

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10025

研究課題名(和文) ヒト化マウスを用いた同種/異種抗体関連型拒絶反応の新規制御法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel regulating method for allogeneic or xenogeneic antibody-mediated rejection using a humanized mouse

研究代表者

田原 裕之 (TAHARA, HIROYUKI)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：30423354

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)：ヒト細胞を用いたHLA抗体産生ヒト化マウスモデルを確立するため、抗体産生B細胞を活性化させるための伝達シグナル(CD40-CD40ligand)を遺伝子導入した培養系でヒトの末梢血を培養し、HLA抗体産生ヒト化マウスが誕生した。しかし目的とした抗ドナー特異的HLA抗体産生のみが産生抑制に傾いている現象を認めた。ドナー特異的抗体産生抑制機序を検証し得るマウスモデルである可能性が示された。また異種抗体産生ヒト化マウスモデルは異種抗原を欠損する免疫不全マウスを産生できたが、安定性に欠けるためヒト細胞を移入したヒト化異種抗体産生マウスモデルは未だ確立できていない。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a HLA antibody-producing humanized mouse model using human cells, human peripheral blood was cultured in a culture system in which a transduction signal (CD40-CD40 ligand) for activating antibody-producing B cells was transfected, and HLA antibody-producing humanized mice were born. However, only the target anti-donor-specific HLA antibody production was found to be inclined to inhibit production. Indicating the possibility of being a mouse model capable of verifying the mechanism of donor specific antibody production inhibition. Heterologous antibody-producing humanized mouse models could produce immunodeficient mice lacking heterologous antigens, but since they are not stable, humanized heterologous antibody-producing mouse models transfected with human cells have not been established yet.

研究分野：移植免疫

キーワード：異種移植 同種移植 ヒト化マウス

1. 研究開始当初の背景

移植成績の向上により長期生着例も多く見られるようになったが、慢性拒絶反応により難治性のグラフト機能不全に陥ることが問題視されている。慢性拒絶反応のメカニズムとしてドナー白血球抗原(HLA)に対するHLA抗体による抗体関連型拒絶反応が原因として挙げられるが、明確な機序は現在も明らかにされていない。マウス細胞によるメカニズム解析の報告はあるが、臨床に直結したヒト細胞での報告は皆無である。従来ヒト化マウスではB細胞・NK細胞・マクロファージなどのT細胞以外の免疫担当細胞の構築が不十分であったが、ヒト胎児由来胸腺細胞と幹細胞を重度免疫不全マウス(NOD/SCID)に同時投与することにより、T細胞のみならずB細胞、マクロファージの十分な機能性を示すヒト免疫構築細胞を持つマウス(ヒト化マウス)の作製が可能となり、これまでの研究で、本邦で入手困難なヒト胎児組織の代わりにヒト臍帯血幹細胞を用いても各免疫担当細胞を構築し得ることが確認された。また、ヒト化マウスにアロ(同種異系)の末梢血ないし皮膚組織を移植したところ、十分なヒトIgG産生が得られることが証明された。このヒトIgG抗体産生ヒト化マウスモデルが構築されたことにより、ヒト細胞における慢性抗体性拒絶反応メカニズムのin vivo解析や新規治療法の開発が可能になった。

一方で、移植医療におけるドナー不足の問題は依然として全世界的に深刻な問題である。その究極的解決策として再生医療やブタをドナーとする異種移植の研究が国際的に盛んに行われてきた。再生医療の研究成果は目覚ましいが、臓器の生理的な3次元構築に課題も多く、すでに解剖学的に構築された異種臓器の移植が現実的であるとする意見もある。異種移植の問題は強力な異種免疫応答であるが、現在の課題として遅延型異種抗体性拒絶反応の克服が残されているが、これを克服することにより、異種移植は同種間移植に匹敵する長期成績が見込めるため、異種移植の臨床応用が期待されている。我々の教室では1992年より異種移植の基礎研究を続けてきた。その一つの成果はnon-Gal抗原(NeuGc)による異種抗体性拒絶反応の証明である。ヒトはNeuGc自然抗体を持つため、NeuGc抗原を発現するブタからヒトへの異種移植においてNeuGc抗原に対する抗体性拒絶反応の克服が必要とされることを世界で初めて証明した。これらの研究成果を進展すべく大動物モデルで証明するためにレシピエントとしてサルやヒヒを実験に用いたが、NeuGc抗体を持つ種はヒトと鳥に限られており、これらの大動物を用いた実験は遂行できない。そこで先述したヒト化マウスに着目し、異種抗体保有ヒト化マウスモデルの構築が研究を進める上で必要となっていたと考えた。

2. 研究の目的

我々は同種移植における慢性抗体性拒絶反応の克服と異種移植における遅延型抗体性拒絶反応の制御のため、ヒト細胞を用いたin vivo解析が可能なヒト化マウスモデルに着目し、これまでに同種異型抗体産生ヒト化マウスの作製と異種抗体産生ヒト化マウスの作製を行ってきた。本研究では、これらの研究成果を進展させていく。

同種異系抗体産生マウスモデルでは、まず抗ドナーHLA抗体の定量化と抗体産生細胞を同定する。次に、この抗ドナーHLA抗体産生細胞を特異的に制御する治療法開発を目指す。

異種抗体産生モデルでは、まずブタ膵島細胞を異種抗体産生ヒト化マウスに移植する異種膵島細胞移植モデルにおいてヒトNeuGc抗体による遅延型抗体性拒絶反応を確認する。次に既存の免疫抑制剤の投与や異種糖鎖抗原処理することによる遅延型抗体性拒絶反応の制御を試みる。

3. 研究の方法

1)ヒト化マウスモデルにおける抗ドナーHLA抗体の定量化と抗体産生細胞の同定：まず同種HLA抗体産生マウスモデルを確立する。重度免疫不全マウス(NSG)にヒト臍帯血由来CD34陽性幹細胞を静脈内ないし脾臓内投与し、ヒト免疫担当細胞の再構築を確認する。このヒト化マウスにHLA型の異なる健常人アロ末梢リンパ球を免疫し、ヒトIgG抗体産生を確認する。さらにこのヒト化マウス血清をLuminex法によりHLA抗体の定量化を行う。また末梢血のみでヒト化HLA抗体産生マウスモデルの作製を試みる。

健常人responderヒト末梢血とHLA型の異なる(アロ)放射線照射stimulatorヒト末梢血をB細胞活性化伝達シグナル(CD40-CD40ligand)を遺伝子導入したfeeder細胞上で3日間invitro共培養し、naïveNSGマウスに静注ないし脾臓内注射し抗ドナー特異的HLA抗体(DSA)産生を図る(図1)。

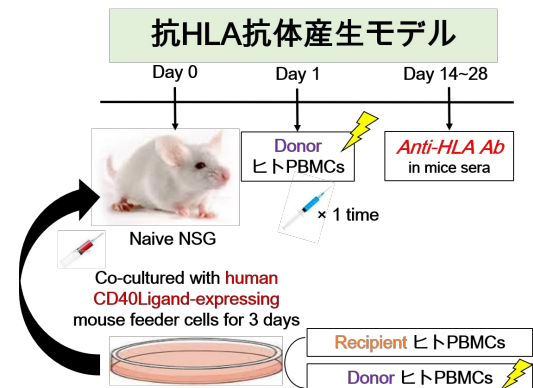


図1

2)異種抗体産生ヒト化マウスを用いた異種膵島移植モデルの確立：異種抗原Gal/NeuGcダブル欠損マウスと

NOD/SCID マウスを交配させて、ヒトと同様に異種 Gal および NeuGc 抗体を持つヒト化マウス(異種抗体産生ヒト化マウス)を継代作製する。その後 NeuGc 抗原陽性ブタ膵島を移植するヒト-ブタ異種膵島移植モデルを構築し生着率や遅延型拒絶反応の有無を検証する。

4. 研究成果

1)ヒト化マウスモデルにおける抗ドナー HLA 抗体の定量と抗体産生細胞の同定：同種 HLA 抗体産生マウスモデルにおいて、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性幹細胞を NSG マウスの脾臓内投与したほうが、マウス血清中のヒト IgG 抗体価が有意に上昇した。また静脈投与ならびに脾臓内投与の双方において全例ヒト IgG 抗体の検出が可能であった。さらに Luminex 法による HLA 抗体測定において高率に(90%以上)こうしたヒト化マウスにおいて抗 HLA 抗体の検出が可能であった。これは末梢血のみを用いたヒト化マウスモデルにおいても高率に HLA 抗体産生が確認可能であった。しかしながら DSA 産生するマウスはほぼ限定されており、このモデルにおいて、HLA 抗体産生は十分得られるものの DSA 産生は抑制されている可能性が示唆された(図2)。

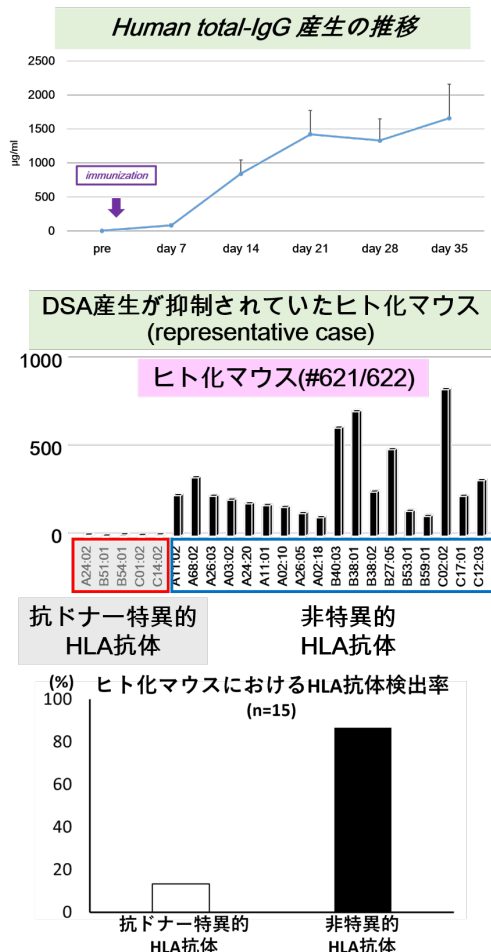


図2

そこで、B 細胞活性化し抗体産生を促進する別のシグナル(BAFF-BAFF 受容体)を追加で遺伝子導入した培養系や培養中の responder 細胞からヒト HLA 抗体産生を抑制する可能性の

ある CD4 陽性 CD25 陽性で分画される制御性 T 細胞を除去し同様にヒト化マウスモデルを構築した。その結果、以前に行った CD40-CD40ligand 発現 feeder 細胞共培養下で行った系よりむしろ HLA 抗体産生は低下し、DSA も認めない結果となった(図3)。

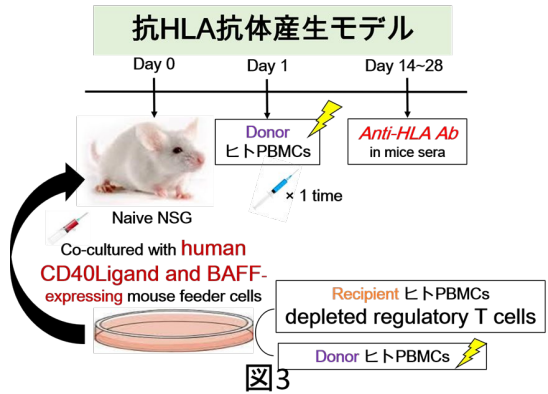


図3

さらに、in vitro 培養系において responder および feeder 細胞上に抗体産生を抑制するシグナル伝達がないか解析した。着目したのは、PD1-PDL1 抑制性シグナル伝達である。Responder および stimulator のリンパ球や feeder 細胞上には混合培養前と後で細胞上に表出する抑制性抗原の発現に差はなかったが、responder の接着細胞(おそらくは抗原提示細胞)上に PD-1 分子発現の増強が見られたため、T 細胞抑制性シグナル伝達がドナー HLA 抗原特異的に抗体産生を制御した可能性が示唆された。

全期間を通じた研究成果としては、末梢血由来ヒト細胞を用いた HLA 抗体産生ヒト化マウスモデルを確立し得たこと、ドナー特異的 HLA 抗体産生抑制機序を検証しうるマウスモデルである可能性が示されたことが挙げられた。

2)異種抗体産生ヒト化マウスを用いた異種膵島移植モデルの確立：

目的の Gal/NeuGc ホモダブルノックアウト免疫不全マウスは第7世代継代し、誕生するもののヘテロノックアウトマウスとくらべて明らかに寿命が短いことが観察中に分かった(図4)。

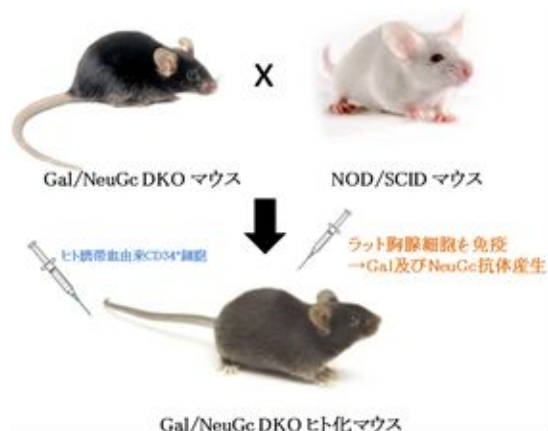


図4

膵島移植に耐えうるモデルではないと判断し、ブタ膵島移植を用いた実験は未だ行えていない。NOD/SCIDのT細胞リークも認められたことからNSGマウスとGal/NeuGcダブル欠損マウスの交配による新たなモデル作製に移行している。

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1件)

田原裕之、大段秀樹、当科における異種移植研究の変遷と今後の展望 Organ Biology 査読有、2016、23:154-157

[学会発表](計7件)

柳川泉一郎、田原裕之、大段秀樹、抗ドナーHLA抗体産生マウスモデルの作製、第117回日本外科学会定期学術集会、横浜、2017

柳川泉一郎、田原裕之、大段秀樹、抗HLA抗体産生メカニズム解明へ向けて、第53回日本移植学会、旭川、2017

柳川泉一郎、田原裕之、大段秀樹、ヒト化マウスを用いたDSA産生機序の解明へ向けて、第26回日本組織適合性学会大会、広島、2017

柳川泉一郎、田原裕之、大段秀樹、ヒト化マウスを用いた抗HLA抗体産生マウスモデルの異種移植への応用、第19回日本異種移植研究会、京都、2017

Senichiro Yanagawa, Hiroyuki Tahara, Hideki Ohdan, Development of anti HLA antibody-producing humanized mouse model、26th International Congress of the Transplantation Society, Hong Kong, 2016

柳川泉一郎、田原裕之、大段秀樹、抗ドナーHLA抗体産生マウスモデルの作製、第52回日本移植学会総会、東京、2016

田原裕之、柳川泉一郎、大段秀樹、抗ドナー抗体産生マウスモデルにおける抗体産生抑制効果、第18回日本異種移植研究会、長崎、2016

[図書](計0件)

[産業財産権]

なし

出願状況(計0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0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/home2ge/research/trans/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田原 裕之 (TAHARA, Hiroyuki)

広島大学・病院・助教

研究者番号：30423354

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

柳川 泉一郎 (大学院生)