

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 18 日現在

機関番号：33920

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15472

研究課題名(和文)抗体機能の多様性解析から戦略へ：ABO不適合・HLA抗体陽性移植モデルブタの作成

研究課題名(英文) Diversity analysis of antibody function and development of strategy to overcome antibody-mediated rejection: Establishment of pig model for ABO/HLA-incompatibility

研究代表者

小林 孝彰 (KOBAYASHI, Takaaki)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70314010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：臓器移植後長期成績の改善のためには、抗ドナー抗体の制御は不可欠である。ブタ(Duroc)のfibroblastにA/B転移酵素、FUT1遺伝子を導入し、ABO血液型不適合MHC抗体陽性移植モデルブタの開発を試みた。IgG4抗体、RNA干渉による抗体・補体依存性細胞障害の抑制を確認した。ABO不適合腎移植の抗体関連型拒絶反応は、総IgG、IgG1、IgG2、IgG3そしてC1q結合能と関連した。腎生検組織のmicroarray解析の結果、ABO不適合移植ではBACH1遺伝子の増加が認められた。抗A/B抗体接着により、HLA class I、DRの発現減少、補体による細胞傷害の軽減を確認した。

研究成果の概要(英文)：Control of antibody-mediated rejection caused by blood group ABO or HLA-incompatibility is essential for long-term graft survival after organ transplantation. Blood group A or B transferase and fucosyltransferase (FUT1) were transfected into two types of Duroc fibroblasts (non-A). We attempted to produce cloned pig expressing blood group A or B. Subclass IgG4 and RNA interference were effective for reducing antibody-mediated, complement dependent cytotoxicity. Acute antibody-mediated rejection after ABO-incompatible renal transplantation was associated with pre-transplant IgG1, IgG2, IgG3 and C1q binding capacity. Microarray analysis using graft biopsy revealed that ABO-incompatibility could increase BACH1 gene and decrease reactive oxygen species. Anti-A/B antibody binding to endothelial cells induced the resistance to antibody-mediated, complement-dependent cytotoxicity due to downregulation of HLA-DR expression and upregulation of complement regulatory proteins (CD55 and CD59).

研究分野：移植免疫、移植外科

キーワード：移植・再生医療 ABO血液型不適合 HLA抗体 抗体陽性腎移植 モデルブタ 遺伝子

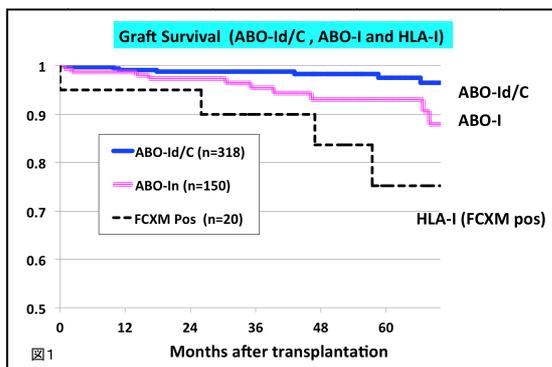
1. 研究開始当初の背景

(1) 臓器移植では、移植前から存在する抗ドナー抗体(ABO 不適合移植での抗 A 抗 B 抗体、ドナーHLA に反応する抗体)、移植後に新規に産生される抗ドナー抗体(主として HLA 抗体)は、移植成績を悪化させる要因となっている。ドナーに対する抗体が存在すれば、臓器移植直後にグラフトの血管内皮細胞に接着し、補体、凝固系的作用により血栓を形成し、炎症細胞も関与し抗体関連型拒絶反応のためグラフト機能は悪化(喪失)する。しかし、同じ抗ドナー抗体でも移植成績は異なる。腎移植では、ABO 不適合移植(抗 A/B 抗体)、クロスマッチ陽性移植(抗 HLA 抗体)では、成績に大きな差が見られ、新規に産生される場合も含めて HLA 抗体は慢性の傷害に関与する。臓器(肝臓、心臓)による予後の違いも報告され、抗ドナー抗体には、有害・無害・有益な抗体の存在が示されている。

(2) 他の報告も含め、私たちは、抗ドナー抗体の存在にもかかわらず、グラフトが拒絶(傷害)されない Graft Accommodation(免疫順応)の存在を報告してきた。グラフト抗体接着後の反応の多様性を解析することにより、生着延長効果のある有益な抗体を積極的に利用し、傷害性のある有害な抗体を選択的に抑制する戦略の有効性、妥当性を評価する。現状では動物実験モデルが欠如するため、Preclinical study が困難である。

2. 研究の目的

(1) 現在の移植医療は、免疫抑制療法が進歩により T 細胞関連拒絶反応は激減し、抗体による傷害の克服が課題として残されている。ドナーに反応する抗体として ABO 血液型不適合移植(糖鎖(ABO 抗原)に対する抗体)、クロスマッチ陽性移植(ペプチド(HLA)に対する抗体)があり、予後が大きく異なる(図 1)。



慢性の傷害は HLA 抗体が関与し、抗体には細胞傷害を引き起こす有害な抗体、無害な抗体、保護作用のある有益な抗体と分けられる。

(2) 遺伝子改変により ABO 不適合および SLA (ヒトの HLA に相当: Swine Leukocyte Antigen) 不適合を同時に検討できるブタモデルを創出し、詳細な解析を行う。また、抗体のグラフト接着後に作用する機能の多

様性を解析することにより、有益抗体の接着を促進し、有害抗体の産生を抑制する新しい抗体制御戦略の可能性を探索する。今後の臨床応用をめざした研究の方向性を決定する重要な課題となる。

グラフト長期生着は、腎移植医療の重要課題である。その妨げとなっている慢性抗体関連型拒絶反応は、移植後に産生される抗ドナー HLA 抗体がグラフトに接着して補体、凝固、炎症反応、内皮細胞の活性化により引き起こされる。有効な早期診断、治療法の開発は喫緊の課題である。

3. 研究の方法

(1) ABO 血液型不適合、HLA 抗体陽性移植モデルブタの開発。同品種二系統の (SLA: Swine Leukocyte Antigen) を遺伝的背景にもつブタに、遺伝子導入により血液型(A/B 型)を内皮細胞に発現したクローンブタの作出を試みた。将来は、この ABO 不適合 + HLA 抗体陽性移植モデルとしての有効性を検討する予定である。

(2) 臨床サンプルを用いたエビデンスの明確化と有害、無害、有益(抗ドナー)抗体の選択的促進、抑制による治療戦略の妥当性評価。A/B 抗原発現培養内皮細胞および抗 A/B 抗体、抗 HLA 抗体(各種 IgG サブクラス抗体)を用いて、補体、凝固の変化、HLA クラス 1、2 発現変化、補体制御因子や細胞保護因子の発現変化、炎症細胞との相互作用、mRNA, miRNA の変化を詳細に評価した。有害、無害、有益抗体の鑑別、そして、A/B 抗体産生、HLA 抗体産生形質細胞ハイブリドーマ(形質転換 B 細胞)を用い、選択的促進、抑制の可能性を探り、抗体治療戦略としての可能性・有効性を検討した。

4. 研究成果

(1) ABO 血液型不適合ブタ MHC 抗体陽性移植モデルブタの開発。

ABO 発現クローンブタ作出に必要なベクターを作成した。ヒト型 A/B 抗原の発現のためには、FUT1(フコース転移酵素)および A 型または B 型転移酵素の両者を遺伝子導入する必要がある。A 型(-)ブタを用いて、遺伝子導入を pcDNA、pCAGGS ベクターを用いて行い(図 2)、ABO 発現クローンブタ作出のための核移

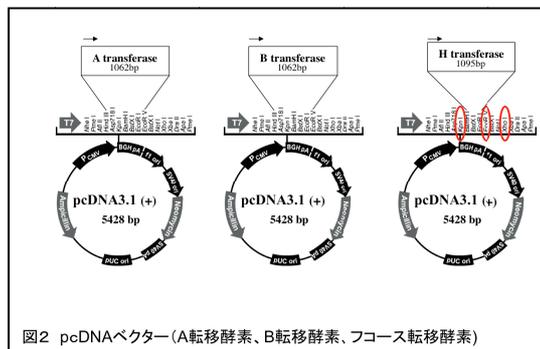


図2 pcDNAベクター(A転移酵素、B転移酵素、フコース転移酵素)

植用細胞を作成した(図3)。Homozygous SLAを固定した同品種二系統のDurocのfibroblastにFUT1(フコース転移酵素)および

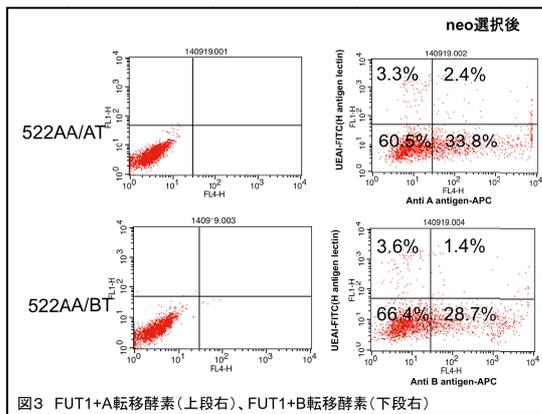


図3 FUT1+A転移酵素(上段右)、FUT1+B転移酵素(下段右)

びA or B型転移酵素を上記ベクターで遺伝子導入した。14回の核移植を試みたが個体が得られなかった。pcDNA, pCAGGSベクターは準備してあるので新たに細胞を確保し継続中である。モデルブタ作出は期限内に間に合わなかったが、並行して実施したin vitro実験(下記)により、臓器移植における抗ドナー抗体の制御に関する重要な知見を得た。画期的な診断、治療法の開発に繋がる可能性がある。

(2) IgG4, RNA干渉による抗体・補体依存性細胞傷害の抑制(in vitro test)。

抗A IgM抗体産生ハイブリドーマ細胞を用い、補体活性化の低いヒト型IgG4抗体、point mutationにより補体活性のないIgG4 K322A抗体を作成し、赤血球凝集反応、補体結合の抑制効果を確認した。このハイブリドーマ細胞に重鎖の超可変領域に対するsiRNAを用いて、約40%の抗A IgM抗体産生抑制を確認した。IgG抗体のサブクラスによる補体依存性細胞傷害の違いを明らかにし、RNA干渉による抗体産生抑制の可能性が示唆された。

(3)臨床検体(保存血清、腎生検組織)を用いた解析。急性抗体関連型拒絶反応のリスク因子として、A不適合では抗A抗体のtotal IgG、IgG2が高い症例、B不適合では、抗B抗体のTotal IgG、IgG1、IgG3そしてC1q結合能の高い症例が認められた(表1)。同じ自然抗

表1 ABO血液型不適合移植における急性抗体関連型拒絶反応(AMR)のリスク因子解析

	anti A			anti B			
	Median		P value	Median		P value	
	AMR group (n=11)	non-AMR group (n=39)		AMR group (n=3)	non-AMR group (n=25)		
IgG	72801	24113	0.0139	IgG	161050	14688	0.0091
IgM	40365	16960	0.0122	IgM	25891	18849	0.8237
IgG1	32176	12466	0.0713	IgG1	58595	7975	0.0312
IgG2	72130	9028	0.0393	IgG2	134506	11463	0.0213
IgG3	1529	1537	0.5901	IgG3	6750	933	0.0259
IgG4	546	446	0.2145	IgG4	481	324	0.1022
C1q	41.5	13.6	0.0643	C1q	96	2	0.0091
C1q (DIT)	6.46	2.51	0.0371	C1q (DIT)	85.9	2.3	0.0086

体であっても抗A抗体と抗B抗体には、抗体の質に何らかの違いがあることが示唆された。

慢性抗体関連型拒絶反応では、逆に有意差はないもののA不適合では抗体価(とくにIgG2)の低い症例で関連が認められた。腎生検でのグラフトA/B発現レベルと拒絶反応との関連はみとめられなかった。これらのABO血液型不適合腎移植後の抗体関連型拒絶反応リスク因子解析に基づき、IgG3, C1q結合の高い抗A/B抗体を有する症例のみRituximabを使用した脱感作療法を実施している。

(4)腎移植後の腎生検組織のmicroarray解析(mRNA)。

プロトコルおよびエピソード腎生検組織を用いABO適合、不適合移植の比較を行なった。抗体関連型拒絶反応ではHLA関連遺伝子の増加がみられ、ABO不適合移植ではBACH1遺伝子の増加、酸化ストレス応答遺伝子の抑制が認められた。意義については解析を進めている。

(5)抗体接着の内皮細胞に及ぼす影響

A/B抗原発現内皮細胞を用い、抗A/B抗体接着の効果解析した。A/B抗体接着により、ERKシグナル伝達が抑制され、HLA class I, DRの発現減少、補体制御因子(CD55 CD59)の誘導、そしてHLA抗体による細胞障害の軽減を確認した(図4)。HLA抗体接着では、内皮細胞活性化、補体制御因子発現抑制が認められ

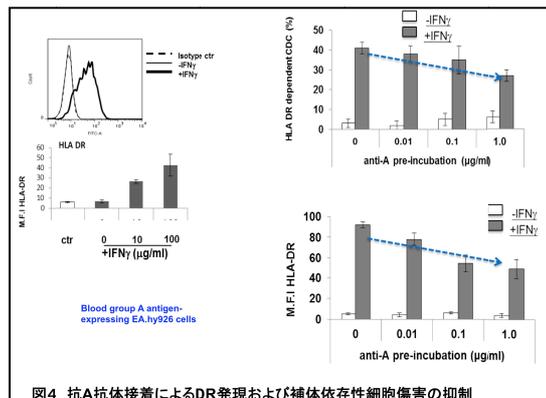


図4 抗A抗体接着によるDR発現および補体依存性細胞傷害の抑制

た。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計2件)

Iwasaki K, Yamamoto T, Inanaga Y, Hiramitsu T, Miwa Y, Haneda M, Narumi S, Watarai Y, Katayama A, Uchida K, Kobayashi T. MiR-142-5p, miR-182, and miR-486-5p as a biomarker for early detection of chronic

antibody-mediated rejection in kidney transplantation. Biomarker Insights. 査読有, 22, 2017, 45-54,

DOI:10.1080/1354750X.2016.1204000

Iwasaki K, Miwa Y, Haneda M, Uchida K,

Kodera Y, Kobayashi T. Negative

Regulation of HLA-DR Expression on

Endothelial Cells by Anti-A/B Antibody

Ligation and mTOR Inhibition.
Transplant Immunology、査読有、40、
2017、22-30. DOI:
10.1016/j.trim.2016.12.004

〔学会発表〕(計 12 件)

岩崎研太、三輪祐子、羽根田正隆、小林孝彰. 翻訳後修飾による抗 A/B 抗体接着を介した内皮細胞上 IFN 誘導性 HLA class DR の発現減少. 第 24 回日本組織適合性学会. 2015/9/10-12 ホテル

レイクビュー水戸(茨城県、水戸市)
三輪祐子、山本貴之、岡田学、岩崎研太、渡井至彦、武田朝美、丸山彰一、小林孝彰. ABO 血液型不適合腎移植における抗 A/B 抗体価以外のリスク因子の総合解析: レシピエント抗 A/B IgG サブクラス、C1q、ドナー A/B 抗原発現量の評価. 第 51 回日本移植学会. 2015/10/1-3 ホテル日航熊本(熊本県、熊本市)

T. Kobayashi. ABO incompatibility and graft accommodation: Potential strategy to prevent acute/chronic antibody mediated rejection. ABO-I and anti-HLA hyperimmune patient, Pre-Meeting Symposia, 2015 IPITA-IXA-CTS Joint Congress.

2015/11/15-19 Melbourne (Australia)
Kenta Iwasaki, Yukiko Inanaga, Yuko Miwa, Masataka Haneda, Akira Onishi, Haruko Ogawa, Takaaki Kobayashi. Human Endothelial Cell Activation through ERK by Non-Gal Antibody. 2015 IPITA-IXA-CTS Joint Congress.

2015/11/15-19 Melbourne (Australia)
Yuko Miwa, Kenta Iwasaki, Syunichi Suzuki, Masaki Iwamoto, Akira Onishi, Yasuhiro Kodera, Takaaki Kobayashi. Study of proper expression level of human thrombomodulin in pig endothelial cell with effective anticoagulant activity and no bleeding tendency. 2015 IPITA-IXA-CTS Joint Congress. 2015/11/15-19 Melbourne (Australia)

Iwasaki K, Miwa Y, Uchida K, Kobayashi T. The preventative effect of anti-A/B antibody and mTOR-inhibitor on anti-HLA-DR antibody mediated complement dependent cytotoxicity. TTS 2016. 2016/8/18-23 Hong Kong (China).

Okada M, Futamura K, Iwasaki K, Yamamoto T, Tsujita M, Hiramitsu T, Goto N, Narumi S, Watarai Y, Kobayashi T. ABO incompatibility might protect

renal graft against chronic antibody-mediated rejection caused by de novo DSA. TTS 2016. 2016/8/18-23 Hong Kong (China).

前仲亮宏、岩崎研太、松浦克彦、小林孝彰. Everolimus、Prednisolone、Fluvastatin は内皮細胞上 HLA class II DR の発現を抑制する. 第 52 回日本移植学会. 2016/9/29-10/1 グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都、港区)

岡田学、二村健太、木村隆、山本貴之、平光高久、辻田誠、畑添久美子、後藤憲彦、鳴海俊治、渡井至彦、小林孝彰. 当院における血液型適合腎移植と血液型不適合腎移植の成績比較と今後の課題. 2016/9/29-10/1 グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都、港区)

三輪祐子、岩崎研太、鈴木俊一、岩元正樹、大西彰、小林孝彰. 異種移植における Protein C-Endothelial Protein C Receptor (EPCR) システムの凝固系分子間不適合メカニズム解析. 第 19 回日本異種移植研究会. 2017/2/25 メルパルク京都(京都府、京都市)

岩崎研太、三輪祐子、小林孝彰. ドナー-MHC class II に対する CD4 アロ応答は、ドナー抗体接着により増減する. 第 19 回日本異種移植研究会. 2017/2/25 メルパルク京都(京都府、京都市)

M. Okada, Y. Watarai, K. Iwasaki, K. Futamura, T. Hiramitsu, M. Tsujita, N. Goto, S. Narumi, T. Kobayashi. Lower Incidence of DSA-Induced Chronic Antibody-Mediated Rejection in ABO-Incompatible Renal Transplantation. ATC2017. 2017/4/29-5/3 Chicago (IL, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 孝彰 (KOBAYASHI, Takaaki)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70314010

(2) 研究分担者

岩崎 研太 (IWASAKI, Kenta)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10508881

三輪 祐子 (MIWA, Yuko)
愛知医科大学・医学部・その他
研究者番号: 90572941

大西 彰 (ONISHI, Akira)

日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：30414890
平成 28 年 6 月 20 日まで

中井美智子 (NAKAI, Michiko)
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総
合研究機構・生物機能利用研究部門 動
物機能利用研究領域・任期付研究員
研究者番号：30442825
平成 28 年 6 月 20 日から

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

淵本 大一郎 (FUCHIMOTO Daiichiro)
鈴木 俊一 (SUZUKI Shunichi)
山本 貴之 (YAMAMOTO Takayuki)
岡田 学 (OKADA Manabu)
武田 朝美 (TAKEDA Asami)
平光 高久 (HIRAMITSU Takahisa)
北川 均 (KITAGAWA Hitoshi)
今枝 紀明 (IMAEDA Noriaki)
羽根田 正隆 (HANEDA Masataka)
堀見 孔星 (HORIMI Kosei)
松岡 裕 (MATSUOKA Yutaka)
前仲 亮宏 (MAENAKA Akihiro)