

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11200

研究課題名(和文) 移植臓器に対する液性免疫反応評価のための新規免疫モニタリング法の開発

研究課題名(英文) A novel immune monitoring method for evaluating humoral immune activation against transplanted grafts

研究代表者

松田 佳子 (Matsuda, Yoshiko)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：90790303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腎移植後、抗体関連型拒絶反応制御のためには、早期に治療介入可能な免疫モニタリング法の開発が必要である。我々はdonor-specific HLA antibody (DSA)特異的IgMメモリーB細胞の臨床的意義を明らかにし、IgG型/IgM型を共に評価することでより迅速に抗体関連型拒絶反応の発症を検知できることと、ドナーHLA抗原に対する液性免疫反応の賦活化を詳細に評価できることを明らかにした。さらにin vitro IgG/IgMメモリー-B細胞生存分化系を利用して薬剤感受性試験を実施することで臓器移植後、抗体関連型拒絶反応発症を予防可能な新規免疫抑制療法が明らかにされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植予後改善には免疫抑制療法の個別化投与導入、抗体関連型拒絶反応の制御などが解決すべき課題である。本研究においてはdonor-specific HLA antibody 特異的IgG/IgMメモリー-B細胞を共に評価することで抗体関連型拒絶反応発症を早期に検知し、治療介入が可能となること、in vitro IgG/IgMメモリー-B細胞生存分化系を利用した薬剤感受性試験法の確立により、ドナーHLA抗原に対する液性免疫反応を標的とした適正化免疫抑制療法の導入につながる可能性が示唆された。本研究の成果は移植臓器生着率と患者QOLの改善につながり、透析再導入数の減少など医療経済への貢献も期待される。

研究成果の概要(英文)：Early diagnosis of antibody-mediated rejection after renal transplantation is required for prompt therapeutic intervention. We investigated the clinical significance of IgM-type donor-specific HLA antibody (DSA) memory B-cell differentiation. Monitoring of growth and survival of both IgG- and IgM-type-DSA-specific memory B cells facilitated early detection of the development of antibody-mediated rejection and evaluation of humoral immune response against donor-specific HLA antigens in detail. Additionally, drug sensitivity testing of in vitro IgG and IgM memory B cell growth and survival was used to evaluate novel immunosuppressive therapy to prevent the development of antibody-mediated rejection after renal transplantation.

研究分野：移植免疫学

キーワード：抗体関連型拒絶反応 B細胞biology 個別化免疫抑制療法 IgM型メモリーB細胞 IgG型メモリー-B細胞 In vitro末梢血単核球アッセイ 抗ドナーHLA抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臓器移植後、T細胞に関連した細胞関連型拒絶反応は新規免疫抑制療法の開発などにより、ほぼ制御されているが抗体関連型拒絶反応の関連する長期予後成績においては改善されていない。抗体関連型拒絶反応は臓器移植後、新規に産生された**抗ドナ-HLA抗体 (Donor-specific HLA antibody; DSA)**の接着により、血管内皮細胞が傷害され、不可逆的にグラフト機能が低下する。

よって早期治療介入可能なより低侵襲な早期診断法の開発が待たれているが現状では組織生検が唯一の早期診断法である。

血清からのIgG型DSA検出については産生初期には移植臓器に吸着され、末梢血中から検出されない可能性がある[1]。またこれらの抗体は骨髄内形質細胞より産生されているがこれらの形質細胞はT細胞非依存性に生存維持可能であり、細胞表面のCD20抗原の発現が低下しているため、従来のT細胞を標的とした免疫抑制療法、anti-CD20モノクローナル抗体投与の効果が期待できない[2,3]。よって重大な副作用を伴う脱感作療法が行われている。

そこで他施設においても*in vitro*で末梢血B細胞培養上清からグラフト吸着に関係しないIgG型DSAの検出が試みられてきた。しかし検出には20ml以上の末梢血が必要であり、得られる情報は血清と比較し、限定されており、臨床応用にはいたっていない[4]。我々も血液疾患患者の末梢血メモリー-B細胞から抗体産生細胞まで分化培養が可能であったとの報告[5]を元に*in vitro*アッセイ系の確立に取り組み、培養上清中に、微量ながら抗体産生を確認することができた。さらにメモリー-B細胞由来の抗体をより効率よく検出するために*in vitro*アッセイ系の改良を試みる必要があった。また臨床応用のためにはこれらのアッセイ系において末梢血でのDSA特異的IgG/IgMメモリー-B細胞の分化と抗体関連型拒絶反応の病態との関連性を比較検討し、ドナ-HLA抗原に対する液性免疫反応のモニタリング法としての有用性を検証する必要があった。

2. 研究の目的

臓器移植分野において移植臓器長期生着率の改善のために抗体関連型拒絶反応の制御とドナ-HLA抗原に対する液性免疫反応の賦活化レベルを考慮した、より適正化された免疫抑制療法の導入が待たれている。

また抗体関連型拒絶反応発症の早期診断法として組織生検に代わる、より低侵襲な免疫モニタリング法の開発が課題である。

臓器移植分野においてはドナ-HLA抗原に対するIgG型抗体が診断法として主に着目されており、IgM抗体に関しては血清からのIgM型DSA検出は進行した抗体関連型拒絶反応症例に限定されており[6]。抗原特異性の点からもIgG型と比べ、低いため診断的意義は認められてこなかった。本研究ではドナ-HLA抗原に対するIgG型抗体に加え、IgM型抗体にも着目し、メモリー-B細胞を抗体産生細胞まで分化誘導可能な*in vitro*アッセイ系を利用することで培養上清のIgM型DSA検出が抗体関連型拒絶反応の早期診断もしくは病態評価法として有用であることを証明したいと考えている。よってより早期にドナ-HLA抗原-抗体反応の賦活化を予測し、抗体関連型拒絶反応早期診断への応用を目指す。さらにこの*in vitro*アッセイ系を利用し、液性免疫反応を対象とした薬剤感受性試験を行い、新規の抗体関連型拒絶反応への早期治療介入法もしくは発症予防法の開発を目指す。

3. 研究の方法

1)

健常人末梢血由来IgMメモリー-B細胞のIgM産生抗体産生細胞への分化とIgGへのクラススイッチを経由してIgG産生抗体産生細胞までの分化を確認可能な*in vitro*アッセイ系を確立する。

*In vitro*ではT細胞を含む免疫細胞からの細胞間コンタクト、液性因子による刺激を維持しつつより生体内に近い環境で培養を行う。またB cell receptorからの抗原刺激としてAffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgMを添加する。IgMメモリー-B細胞のIgGへのクラススイッチと分化の確認はFlow cytometry法にて行う。またIgM/IgG抗体産生細胞への分化増殖は培養上清中のIgM/IgG抗体産生量をELISA法にて確認する。

2)

DSA特異的IgMメモリー-B細胞の分化は血清中のIgG型DSA産生、つまり抗体関連型拒絶反応発症の予測因子となることを*in vivo*腎移植ヒトモデルにて証明する。

DSA特異的IgMメモリー-B細胞がドナ-HLA抗原-抗体反応の賦活化、免疫担当細胞からの刺激などにより、IgGへのクラススイッチを経験し、IgG産生抗体産生細胞まで分化することを確認する。実際の臨床においてIgG/IgMメモリー-B細胞を抗体産生細胞まで分化誘導可能な*in vitro*アッセイ系を利用して培養上清中のIgG/IgM型DSA産生と血清中のIgG型DSA検出、臨床経過(腎機能,病理組織学的所見など)をあわせて時系列に沿って評価する。下記のTime Tableにそって臨床経過を観察する。

時期		開始日	0	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M	8M	9M	10M	11M	12M
同意取得		●													
患者背景確認		●							●						●
臨床検査	血液学検査		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	血液生化学的検査		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	尿検査		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
腎生検			●	●					●						●
腎機能検査	eGFR(ml/min/1.73 ²)			●					●						●
	24h蓄尿			●					●						●
HLA抗体検査	FlowPRA			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	LABScreen			●	*	*	*	*	●	*	*	*	*	*	●
内服中免疫抑制剤確認		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
免疫抑制剤投与量調整				●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

*Flow PRA法陽性例のみ施行

3)

健常人末梢血由来 IgG/IgM メモリ-B 細胞をターゲットとした Pharmacodynamics study (薬力学解析) を行なう。確立された *in vitro* アッセイ系において各免疫抑制剤を培養開始時、IgM 型メモリ-B 細胞クラススイッチ前後などの各分化過程に添加し、IgG/IgM メモリ-B 細胞の抗体産生細胞への分化生存、IgM メモリ-B 細胞のクラススイッチなどへの効果を比較検討する。さらに DSA 特異的 IgG/IgM メモリ-B 細胞を用いて確立された *in vitro* 薬剤感受性試験を行い、分化確認後、抗体関連型拒絶反応発症の抑制、病態の進展抑制に有効な免疫抑制療法を確認する。

4)

確立された *in vitro* アッセイ系を利用して、移植後ドナ-HLA 抗原感作症例由来、末梢血単核球を用いて培養上清中の IgM/IgG 型 DSA、血清からの IgG 型 DSA 産生、抗体関連型拒絶反応発症などの event、免疫抑制療法などを時系列で比較検討する。結果、ドナ-HLA 抗原特異的 IgM メモリ-B 細胞の分化時期、生存分化、IgG へのクラススイッチなどとの移植後時期、免疫抑制療法との関係などを検証する。

4, 研究成果

1)

腎臓移植後レシピエント由来、末梢血 8ml を用いて *in vitro* で末梢血内 IgG/IgM メモリ-B 細胞を抗体産生細胞まで分化誘導し、培養上清中抗体の抗原特異性を解析することでメモリ-B 細胞の対応する抗原の特異性を明らかにすることが可能となった。この確立された *in vitro* アッセイ系を利用して腎移植レシピエント末梢血中での DSA 特異的 IgG/IgM 型メモリ-B 細胞分化が検出可能となった。また *in vitro* 培養上清での IgM 型 DSA 検出が血清からの IgG 型 DSA 産生さらには抗体関連型拒絶反応発症の予測因子になりうるということが明らかになった。

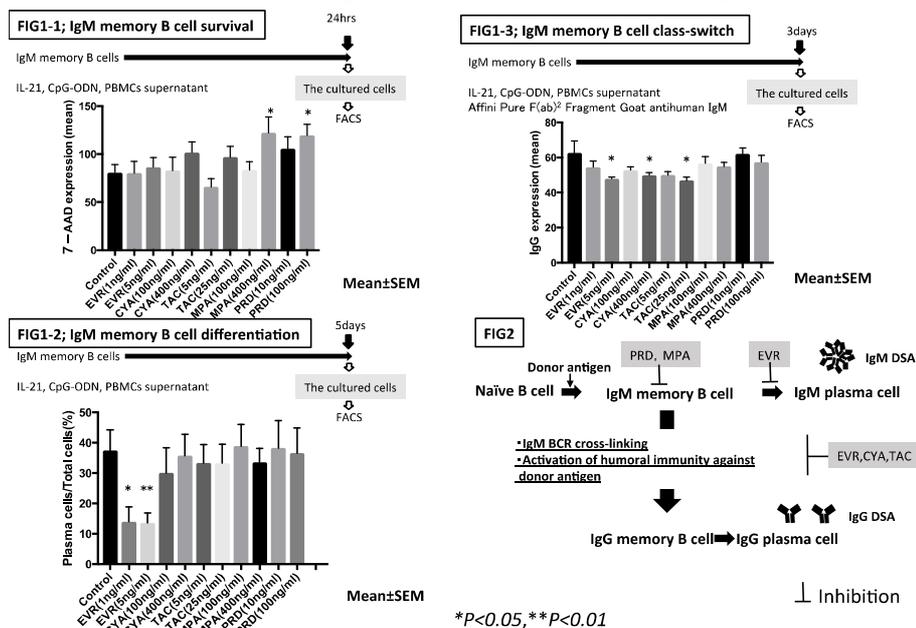
2)

腎移植後、ドナ-HLA 抗原に対する液性免疫反応賦活化を DSA 特異的 IgG/IgM メモリ-B 細胞の分化生存を確認可能な *in vitro* アッセイ系を利用して評価することで血清中の IgG 型 DSA 検出と比較してより迅速・詳細に評価可能であり、病態の把握に有用であることが明らかになった。

3)

腎移植後、レシピエントから定期的に採取した末梢血単核球を利用して DSA 特異的 IgG/IgM 型メモリ-B 細胞の分化の有無を時系列で確認し、血清からの IgG 型 DSA 検出、抗体関連型拒絶反応発症との関連性を時系列で比較検討した。結果、移植後早期(-1ヶ月)に *in vitro* 培養上清からの IgM 型 DSA 検出例においては採血日から1週間-1ヶ月以内に血清から IgG 型 DSA 検出もしくは抗体関連型拒絶反応発症を認めた。一方で1ヶ月目以降の IgM 型 DSA 検出例においては血清からの IgG 型 DSA 検出例、抗体関連型拒絶反応発症例とも認めなかった。よって移植後早期においては各施設ごとに推奨されるプロトコールに従って免疫抑制剤が減量されるがこれらの急激な減量が IgM/IgG メモリ-B 細胞の分化増殖、IgM メモリ-B 細胞の IgG へのクラススイッチを促進する可能性が示唆された。

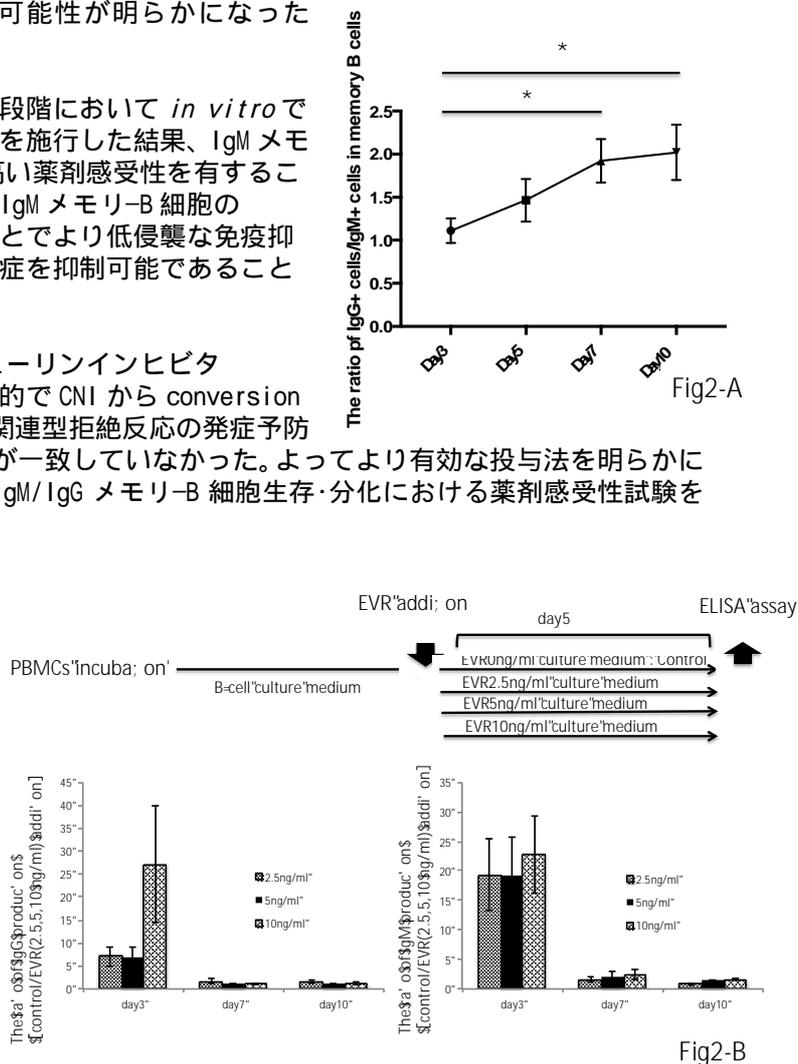
また確認のため、健康人由来末梢血単核球を利用した、*In vitro* IgG/IgM メモリ-B 細胞分化増殖系において従来使用されている免疫抑制剤[everolimus (EVR), mycophenolic acid (MPA), cyclosporine (CYA), tacrolimus (TAC), prednisolone (PRD)] の薬剤感受性試験を行った、結果プロトコル化された免疫抑制療法の減量が IgM メモリ-B 細胞の生存分化、IgG へのクラススイッチを介した IgG 産生抗体産生細胞への分化を促進する可能性が示唆された。よって DSA 特異的 IgM メモリ-B 細胞の IgG へのクラススイッチ、さらに IgG 抗体産生細胞への分化を抑制するためにより病態に即した個別化免疫抑制療法の導入が必要である可能性が明らかになった (Fig1)。



- 4) IgG/IgM メモリ-B 細胞の各分化段階において *in vitro* で各免疫抑制剤の薬剤感受性試験を施行した結果、IgM メモリ-B 細胞は IgG と比べてより高い薬剤感受性を有することが明らかになり、DSA 特異的 IgM メモリ-B 細胞の分化検出段階で治療介入することでより低侵襲な免疫抑制療法で抗体関連型拒絶反応発症を抑制可能であることが示唆された。

- 5) mTOR inhibitor はカルシニューリンインヒビター (CNI) の腎毒性を軽減させる目的で CNI から conversion 投与されてきた。しかし、抗体関連型拒絶反応の発症予防に対する有効性については見解が一致していなかった。よってより有効な投与法を明らかにするために *in vitro* において IgM/IgG メモリ-B 細胞生存・分化における薬剤感受性試験を行った。

結果、IgM メモリ-B 細胞の IgG へのクラススイッチ前 (day3) に投与した群では IgG/IgM 抗体産生量は有意に抑制されたが、クラススイッチ後 (day7, 10) の投与群においては薬剤濃度に関わらず抑制効果は認められなかった。よって DSA 特異的 IgM メモリ-B 細胞の IgG へのクラススイッチがドナ-HLA 抗原による感作、もしくは移植直後の免疫抑制剤減量により、促進される可能性を考慮すると移植前からもしくは移植後早期に内服を開始することで、より効果的に抗体関連型拒絶反応の発症を抑制できる可能性が示唆された (Fig2)。



以上の成果より、免疫抑制療法の個別化投与の導入と抗体関連型拒絶反応制御法への応用が期待され、移植臓器長期予後の改善への貢献が期待される。

(引用文献)

- [1] Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. Am J Transplant 2011; 11; 45-62.
- [2] Rituximab specifically depletes short-lived autoreactive plasma cells in a mouse model of inflammatory arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107(10): 4658-4663.
- [3] Positive Regulatory Domain I-Binding Factor 1 mediates repression of the MHC Class II Transactivator (CIITA) type IV promoter. Mol Immunol. 2007; 44(6): 1461-1470.
- [4] Peripheral blood B cells producing donor-specific HLA antibodies in vitro. Hum Immunol 2009; 70; 29-34 .
- [5] An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization Blood 2009; 114; 5173-5181.
- [6] Impact of IgM and IgG3 anti-HLA alloantibodies in primary renal allograft recipients. Transpl 2014; 97(5); 494-501 .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuda Yoshiko、Imamura Ryoichi、Takahara Shiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Evaluation of Antigen-Specific IgM and IgG Production during an In Vitro Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture Assay	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 794
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00794	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 松田 佳子
2. 発表標題 IgM/IgG型ドナー特異的HLA抗体産生予防を目的とした免疫抑制療法個別化投与法の確立
3. 学会等名 日本移植学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村亮一
2. 発表標題 腎移植におけるクロスマッチ検査の最新知見 膜型抗体の段階での検知法と治療への応用
3. 学会等名 第 16 回日本組織適合性学会近畿地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田 佳子
2. 発表標題 In vitro IgM/IgG メモリー B細胞分化増殖系における免疫抑制剤感受性試験
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiko Matsuda
2. 発表標題 Evaluation of drug action on IgM memory B cell survival and growth in vitro; -Application for individualized immunosuppression after kidney transplants-
3. 学会等名 American transplant congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田 佳子
2. 発表標題 インビトロ末梢血単核球を用いた抗原特異的IgG/IgMメモリ-B細胞機能評価法の確立と臨床応用
3. 学会等名 日本移植学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松田 佳子
2. 発表標題 In vitro IgM/IgG メモリー B細胞分化増殖系における免疫抑制剤感受性試験
3. 学会等名 日本腎臓学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiko Matsuda
2. 発表標題 Application for individualized immunosuppression after kidney transplants
3. 学会等名 American Transplant Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田 佳子
2. 発表標題 IgM/IgG型ドナー特異的HLA抗体産生予防を目的とした免疫抑制療法個別化投与法の確立
3. 学会等名 日本移植学会(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiko Matsuda
2. 発表標題 Evaluation of drug action on IgM memory B cell survival and growth in vitro; -Application for individualized immunosuppression after kidney transplants-
3. 学会等名 American Transplant Congress(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 インビトロでのIgM型メモリーB細胞分化培養系を用いた臓器移植後抗体関連型拒絶反応の早期診断法	発明者 松田 佳子, 高原 史郎	権利者 国立大学法人大阪大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/045267	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今村 亮一 (Imamura Ryoichi) (40456976)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	高原 史郎 (Takahara Shiro) (70179547)	大阪大学・医学系研究科・招へい教授 (14401)	