

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2008 ~ 2010
課題番号：	20591538
研究課題名(和文)	免疫抑制せず、オーダーメイドに移植拒絶反応を阻害する薬剤の開発
研究課題名(英文)	Developing a new type of medicine that suppresses allograft rejection without any side effects in a tailor-made manner
研究代表者	
吉田 龍太郎 (Yoshida Riyoutarou)	
大阪医科大学・医学部・教授	
研究者番号：	10124760

研究成果の概要(和文)：機能不全に陥った細胞、組織、臓器を持つ患者への究極の医療の一つに移植がある。しかし、移植部に浸潤するレシピエントの免疫担当細胞が、移植片の主要組織適合性抗原(MHC：ヒト→HLA、マウス→H-2)を非自己と識別し拒絶する(移植拒絶反応)。ヒトHLAは、A、B、Cのそれぞれ約30種類、60種類および10種類からなるので、約2万人に1人しか一致しないと言われている。したがって、拒絶反応を防ぐために、レシピエントは強い副作用のある非特異的な免疫抑制剤を飲み続けており、レシピエントがその副作用による感染症で死亡することも報告されている。移植医療に於ける夢は、この生理的反応である移植拒絶反応を、オーダーメイド(ドナーのMHC特異的)に、そして、免疫抑制などの副作用なく阻害することである。そのために必要な方向性は2つで、i) MHCを認識する受容体の存在とその生理的意義を確立し、ii) MHCクラスI分子と受容体分子の相互作用を特異的に制御することである。マウスでの黄金ペアであるC57BL/6(H-2K<sup>b</sup>D<sup>b</sup>)マウスとBALB/c(H-2K<sup>d</sup>D<sup>d</sup>)マウスでの組み合わせで、2006年、H-2D<sup>d</sup>とH-2K<sup>d</sup>に対する受容体[macrophage MHC receptor 1(MMR1)]とMMR2をコードするcDNAsの構造と293T細胞での発現に成功し、2010年、マウスMMR2のヒトホモログをコードするcDNAの単離、293T細胞やEL-4細胞での発現とそのリガンドの同定(HLA-B62)に成功した。ヒトMMR2のリガンドは、日本人のメジャーなMHCの一つであり、我々が樹立したR12モノクローナル抗体がリガンドと受容体との結合を特異的に阻害した。さらに、最近、マウスMMR1のヒトホモログをコードするcDNAの単離、293T細胞での発現とそのリガンドの同定にも成功した。それらMHCクラスIとその受容体の生理的役割を調べるために、C57BL/6マウスとBALB/cマウスの組み合わせで、マウスでのMHCであるH-2K<sup>d</sup>やH-2D<sup>d</sup>を発現するC57BL/6のtransgenicマウスおよびEL-4細胞を樹立し、野生型マウスに移植して生着するか拒絶されるか調べた。その結果、K<sup>d</sup>とD<sup>d</sup>遺伝子は非自己遺伝子としては等価であり、K<sup>d</sup>やD<sup>d</sup>遺伝子の発現量には依存せず、非自己遺伝子の数に依存して約半数が拒絶されることが判明した。現在樹立中のMMR2 KOマウスで、MHCクラスIとその受容体の生理的役割を確立したい。一方、臨床的薬剤の開発のために、リガンド(HLA-B62)と受容体(MMR2)の相互作用(移植拒絶に繋がる)を制御しうるペプチド配列の同定を(株)蛋白質科学研究所に依頼し、3候補と1対照、計4種類のペプチドの合成を業者に依頼し入手した。MMR2を発現するtumor transfectantsを樹立し、現在、H-2K<sup>d</sup>ペプチドとtumor transfectantsとの結合試験およびペプチドの阻害効果を検討中である。マウスやヒトで、自分のMHCと生来持っている受容体との間に重要なルール(MHCクラスI分子にはそれぞれ特異的な受容体が存在し、自分のMHC以外に対する受容体を持っている。)が見つかったので、今後、世界人類の95%以上を占める8種類のHLA-Aや9種類のHLA-Bに対する受容体の構造を明らかにし、それぞれの阻害薬を開発すれば、オーダーメイドに、そして、免疫抑制などの副作用なく拒絶反応を制御できる。

研究成果の概要(英文)：Transplantation is one of the optimal treatments for patients possessing non-functional cells, tissues, and organs. However, a variety of host immune cells infiltrating into the transplantation site recognize the allografts as non-self to kill them (allograft rejection). Human MHC class I genes (human leukocyte antigen: HLA) are contained in the A, B, and C regions; and there are 30, 60, and 10 haplotypes, respectively, assuming that 1 of 20000 donors might have MHC class I molecules identical to those of a recipient. Right now, the recipient continues to

take nonspecific immunosuppressive medicine. Sometimes, it causes recipient death by infection as a side effect. The dream on transplantation therapy is to inhibit the allograft rejection, a physiological immune response, without any side effects. There are 2 ways to achieve it: one is isolation of cDNAs encoding receptors for MHC class I molecules and identification of their ligands. The other one is specific inhibition of the interaction between an MHC class I molecule and its receptor without any side effects in a tailor-made manner. In 2006, we isolated 2 cDNA clones encoding novel MHC receptors on allograft-induced macrophages (AIM) for allogeneic MHCs (i.e., H-2D<sup>d</sup> and H-2K<sup>d</sup>) by using anti-AIM monoclonal antibodies (R15 and R12) and allogeneic MHC tetramers (H-2D<sup>d</sup> and H-2K<sup>d</sup>). We called these 2 receptors macrophage MHC receptor 1 (MMR1) and MMR2, respectively. In 2010, we isolated a cDNA encoding a human homologue (83.6% amino acid identity) of mouse MMR2 from a human cDNA library, the donors of which had never been allografted, and identified HLA-B62 as a possible ligand for human MMR2 on monocytes. Recently, we also isolated a cDNA encoding a human homologue of mouse MMR1 from a human cDNA library, and identified a possible ligand for human MMR2 on monocytes. Furthermore, in order to know the physiological significance of these MHC class I molecules and their receptors, we established D<sup>d</sup>, K<sup>d</sup> or D<sup>d</sup>,K<sup>d</sup> transgenic mice or tumor cells, and transplanted the transgenic skin onto or transgened tumor cells into C57BL/6 mice. The results clearly showed transgene number-dependent, gene expression rate-independent rejection of D<sup>d</sup>-, K<sup>d</sup>-, or D<sup>d</sup>,K<sup>d</sup>-transgened mouse skin or tumor cells from C57BL/6 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>) mice. Using MMR KO mice, finally, we will know the physiological significance of MMRs. On the other hand, in order to develop a new type of medicine that inhibits the interaction between an MHC class I molecule and its receptor, we asked Protein Science Institute Co. to identify the peptide sequences which might suppress the interaction, asked a company to synthesize those peptides, and established MMR-transgened cells by our selves. The binding assay of H-2K<sup>d</sup> pentamer to MMR2-transgened EL-4 cells and the effects of 4 kinds of peptides on the interaction are under investigation. Meantime, we realized that an MMR is very specific for an MHC class I molecule and that human or mouse might have several 10 kinds of MMRs for all non-self MHC class I molecules. Therefore, if we could isolate cDNAs for 8 kinds of HLA-A and 9 kinds of HLA-B and if we could develop a new type of medicine to inhibit the interaction of MMRs with MHC class I molecules, we might be able to regulate allograft rejection without any side effects in a tailor-made manner.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：①移植・再生医療 ②医療・福祉 ③外科 ④免疫学

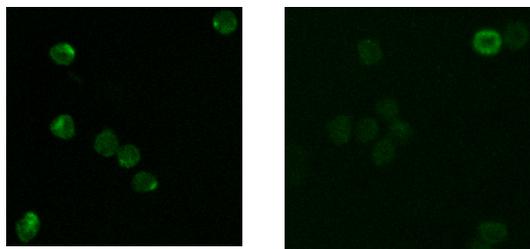
#### 1. 研究開始当初の背景

1. 最近、我々は、マウスでの移植モデルで、  
i) レシピエント (C57BL/6マウス) の移植部  
への浸潤細胞から、ドナー (BALB/cマウス) の  
MHC (H-2D<sup>d</sup>とH-2K<sup>d</sup>) を特異的に認識する受容

体 [MMR1 (macrophage MHC receptor 1) と  
MMR2] cDNAs のクローニングとHEK293T細胞  
での発現に世界で初めて成功した。ii) MMR1  
とMMR2は移植片MHC (H-2D<sup>d</sup>とH-2K<sup>d</sup>) とそれぞ  
れ解離定数 (K<sub>d</sub>) が1.9x10<sup>-9</sup>Mおよび2.7x 10<sup>-9</sup>M

と非常に強く結合したが、自己MHC (H-2D<sup>b</sup>とH-2K<sup>b</sup>) や第三者MHC (H-2D<sup>k</sup>とH-2K<sup>k</sup>) とはまったく反応しなかった。iii) 驚いたことに、MMR1を発現している細胞数が、MMR2の約10倍だった(図1)。iv) ホモロジー検索等から、H-2D<sup>d</sup>のヒトホモログは日本人の7割が持っているHLA-A24で、H-2K<sup>d</sup>のヒトホモログは、日本人の10人に1人が持っているHLA-B15であることが示唆された。また、日本人ではHLA-A24とHLA-A2で全体の約3分の2を占め、多民族からなる米国でもHLA-A2など計7種類で9割以上を占めている(表1)。すなわち、HLA-A(マウスではH-2D)が主たる被認識分子であり、その種類は世界全体でも7種類である。

(図1) MMR1 と MMR2 を発現する細胞の比率



MMR1+ 細胞(7/7 細胞)      MMR2+ 細胞(1/9 細胞)

(表1) 人類の HLA-A

	日本人	土着米国人	アフリカ系	ラテン系
A 1	0.62	12.03	5.73	7.40
A 2	23.67	29.34	18.88	28.12
A 3	0.59	11.0	8.44	8.08
A11	9.27			
A19	16.55	15.84	28.26	19.53
A24	37.79	14.69	13.21	16.24
A26	10.94	4.28	7.10	5.05
A28		5.39	9.93	8.94

(% : 両親からの2つの遺伝子で占める割合)

## 2. 研究の目的

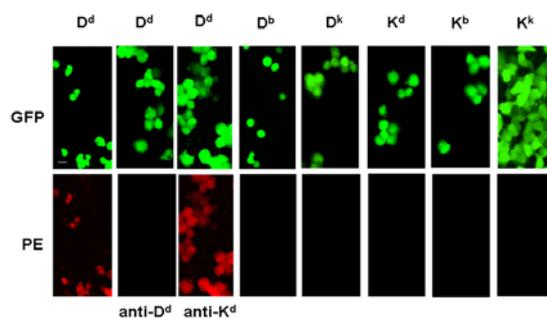
我々は、マウスMMR1のヒトホモログ、ヒトMMR1、のcDNAクローニングにも最近、成功した。したがって、そのリガンドとヒトMMR1との結合の特異的な阻害剤を開発すれば、AさんからBさんへの移植後の拒絶反応を、免疫抑制などの副作用なく制御する、ドナーのMHCに特異的なオーダーメイド移植医療が期待できる。

## 3. 研究の方法

### 1. マウスMMR1のヒトホモログ (MMR1) の HEK293T細胞での発現

最近、マウスH-2D<sup>d</sup>に対するMMR1のヒトホモログ(ヒトMMR1)のfull-length cDNAのクローニングに成功した。このMMR1 cDNAをGFP cDNAの5'端につなぎ、HEK293T細胞にtransfectし、transfectantsを作製する。蛍光顕微鏡下で緑に光るtransfectantsとProimmune社製phycoerythrin (PE)ラベルした種々のHLA-A分子やHLA-B分子との結合特異性を調べる。(図2のHLA-AあるいはHLA-B版)

(図2) マウスMMR1のH-2D<sup>d</sup>との特異的結合



### 2. HLA-B44とHMR1との結合阻害剤の開発

マウスMMR1のヒトホモログ(ヒトMMR1)のアミノ酸配列を調べたところ、マウスMMR1とヒトMMR1の抗原結合部位の47アミノ酸で、C末側のマウスでのアルギニンがヒトではグルタミンであることが判明した。また、抗原結合部位の構造、特に中心部の14アミノ酸は藻類でも保存されていた。したがって、下等動物(ハエ、線虫など)と共通の14アミノ酸の合成ペプチドがリガンドとMMR1との結合阻害剤として有望で、N末のアセチル化など、より安定で強力な阻害剤は、相補性ペプチドの専門家である名古屋市立大学名誉教授で現在、(株)蛋白科学研究所所長である岡田秀親博士の助言と協力を得ながら開発する。

## 4. 研究成果

マウスでの黄金ペアであるC57BL/6(H-2K<sup>b</sup>D<sup>b</sup>)マウスとBALB/c(H-2K<sup>d</sup>D<sup>d</sup>)マウスでの組み合わせで、2006年、H-2D<sup>d</sup>とH-2K<sup>d</sup>に対する受容体[macrophage MHC receptor 1(MMR1)]とMMR2をコードするcDNAsの構造と293T細胞での発現に成功し、2010年、マウスMMR2のヒトホモログをコードするcDNAの単離、293T細胞やEL-4細胞での発現とそのリガンドの同定(HLA-B62)に成功した。

ヒト MMR2 のリガンドは、日本人のメジャーな MHC の一つであり、我々が樹立した R12 モノクローナル抗体がリガンドと受容体との結合を特異的に阻害した。さらに、最近、マウス MMR1 のヒトホモログをコードする cDNA の単離、293T 細胞での発現とそのリガンドの同定にも成功した。

それら MHC クラス I とその受容体の生理的役割を調べるために、C57BL/6 マウスと BALB/c マウスの組み合わせで、マウスでの MHC である H-2K<sup>d</sup>、H-2D<sup>d</sup> や H-2D<sup>q</sup>K<sup>d</sup> を発現する C57BL/6 の transgenic マウスおよび EL-4 細胞を樹立し、野生型マウスに移植して生着するか拒絶されるか調べた。その結果、K<sup>d</sup> と D<sup>d</sup> 遺伝子は非自己遺伝子としては等価であり、K<sup>d</sup> や D<sup>d</sup> 遺伝子の発現量には依存せず、非自己遺伝子の数に依存して 1 種類では約半数が、2 種類では約 3/4 の移植片が拒絶されることが判明した。現在樹立中の MMR2 KO マウスで、MHC クラス I とその受容体の生理的役割を確立したい。一方、臨床的薬剤の開発のために、リガンド (HLA-B61) と受容体 (MMR2) の相互作用 (移植拒絶に繋がる) を制御するペプチド配列の同定を (株) 蛋白科学研究所に依頼し、3 候補と 1 対照、計 4 種類のペプチドの合成を業者に依頼し入手した。MMH2 を発現する transfectants を樹立し、現在、H-2K<sup>d</sup> ペンタマーと transfectants との結合試験およびペプチドの阻害効果を検討中である。

#### 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 7 件)

1. Yoshihiro Inoue, Junko Tashiro-Yamaji, Michihiro Hayashi, Hiroshi Kiyonari, Tetsunosuke Shimizu, Minenori Ibata, Hidenori Yamana, Takahiro Kubota, Nobuhiko Tanigawa and Ryotaro Yoshida. Transgene Number-dependent, Gene Expression Rate-independent Rejection of D<sup>d</sup>-, K<sup>d</sup>-, or D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>-Transgened Mouse Skin or Tumor Cells from C57BL/6 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>) Mice, *Microbiol. Immunol.* 55:446-453, 2011.
2. 吉田龍太郎、マウスのIgE産生機構—アレルギー疾患が重なり合う理由を求めて、*アレルギー*-59: 1619-1624, 2010
3. Shimizu Tetsunosuke, Junko Tashiro-Yamaji, Michihiro Hayashi, Yoshihiro Inoue, Minenori Ibata, Takahiro Kubota, Nobuhiko Tanigawa, and Ryotaro Yoshida, HLA-B62 as a possible ligand for the human homologue of mouse macrophage MHC receptor 2 (MMR2) on monocytes. *Gene* 454: 31-38, 2010.
4. Masako Miyoshi-Higashino, Masayo Hirano, Hiromi Ogita-Nakanishi, Yumiko Yamamoto-Kimoto, Kanji Sakurai, Junko Tashiro-Yamaji, Hayahito Nomi, Takeshi Takahashi, Sayako Miura-Takeda, Hiroshi Takenaka, Takahiro Kubota and Ryotaro Yoshida. IL-4-dependent induction of IgE<sup>+</sup> basophils in peripheral blood and IgE<sup>+</sup> B cells in spleen as respective indicators of allergen sensitization and a precursor of cells secreting allergen-specific IgE antibody. *Microbiol. Immunol.* 53: 30-40, 2009.
5. Takahashi Takeshi, Minenori Ibata, Zhiqian Yu, Yosuke Shikama, Yasuo Endo, Yasunori Miyauchi, Masanori Nakamura, Junko Tashiro-Yamaji, Sayako Miura-Takeda, Tetsunosuke Shimizu, Masashi Okada, Koichi Ueda, Takahiro Kubota, and Ryotaro Yoshida. Rejection of intradermally injected syngenei tumor cells from mice by specific elimination of tumor-associated Macrophages with Liposome-encapsulated Dichloromethylene Diphosphonate, followed by Induction of CD11b<sup>+</sup>/CCR3<sup>-</sup>/Gr-1<sup>-</sup> Cells Cytotoxic against the Tumor Cells, *Cancer Immunol. Immunother.* 58 : 2011-2023, 2009.
6. Yoneda Yukio, Junko Tashiro-Yamaji, Takahiro Kubota, and Ryotaro Yoshida, Two types of allograft-induced cytotoxic macrophage, one against allografts and the other against syngeneic orallogeneic tumor cells. *Microbiol. Immunol.* 52: 349-356, 2008.
7. Sayako Miura-Takeda, Junko Tashiro-Yamaji, Hidehiro Oku, Takeshi Takahashi, Tetsunosuke Shimizu, Tetsuya Sugiyama, Tsunehiko Ikeda, Takahiro Kubota and Ryotaro Yoshida. Experimental autoimmune uveoretinitis initiated by non-phagocytic destruction of inner segments of photoreceptor cells by Mac-1<sup>+</sup> mononuclear cells. *Microbiol. Immunol.* 52: 601-610, 2008.

[学会発表] (計 10 件)

1. 第 88 回日本生理学会 (2011 年 3 月、震災により中止; 誌上発表) Miyachi W. et al., Macrophages regulate Ig class switching in B cells by controlling IL-4 production in T cells.
2. 第 88 回日本生理学会 (2011 年 3 月、震災により中止; 誌上発表) Yamana H. et al. Rejection of  $D^d$ -,  $K^d$ -, or  $D^dK^d$ -transgenic skin or tumor cells from C57BL/6 ( $D^bK^b$ ) mice.
3. 第 88 回日本生理学会 (2011 年 3 月、震災により中止; 誌上発表) Maeda S. et al., A cancer vaccine: Specific rejection of *i.p.* or *i.m.* transplanted tumor cells by cytotoxic T lymphocytes (CTLs) from mice that had rejected intradermally (i.d.) injected tumor cells.
4. 第 88 回日本生理学会 (2011 年 3 月、震災により中止; 誌上発表) Tashiro-Yamaji J. et al., Isolation and characterization of a human cDNA homologous to encoding a novel receptor for allogeneic MHC [macrophage MHC receptor 1 (MMR1)].
5. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (August 25, 2010, Kobe) Shimizu T. et al., Human macrophage MHC receptor 2 on monocytes as a novel receptor for HLA-B62.
6. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (August 25, 2010, Kobe) Hirano M. et al. Essential role of macrophages in the initiation of allergic rhinitis: Regulation of class switching of nonspecific Ig in B cells by controlling IL-4 production in T cells of submandibular lymph nodes from mice sensitized intranasally (i.n.) once with cedar pollen.
7. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (August 25, 2010, Kobe) Ibata M. et al., A cancer vaccine: Rejection of intraperitoneally (i.p.) transplanted syngeneic Meth A tumor cells by cytotoxic T lymphocytes from mice that had rejected intradermally (i.d.) injected Meth A cells by CD11b<sup>+</sup> cells.
8. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (August 25, 2010, Kobe) Tashiro-Yamaji J. et al. Isolation of a human cDNA homologous to a mouse cDNA encoding a receptor for allogeneic MHC

(H-2D<sup>d</sup>) [macrophage MHC receptor 1 (MMR1)].

9. 臨床アレルギー学会 (平成 22 年 5 月 8 日、京都) 吉田龍太郎、マウスの IgE 産生機構—アレルギー疾患が重なり合う理由を求めて、
10. 日本生化学会 (平成 20 年 12 月 12 日、神戸) Simizu T., et al. Self/nonsel self recognition: Isolation and expression of a cDNA encoding a novel human receptor, which recognizes HLA-B15, homologous to mouse macrophage MHC receptor 2 (MMR2)

[図書] (計 1 件)

1. 吉田龍太郎、マクロファージの抗腫瘍作用、臨床免疫・アレルギー科、pp. 400-408、2008. 科学評論社

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 龍太郎 (Yoshida Riyoutarou)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10124760

(2) 研究分担者

山路 純子 (Yamaji Junko)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 40340559