎生検では、糸球体基底膜の二重化を認め、慢性移植糸球体症と診断された (H)。C4d染色では、傍尿細管毛細血管に線状沈着 (茶色) を認めた (I)。

TCMR群のM3115では、術後54日目に採取した移植腎生検ではボーダーライン変化の所見であったが (J), 術後116日目の剖検では著明なリンパ球浸潤と動脈内膜炎を認めた (K, L)。

腎機能障害を認め、術後116日目の剖検では著明なリンパ球浸潤と動脈内膜炎を認めた(図3K, L)。

3. mRNA発現の経時的変化

移植腎の各種mRNAの経時的変化を見ると、移植後の時期によって発現レベルが変わることが観察された。その著明な例としてTOL群における*FOXP3*や*GATA3*などの転写因子、あるいは*IL2*, *IL10*, *TGFβ*などのサイトカインのmRNAは、CAMRとTCMRの両群と比較して、移植後早期は非常に高い発現を示したが、その後徐々に低下し、3~4年後にはほとんど術前レベルに復する傾向にあった。それに対し、CAMR群における*CAV1*, *MALL*, *VWF*, *TEK*, *ROBO4*, *SOX7*, *PECAM1*などの血管内皮細胞増殖因子は移植後1年以内の段階からすでに高く発現し、腎機能不全になるまで高いレベルで維持される傾向にあった(図4)。このことから、移植腎における各種mRNAの発現は経時的な変化が顕著で、結果の解釈には移植後の時間的要素を考慮することが重要と考えられた。

4. 移植後早期(1年以内)および1年以降でのmRNA発現

TOL群, CAMR群, TCMR群の3群間における移植後1年以内および1年以降における53種類の移植腎mRNAの比較検討結果を表3に示す。

まずT細胞に関連するmRNAとしては、*CD3*, *CD4*, *CD8*がTCMR群に有意に高く発現していたが、T細胞浸潤が著明なTCMR群においては当然の結果であると考えられる(図5A)。今回、B細胞に関連するmRNAとしては*MS4A1(CD20)*のみしか検討していないが、その*MS4A1(CD20)*がCAMR群において移植後1年以内の段階からTOL群と比較して有意に高く発現し、1年以降においてもCAMR群に高い発現を認め、B細胞の活性化が示唆された(図5A)。

転写因子としては、移植後早期においてTOL群に*FOXP3*, *GATA3*, *RORγt*が有意差を持って高く発現していた(図5A)。また*FOXP3*, *GATA3*は移植後1年以降も、同様な傾向が認められ、有意に高い傾向にあった(図5A)。

内因性のアポトーシスに関連するmRNAとしては、*BCL2*が移植後早期においてTOL群に有意に高く発現していた(図5A)。

サイトカインでは*IL6R*が移植後早期において、*IL10*は移植後1年以降にTOL群で有意に高い値を示した(図5B)。一方、*IL1RL1*, *IL4*, *IFNG*, *CXCL11*, *GZMB*, *GPLY*, *FCGR3A(CD16a)*などの炎症に関連するサイトカイン、細胞障害性顆粒、NK細胞表面マーカーは、まだ組織学的に拒絶反応と診断されていない移植後早期の段階でもTCMR群に有意に高く発現していた(図5B, C)。

血管内皮細胞増殖因子では、*ROBO4*, *TEK*, *SOX7*, *PECAM1*, *CAV1*, *MALL*などが移植後早期からCAMR群に有意に高く、DSAによる血管内皮細胞の傷害が示唆された(図5C)。さらに1年以降でも*PECAM1*, *CAV1*, *MALL*, *VWF*, *DARC*などがCAMR群で有意に高く見られた(図5C)。

なお、腎移植と骨髄移植を同時に行った症例と、4ヶ月前に腎

移植をしてから骨髄移植した症例では、両者においてプロトコルによる統計的な有意差は認められなかった。

5. ROC曲線を用いたバイオマーカーの評価

移植予後を予測するためのバイオマーカーとしての妥当性を検討するため、術後早期(1年以内)の段階において発現している遺伝子発現で有意差のあったものをReceiver operating characteristic curve (ROC) 曲線を用いて評価した。TOL群における*FOXP3*のROC曲線では、CAMR群と比較しAUC (ROC曲線における曲線下面積) は0.83と適度な精度であり、*FOXP3*は免疫寛容を予後予測する上で優れたバイオマーカーであることが示された(図6)。この時のカットオフ値は36.5であり、感度は0.80、特異度は0.68であった。一方で、CAMR群における*CAV1*, *VWF*のROC解析では、TOL群と比較しAUCはそれぞれ0.74, 0.71と適度な精度であり、*CAV1*, *VWF*は慢性拒絶反応を予測する上で有用なバイオマーカーになりうることを示唆された。この時のそれぞれのカットオフ値は68.5, 112.9であり、感度は0.71, 0.71、特異度は0.63, 0.54であった。

考 察

これまでの研究で免疫寛容の機序には、中枢性寛容と末梢性寛容があることが示されてきた。中枢性寛容では、T細胞は胸腺、B細胞は骨髄において、それぞれの分化の過程で自己反応性を示す細胞のクローンはプログラム細胞死により死滅する。一方、末梢性寛容では、不応答、抗原の隔絶や無視、アポトーシス、制御性T細胞(regulatory T cell: Treg)による抑制などの多岐にわたる機序により、中枢性寛容で処理されずに成熟した自己反応性細胞は排除または不活性化されている(26)。

ドナー骨髄移植による混合キメラの誘導は、免疫寛容を達成するため最も有効な方法であると現在考えられており(27)、臨床の腎移植でもその成功例が報告されている(14-17)。しかしながら、マウスの皮膚移植における実験では、安定した持続的な混合キメラを誘導することが、免疫寛容を誘導するために必須であることが示されている(10)。これは、マウスの皮膚移植の寛容の機序が胸腺におけるclonal deletionによる中枢性の免疫寛容であるからと考えられる(10, 28, 29)。これに対して、MGHのプロトコルで成功した腎移植の免疫寛容は、一時的な混合キメラでも誘導されており、胸腺における寛容の機序では説明できない。MGHでのこれまでの研究においてYamadaらは、ドナー特異的免疫寛容が既に獲得されたカニクイザル6匹に対して*IL-2*を約2週間反復皮下注する事により、免疫寛容が再現性を持って破綻されることから、免疫寛容の状態では末梢性にドナー反応性のT細胞が抑制されていると提唱している(末梢性の免疫寛容)(30)。さらに、Tonshoらはカニクイザルの心移植における実験では、腎移植と同様のプロトコルを用いても、同じような一時的な混合キメラで免疫寛容は誘導されず(31)、腎臓を同時に移植することにより、免疫寛容が誘導されることを示している(32, 33)。これらの観察より、移植腎自体も免疫寛

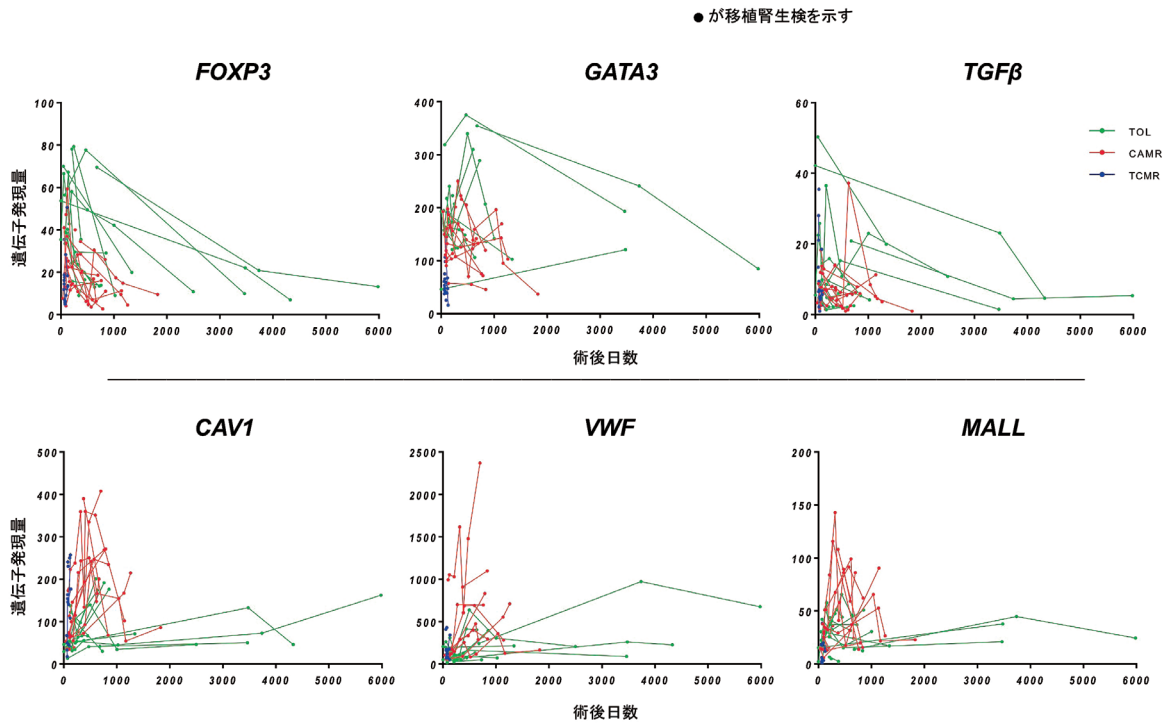


図4. mRNA発現の経時変化

緑線がTOL群、赤線がCAMR群、青線がTCMR群の遺伝子発現の移植後推移を示す。縦軸に遺伝子発現量、横軸に術後経過日数を示す。TOL群における*FOXP3*、*GATA3*などの転写因子、*TGFβ*などのサイトカインのmRNAは、CAMRとTCMRの両群と比較して、移植後早期は非常に高い発現を示し、その後徐々に低下し、3～4年後にはほとんど術前レベルに復する傾向にあった。それに対し、CAMR群における*CAV1*、*MALL*、*VWF*などの血管内皮細胞増殖因子は移植後1年以内の段階からすでに高く発現し、腎機能不全になるまで高いレベルで維持される傾向にあった。

表3. 53種類の移植腎mRNA発現の比較検討結果

遺伝子シンボル	概要	TOL vs TCMR	CAMR vs TCMR	TOL vs CAMR	TOL vs CAMR	遺伝子シンボル	概要	TOL vs TCMR	CAMR vs TCMR	TOL vs CAMR	TOL vs CAMR
		<1 year			1 year<			<1 year			1 year<
CD3D	T cell		**			KLRF1	NK				
CD4	Th	****	**		*	CAV1	Endothelium	*		*	***
CD8A	CTLs					VWF	Endothelium			*	*
MS4A1	B cell		*			MALL	Endothelium	*	**		*
FOXP3	Treg	****		***	*	DARC	Endothelium				*
GATA3	Inflammation	****	***		**	TEK	Endothelium	**	****		
RORγt (RORC)	Immature thymic	****	****			ROBO4	Endothelium	*	**		
TBX21 (T-bet)	Inflammation					SOX7	Endothelium		*		
BCL2	Anti-apoptotic	**	*			PECAM1	Endothelium		***		*
EPO	Erythropoiesis			*		PALMD	Endothelium		**		
IL1RL1	Th2	**	**			CDH13	Endothelium				
IL2	Th1					CDH5	Endothelium		**		
IL4	Th2	****	***			CD34	Endothelium		*		
IL6R	Tfh	**		*		KLF4	Endothelium				
IL10	Th2				**	SELE	Endothelium				
IL17	Th17					THBD	Endothelium		**		
IL21	Th/NK					PLA1A	Endothelium				
TGFB1	Treg					PLAT	Endothelium			*	
IFNG	Inflammation	****	****			PSMB10	Endothelium				
GZMB	NK/CTL	****	****			RHOJ	Endothelium	*			*
GNLY	NK/CTL	****	***			CD74	Inflammation				
CXCL11	IFNG-induced	****	**			TNF	Inflammation				
FCGR3A	NK	****	**		*	TRIB1	Inflammation	*			*
SH2D1B	NK	****	**			ICOS	Tfh				
FGFBP2	NK				*	RPS6	mTOR pathway				
CX3CR1	NK				*	RPS6KB1	mTOR pathway	**	**		
MYBL1	NK				*						

* TOLに高値
* CAMRに高値
* TCMRに高値

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

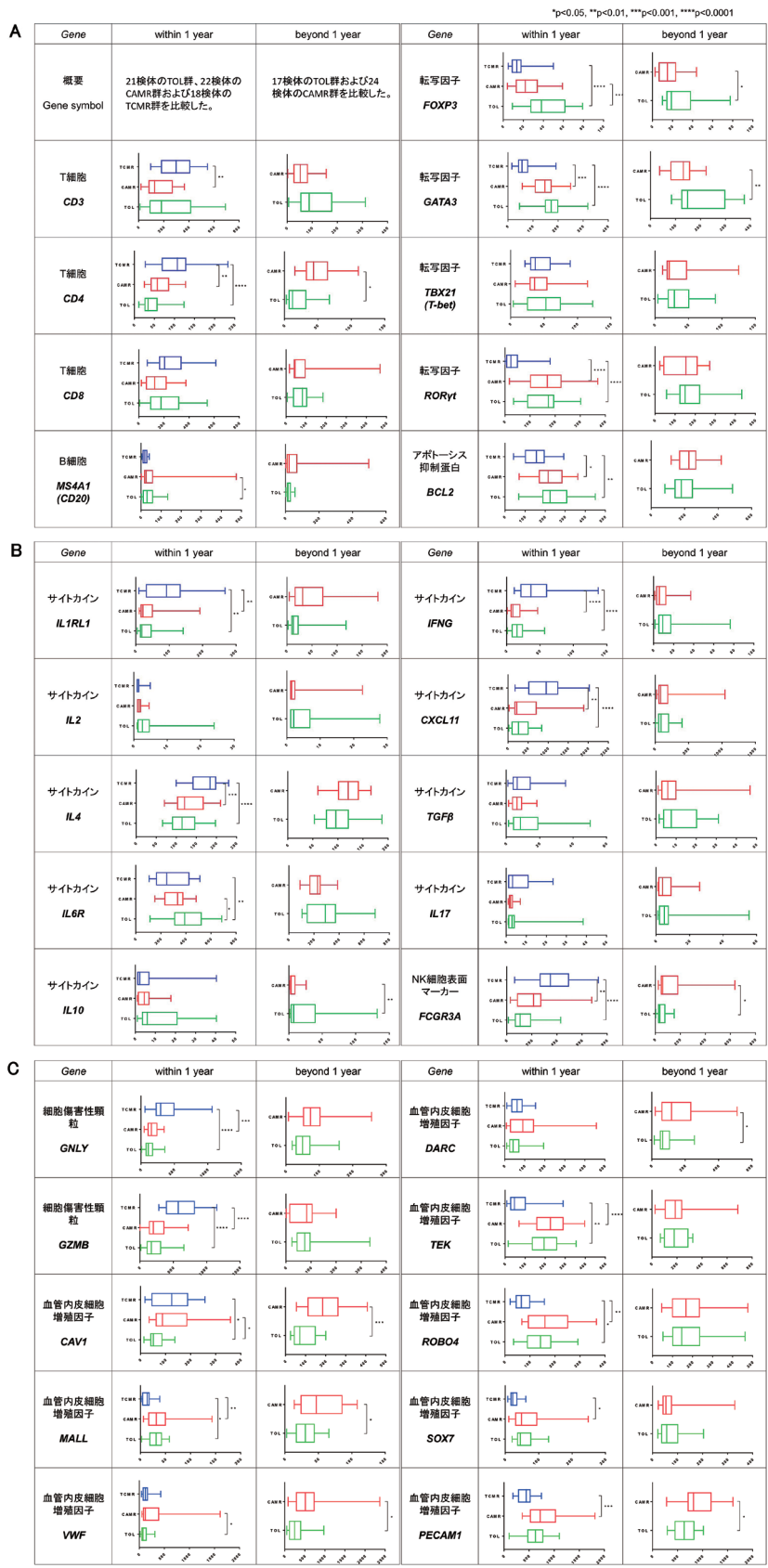


図5. 移植後早期 (1年以内) および1年以降でのmRNA発現
 図5AはT細胞およびB細胞表面マーカーと転写因子のmRNA発現を示す。図5Bは炎症性サイトカインとNK細胞表面マーカーのmRNA発現を示す。図5Cは細胞傷害性顆粒と血管内皮細胞増殖因子のmRNA発現を示す。
 移植後早期 (1年以内) の段階での遺伝子発現を3つのグループ間 (TOL群, CAMR群, TCMR群) において比較検討した。また, 移植後1年以降は2つのグループ間 (TOL群, CAMR群) において比較検討した。群間比較はPiecewise mean differences and unadjusted raw p values of the pair-wise contrastsを用いて解析し, p値は0.05以下を有意差ありとした。

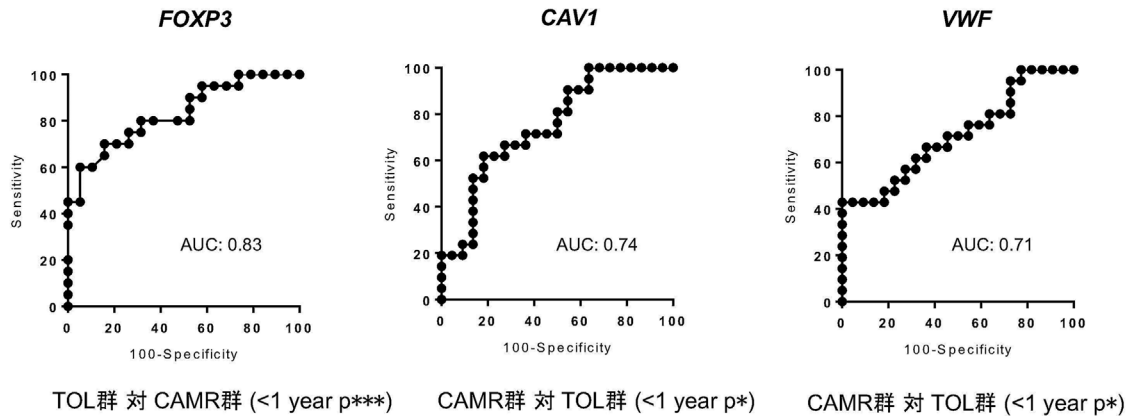


図6. ROC曲線を用いたバイオマーカーの評価

ROC (Receiver operating characteristic) 曲線は縦軸に感度、横軸に偽陽性率 (=1-特異度) をとって、カットオフ値を変動させながらプロットした。ROC曲線の下面積 (Area under curve : AUC) が0.9以上のモデルが高精度、0.7-0.9が適度な精度、0.7-0.5は低精度とした。

容の誘導に大きく関係していると考えられる。

そこで本研究では、移植腎における免疫反応の動態を研究するために、カニクイザルにおける混合キメラによる免疫寛容誘導の腎骨髄同時移植モデルで採取されたFFPEサンプル256検体を対象とし、主だった免疫反応に関する53種類のmRNAについて後方視的検討した。これまで、MGHの研究室ではRT-PCRにより移植腎のmRNA解析は行ってきたが、PCRのための増幅バイアスが大きく信頼できる結果を得られなかった。

今回の研究で用いたNanoString遺伝子発現解析 (nCounter Analysis System) は、トランスレーショナルリサーチのための解析方法で、2008年に初めて導入されて以来、バイオマーカー探索や検証を含む幅広い基礎研究分野において導入されている。従来のようにPCRを使用しないため、増幅バイアスがなく、再現性の高い結果が得られる遺伝子解析方法である。nCounterはデジタル分子バーコード技術に基づいた分子をダイレクトにカウントするシステムであり、最大800種類のRNAやDNAをシングルチューブで迅速かつ高精度に解析することが可能とされている(34)。これまでホルマリン固定標本 (FFPE) から調整したサンプルは、mRNAの分解が進んでいることがあり、回収率が低いことが難点とされていた。しかしながら、NanoString遺伝子発現解析は、FFPEから抽出したmRNAでも安定した結果が得られるのが大きな特徴であり(35)、これによって今回初めてMGHにおいて過去25年間にわたり採取し保存されていたFFPEサンプルのmRNA解析が可能となった。TOL群のサルの中には、最長の観察期間が15年に及ぶ症例もあり、TOL群における免疫寛容の安定性は十分に確認されたと考えている。

本研究の結果を解析して最初に観察されたことは、mRNAの発現は同じTOL群でも移植後の時期によって大きく異なるということであった。このため、TOL群と拒絶群を比較するために、移植後1年以内と1年以降で分けて検討した。任意に1年で結果

の解析を区切った理由としては、TOL群に特徴的なmRNAが1年以内であればまだ高値を維持しているということもあるが、臨床的に有用な予後予測バイオマーカーを同定するという目的もあった。また、1年以内であればCAMRの病理組織学的所見はまだ慢性拒絶反応の早期の段階にあり、免疫抑制をその段階で再開すれば、その後の予後を好転できる可能性があるからである。

256移植腎検体の解析の結果、1年以内、1年以降に関わらずTOL群でCAMR、TCMR群と比較して最も有意に高かったのはFOXP3であった。特に最も重要なCAMR群との比較において、1年以内で $p < 0.001$ の非常に高い有意差を示したのはFOXP3のみであった。これは、TOL群の病理組織学的所見でしばしば観察されるTOLS (Treg-rich organized lymphoid structures) を客観的に裏付ける結果としても興味深い。一方、CD4のmRNAはTCMRで有意に高かったが、これは $CD4^+CD25^-$ あるいは $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ の活性化T細胞の浸潤が多いためと考えられる。今回の研究では区別できなかったが、このFOXP3発現が $CD8^+T$ 細胞の $CD25^+Foxp3^+CD8^+Treg$ である可能性もある(36)。しかし、最近のMGHでの研究でAoyamaらが報告したように、 $CD8^+Treg$ はT細胞活性化の抑制効果は明らかでないものの、 $CD4^+Treg$ に比較して数的に非常にマイナーなサブセットと考えられる(37)。さらにTOL群ではROR γ t、GATA3が有意に高く発現していたが、最近Yangらが報告しているように(38)、ROR γ tとFOXP3の共発現は安定したTreg機能と関連があるのかもしれない。またGATA3については、WangらがGATA3を欠損するTregは末梢における抑制機能やホメオスタシスを失ってしまうことを報告しており(39)、GATA3の共発現はTregの機能維持の面からも重要であると考えられる。

一時的な混合キメラによる移植腎の免疫寛容の機序として、ドナー特異的なTregの増殖が、Hottaらのin vitroの研究でも明

らかとなっている(40, 41)。そして、このドナー抗原刺激に特異的に増殖するTregは、非制御性T細胞がTregに変換された誘導性Tregであることも示された。さらに、このドナー特異的なTregの増殖はTGF- β を阻害することにより抑制され、ドナー特異的に無反応であったCD8⁺T細胞のドナー反応性も回復するということが判明した。このようなin vitroの観察と本研究による移植腎のmRNAの解析結果、さらに病理組織学的所見から、筆者は一時的な混合キメラによって誘導される移植腎の免疫寛容の機序について次のような仮説を立てている。1) まず、一時的な混合キメラ(ドナー骨髄細胞)が副刺激経路の阻害のもとにドナー抗原を提示することにより、ドナー抗原特異的なヘルパーT細胞が誘導される。2) このヘルパーT細胞は通常の炎症反応を誘導するようなサブセットではなく、Th3のようなサブセットを想定しているが(42)、移植腎内でこのようなヘルパーT細胞がドナー抗原によって刺激されると、Tregの分化を促すようなサイトカイン(TGF- β など)が産生され、3) 移植腎局所で非制御性T細胞からTregへと変換され、結果的に移植腎内はTregが豊富となり拒絶反応を抑制するように作用する(図7)(40, 41)。

共同研究者のColvinらも、マウス腎移植モデルで免疫寛容のモニタリグの一つの指標として、前述の移植腎に観察されるTregが豊富な塊状のリンパ節(Treg-rich organized lymphoid structures: TOLS)に注目しており、このTOLSが移植腎に形成されることが、免疫寛容誘導の機序として、重要な役割を果たしているものと考えている(43, 44)。

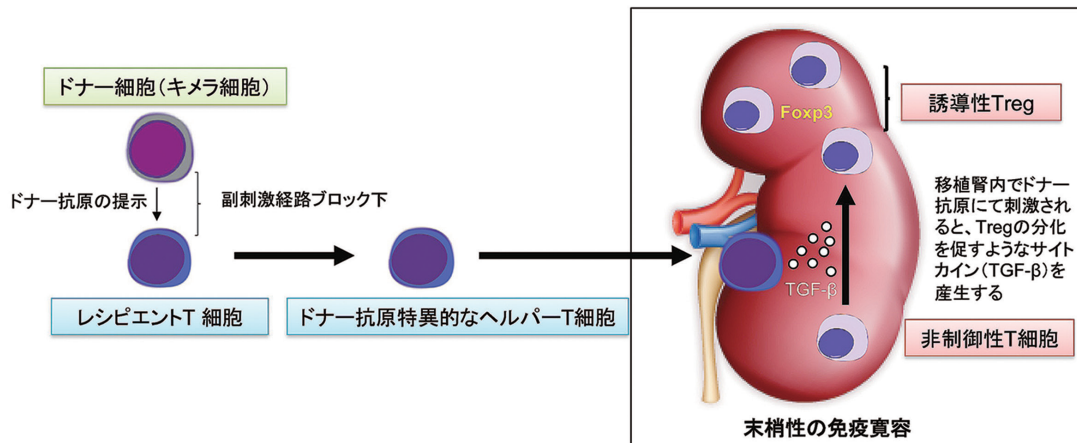
しかしながら、移植後早期の時点では高値であったFOXP3の発現が時間経過とともに低下していき、最終的にはbase lineの

レベルに復しても、免疫寛容が維持されていることに対しての明確な説明は今回の研究から導かれなかった。これには、末梢においてドナー抗原特異的なT細胞が完全に除去され(clonal deletion)(29)、最終的にはTregによる抑制が不要になるのかもしれないが、その解明は今後の課題と言える。

今回、筆者が移植腎で検討したB細胞に関連するmRNAはMS4A1(CD20)のみであったが、最近の研究ではMS4A1を含めて、IGKV1D-13, IGKV4-1, IGLL1などのB細胞関連遺伝子の発現が、ヒトの免疫寛容患者に高く発現していることが報告されている(45, 46)。移植臓器と末梢血の違いはあるが、今回の研究ではMS4A1が特にTOL群に高いという結果は得られなかった。免疫寛容とB細胞関連遺伝子の相関については、さらなる研究が必要と思われる。

Bcl-2は内因性のアポトーシスを抑制する要のタンパクである。これまでに、Rebollo-Mesaらはヒトの免疫寛容患者においては、BCL2発現が低下していたと報告しており(47)、Gabrielらもマウスにおいて、Bcl-2抑制によってエフェクターT細胞を選択的に抑制することで、免疫寛容を誘導したと報告している(48)。一方、最近のTaiらの研究では、マウスにおいてIL-2シグナルがTregにおけるBCL2発現を亢進させることにより、Foxp3のアポトーシスを抑制するとも報告している(49)。今回の研究では、移植後早期にBCL2発現がTOL群に高い結果であることが示されたため、後者を支持する結果であったが、他のアポトーシス関連遺伝子を含めてさらなる研究が必要と思われる。

TCMR群ではまだ組織学的に拒絶反応と診断されていない移植後早期の段階からIL1RL1, IL4, IFNG, CXCL11などの炎症性サイトカインや、GZMB, GNLVなどの細胞障害性顆粒に関する



移植腎局所で非制御性T細胞からTregへ変換が促進され、結果として移植腎内はTregが豊富となり、拒絶反応を抑制するよう作用する

図7. 一過性の混合キメラで誘導される免疫寛容のメカニズム(仮説)
一時的な混合キメラ(ドナー骨髄細胞)が副刺激経路ブロック下で、ドナー抗原を提示することにより、ドナー抗原特異的なヘルパーT細胞が誘導される。このヘルパーT細胞が移植腎内でドナー抗原によって刺激されると、Tregの分化を促すようなサイトカイン(TGF- β など)が産生され、移植腎局所で非制御性T細胞からTregへと変換が促進される。結果的に、移植腎内はTregが豊富となり拒絶反応を抑制するよう作用する。

mRNA, さらにはFCGR3A (CD16a)などのNK細胞表面マーカーに関連するmRNAがすでに高く発現していた。最近Halloranらは、急性拒絶反応に関連する炎症反応マーカーを明らかにするとともに、移植腎における分子学的評価は、移植腎生着改善のための解明に必要であると報告しているが(50)、今回の結果はこれら炎症性サイトカインをモニターすることで急性拒絶反応を事前に予測できる可能性を示した。一方、Tregに強く関連するサイトカインであるIL2, IL10, TGFβはTOL群において高い傾向を示したが、この結果はFOXP3が高いことに一致する結果と考えられる。

血管内皮細胞増殖因子に関するmRNAであるが、CAMR群は移植後早期の段階からCAV1, MALL, VWF, TEK, ROBO4, SOX7, PECAM1等が高く発現していた。慢性拒絶反応の発症メカニズムはDSAの血管内皮への結合によって引き起こされる内皮障害で、補体の活性化が主な作用機序として考えられている。慢性拒絶反応の補体活性化は、DSAが内皮細胞膜上のドナー抗原に結合後にC1qから始まる古典的経路の活性化である。C4dはC4活性化の最終分解産物で、安定的で長期間細胞膜上にとどまるため、内皮細胞のC4d沈着は慢性拒絶反応の補体活性化の良い指標となる(24)。したがって、移植後早期から血管内皮細胞増殖因子が高く発現するという事は、慢性拒絶反応を予測するための重要な知見と考えられた。今回の結果は、VWF, DARC, CAV1の3遺伝子特性が慢性拒絶反応の程度と相関し、診断の予測バイオマーカーになりうるというAdamらの報告(25)とも一致する結果であった。

本研究のもう一つの目的は、免疫寛容を予測できる有効なバイオマーカーの同定にあった。このため、臓器移植後に安全に免疫抑制療法を軽減し中止するために、特に移植後早期(1年以内)の段階での遺伝子発現に注目して検討した。前述のように、TOL群とCAMR, TCMR群の間で最も顕著な有意差が見られたFOXP3であったが、ROC曲線ではTOL群はCAMR群と比較し、AUCは0.83であり、免疫寛容を予測する上で有用であることが示唆された。また、CAV1, VWFのROC解析ではTOL群と比較しAUCはそれぞれ0.74, 0.71であり、慢性拒絶反応を予測する上で有用なバイオマーカーになりうることを示唆された。移植後1年以内には、まだ慢性拒絶反応の病理組織学的所見が確立されていない時期であるため、この時点での予後予測は臨床的に極めて重要であると考えられる。

免疫寛容の予後予測バイオマーカーの今後の課題としては、より非侵襲的で簡便な検査法の開発も望まれる。最近の研究で、腎移植術後3日目～12ヶ月後に採取した尿中細胞のCD3ε mRNA, IP-10 mRNA, 18S rRNAの遺伝子発現量が、腎移植後の急性拒絶反応の予後予測マーカーとして報告されている(51)。このような報告を踏まえて、今後は免疫寛容誘導のバイオマーカー探索においても、尿中や血液中に含まれる細胞からFoxp3などの遺伝子発現量を測定し、今回の移植腎mRNA発現との相関を解明していきたい。

本研究結果の解釈には後方視的な研究であるための限界があるが、今後は本研究をもとに前方視的な研究を進めていく予定である。

結 論

今回の研究により、一時的な混合キメラによる移植腎免疫寛容に移植腎内のFoxp3⁺Tregの関与が強く示唆された。また、TCMRには炎症性サイトカイン、CAMRにおいては血管炎としての免疫反応がそれぞれ特徴的であった。また、移植後早期の移植腎におけるFOXP3の発現は、混合キメラによる免疫寛容誘導の予後予測のために有効なバイオマーカーとなりうると考えられた。今後、免疫寛容特有のバイオマーカーをさらに確立していくことによって、治療成績の向上へ繋がっていくことを期待したい。

助 成

本研究はNIH (National Institutes of Health) Nonhuman Primate Transplantation Tolerance Cooperative Study Groupからの助成を受けた。

利益相反の開示

本論文の内容に関して利益相反はない。

本稿を終えるにあたり、ご協力を賜りました金沢医科大学 泌尿器科学 宮澤克人教授に深く感謝申し上げます。併せて、本研究を遂行するにあたり、ご指導を賜りましたハーバード大学 マサチューセッツ総合病院 外科 河合達郎教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- Hart A, Smith JM, Skeans MA et al: OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report: Kidney. Am J Transplant 2018; **18 Suppl 1**: 18-113.
- Marcén R: Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection. Drugs 2009; **69**: 2227-43.
- Madariaga ML, Spencer PJ, Shanmugarajah K et al: Effect of tolerance versus chronic immunosuppression protocols on the quality of life of kidney transplant recipients. JCI Insight 2016; **1**: pii: e87019.
- London NJ, Farmery SM, Will EJ et al: Risk of neoplasia in renal transplant patients. Lancet 1995; **346**: 403-6.
- Sasaki H, Oura T, Spitzer TR et al: Preclinical and clinical studies for transplant tolerance via the mixed chimerism approach. Hum Immunol 2018; **79**: 258-65.
- Owen RD: IMMUNOGENETIC CONSEQUENCES OF VASCULAR ANASTOMOSES BETWEEN BOVINE TWINS. Science 1945; **102**: 400-1.
- Anderson D, Billingham RE, Lampkin GH et al: The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle. Heredity 1951; **5**: 379-97.
- Billingham RE, Brent L, Medawar PB: 'Actively Acquired Tolerance' of Foreign Cells. Nature 1953; **172**: 603-6.
- Sharabi Y, Sachs DH: Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen. J Exp Med 1989; **169**: 493-502.
- Tomita Y, Khan A, Sykes M: Role of intrathymic clonal deletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a nonmyeloablative regimen. J Immunol 1994; **153**: 1087-98.

11. Kawai T, Cosimi AB, Colvin RB et al: Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 1995; **59**: 256-62.
12. Kawai T, Poncelet A, Sachs DH et al: Long-Term Outcome and Alloantibody Production in a Non-Myeloablative Regimen for Induction of Renal Allograft Tolerance. *Transplantation* 1999; **68**: 1767-75.
13. Kawai T, Sogawa H, Boskovic S et al: CD154 blockade for induction of mixed chimerism and prolonged renal allograft survival in nonhuman primates. *Am J Transplant* 2004; **4**: 1391-8.
14. Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR et al: HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 2008; **358**: 353-61.
15. Kawai T, Sachs DH, Sykes M et al: HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 2013; **368**: 1850-2.
16. Kawai T, Sachs DH, Sprangers B et al: Long-term results in recipients of combined HLA-mismatched kidney and bone marrow transplantation without maintenance immunosuppression. *Am J Transplant* 2014; **14**: 1599-611.
17. Kawai T, Leventhal J, Wood K et al: Summary of the Third International Workshop on Clinical Tolerance. *Am J Transplant* 2018 Aug 22. doi: 10.1111/ajt.15086. [Epub ahead of print]
18. O'Connor SL, Blasky AJ, Pendley CJ et al: Comprehensive characterization of MHC class II haplotypes in Mauritian cynomolgus macaques. *Immunogenetics* 2007; **59**: 449-62.
19. Pendley CJ, Becker EA, Karl JA et al: MHC class I characterization of Indonesian cynomolgus macaques. *Immunogenetics* 2008; **60**: 339-51.
20. Thaiss CC, Oura T, Sasaki H et al: Importance of Hematopoietic Mixed Chimerism for Induction of Renal Allograft Tolerance in Nonhuman Primates. *Transplantation* 2018 Oct 8. doi: 10.1097/TP.0000000000002470. [Epub ahead of print]
21. Reeve J, Sellarés J, Mengel M et al: Molecular diagnosis of T cell-mediated rejection in human kidney transplant biopsies. *Am J Transplant* 2013; **13**: 645-55.
22. Sellarés J, Reeve J, Loupy A et al: Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *Am J Transplant* 2013; **13**: 971-83.
23. Smith RN, Matsunami M, Adam BA et al: RNA expression profiling of nonhuman primate renal allograft rejection identifies tolerance. *Am J Transplant* 2018; **18**: 1328-39.
24. Smith RN, Adam BA, Rosales IA et al: RNA expression profiling of renal allografts in a nonhuman primate identifies variation in NK and endothelial gene expression. *Am J Transplant* 2018; **18**: 1340-50.
25. Adam BA, Smith RN, Rosales IA et al: Chronic Antibody-Mediated Rejection in Nonhuman Primate Renal Allografts: Validation of Human Histological and Molecular Phenotypes. *Am J Transplant* 2017; **17**: 2841-50.
26. Xing Y, Hogquist KA: T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; **4**: a006957.
27. Sykes M: Immune monitoring of transplant patients in transient mixed chimerism tolerance trials. *Hum Immunol* 2018; **79**: 334-42.
28. Sykes M, Sheard MA, Sachs DH: Graft-versus-host-related immunosuppression is induced in mixed chimeras by alloresponses against either host or donor lymphohematopoietic cells. *J Exp Med* 1988; **168**: 2391-6.
29. Morris H, DeWolf S, Robins H et al: Tracking donor-reactive T cells: Evidence for clonal deletion in tolerant kidney transplant patients. *Sci Transl Med* 2015; **7**: 272ra10.
30. Yamada Y, Nadazdin O, Boskovic S et al: Repeated Injections of IL-2 Break Renal Allograft Tolerance Induced via Mixed Hematopoietic Chimerism in Monkeys. *Am J Transplant* 2015; **15**: 3055-66.
31. Kawai T, Cosimi AB, Wee SL et al: Effect of mixed hematopoietic chimerism on cardiac allograft survival in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 2002; **73**: 1757-64.
32. Tonsho M, Benichou G, Boskovic S et al: Successful Tolerance Induction of Cardiac Allografts in Nonhuman Primates through Donor Kidney Co-Transplantation. *Am J Transplant* 2013; **13 Suppl 5**: 181-2.
33. Tonsho M, Michel S, Ahmed Z et al: Heart transplantation: challenges facing the field. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; **4**: pii: a015636.
34. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B et al: Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol* 2008; **26**: 317-25.
35. Adam B, Afzali B, Dominy KM et al: Multiplexed color-coded probe-based gene expression assessment for clinical molecular diagnostics in formalin-fixed paraffin-embedded human renal allograft tissue. *Clin Transplant* 2016; **30**: 295-305.
36. Nigam P, Velu V, Kannanganat S et al: Expansion of FOXP3⁺CD8⁺T cells with suppressive potential in colorectal mucosa following a pathogenic simian immunodeficiency virus infection correlates with diminished antiviral T cell response and viral control. *J Immunol* 2010; **184**: 1690-701.
37. Aoyama A, Klarin D, Yamada Y et al: Low-dose IL-2 for In vivo expansion of CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells in nonhuman primates. *Am J Transplant* 2012; **12**: 2532-7.
38. Yang BH, Hagemann S, Mamareli P et al: Foxp3⁺ T cells expressing RORgammat represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 2016; **9**: 444-57.
39. Wang Y, Su MA, Wan YY: An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells. *Immunity* 2011; **35**: 337-48.
40. Hotta K, Aoyama A, Oura T et al: Induced regulatory T cells in allograft tolerance via transient mixed chimerism. *JCI Insight* 2016; **1**: pii: e86419.
41. Hotta K, Oura T, Dehnadi A et al: Long-term Nonhuman Primate Renal Allograft Survival Without Ongoing Immunosuppression in Recipients of Delayed Donor Bone Marrow Transplantation. *Transplantation* 2018; **102**: e128-36.
42. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK et al: Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol* 2007; **178**: 179-85.
43. Miyajima M, Chase CM, Alessandrini A et al: Early acceptance of renal allografts in mice is dependent on foxp3+ cells. *Am J Pathol* 2011; **178**: 1635-45.
44. Yang C, Farkash E, Ndishabandi D et al: Treg-Rich Organized Lymphoid Structures (TOLS) in Spontaneously Accepted Mouse Kidney Allografts. *Am J Transplant* 2016; **16 Suppl 3**: 511-2.
45. Chesneau M, Pallier A, Braza F et al: Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am J Transplant* 2014; **14**: 144-55.
46. Newell KA, Asare A, Kirk AD et al: Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; **120**: 1836-47.
47. Rebollo-Mesa I, Nova-Lamperti E, Mobillo P et al: Biomarkers of Tolerance in Kidney Transplantation: Are We Predicting Tolerance or Response to Immunosuppressive Treatment? *Am J Transplant* 2016; **16**: 3443-57.
48. Gabriel SS, Bon N, Chen J et al: Distinctive Expression of Bcl-2 Factors in Regulatory T Cells Determines a Pharmacological Target to Induce Immunological Tolerance. *Front Immunol* 2016; **7**: 73.
49. Tai X, Erman B, Alag A et al: Foxp3 transcription factor is proapoptotic and lethal to developing regulatory T cells unless counterbalanced by cytokine survival signals. *Immunity* 2013; **38**: 1116-28.
50. Halloran PF, Famulski KS, Reeve J: Molecular assessment of disease states in kidney transplant biopsy samples. *Nat Rev Nephrol* 2016; **12**: 534-48.
51. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R et al: Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med* 2013; **369**: 20-31.

Studies on Mechanisms of Renal Allograft Tolerance via the Mixed Chimerism Approach and Biomarkers for Predicting Tolerance

Masatoshi Matsunami

*Center for Transplantation Sciences, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School,
55 Fruit Street, Boston, MA 02114, USA*

Background: Renal allograft tolerance has been successfully induced in humans by the induction of chimerism. Clarifying the mechanisms underlying tolerance and identifying biomarkers to accurately predict tolerance are critically important for the application of the tolerance approach in clinical organ transplantation.

Materials & Methods: Using the NanoString nCounter platform, 53 mRNAs were retrospectively studied in 256 kidney allograft formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) serial samples taken from non-human primate recipients of combined kidney and bone marrow transplantation. The results were analyzed by dividing recipients into three groups: tolerance (TOL, n=14), chronic antibody-mediated rejection (CAMR, n=13) and T cell-mediated rejection (TCMR, n=15).

Results: Dynamic time-dependent kinetics of the intragraft mRNA expression were found, indicating that the timing of the analysis is critical for interpreting the results. The most prominent difference observed among the three groups was in *FOXP3*, which was significantly higher in the TOL group than in the other groups both early (<1 year) and late (≥1 year) after

transplantation. Other mRNAs potentially related to regulatory T cells (Tregs), such as *IL10*, *TGFβ* and *GATA3*, were also highly expressed in the TOL group, which suggested critical roles of Tregs in the induction and maintenance of renal allograft tolerance. In contrast, transcripts of inflammatory cytokines or adaptive immunity (*IFNG*, *CXCL11*, *FCGR3A*, *GNLY*, *GZMB*, *IL4* and *IL1RL1*) were more highly expressed in the TCMR group, while endothelium associated transcripts, such as *CAVI*, *MALL*, *VWF*, *TEK*, *ROBO4*, *SOX7* and *PECAMI1*, were more highly expressed in the CAMR group. Receiver operating characteristic analyses revealed that intragraft *FOXP3* mRNA reliably differentiate TOL from CAMR (area under the curve: 0.83).

Conclusion: Intragraft enrichment of Foxp3⁺Tregs may be an important mechanism of renal allograft tolerance induced by transient mixed chimerism. Gene signatures specific to tolerance or rejection can be useful biomarkers for reliably predicting the long-term results of the allograft after the induction of mixed chimerism.

Key Words: tolerance, FOXP3, mixed chimerism, kidney transplantation, NanoString platform