

令和 5 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：2020～2022

課題番号：20K08982

研究課題名(和文) 制御性B細胞機能を保持し抗HLA抗体産生を制御する抗体関連型拒絶反応治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic methods of preserving regulatory B-cell function for antibody-mediated rejection.

研究代表者

井手 健太郎 (Ide, Kentaro)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号：50511565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝移植レシピエントにおいて、T細胞性拒絶反応(TCMR)および新規ドナー特異的抗HLA抗体(dnDSA)産生とエプレットミスマッチ(EpMM)の関係を解析した。その結果、HLA-DQB1のEpMM数が7以上の場合、TCMRの危険因子が高くなること、またHLA-DQB1 EpMM数が9以上の場合、dnDSAのリスクが高くなることを明らかにした。

腎移植レシピエントにおいて、濾胞性T細胞(Tfh)の分化に関わるCXCR5およびCTLA-4のSNPs解析において、いずれもTfh細胞が増加するgenotypeではdnDSA産生のリスクが高くなることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CTLA-4の細胞外ドメインとヒトIgG1のFc部分との融合蛋白であるCTLA4-IgはCD80/86とCD28の相互作用を阻害することによりT細胞の活性化を抑制する作用がある。これまでCTLA4-Ig単剤では抗体関連型拒絶反応(AMR)の制御は不能であると報告されているがプロテアソーム阻害薬でDSA産生細胞を同時に抑制することにより、AMRが制御可能となる可能性がある。今後は、高感作マウスの移植モデルでTfh細胞とDSA産生細胞の制御により抗体関連型拒絶反応が克服可能か否か検証し、実臨床への応用を目指す

研究成果の概要(英文)：We analyzed the relationship between T-cell rejection (TCMR) and de novo donor-specific anti-HLA antibody (dnDSA) production and eplet mismatch (EpMM) in liver transplant recipients. We found that HLA-DQB1 EpMM count of 7 or higher was associated with an increased risk factor for TCMR, and an HLA-DQB1 EpMM count of 9 or higher was associated with an increased risk for dnDSA.

SNPs analysis of CXCR5 and CTLA-4 involved in follicular T cell (Tfh) differentiation in kidney transplant recipients revealed that both genotypes with increased Tfh cells are at increased risk for dnDSA production.

研究分野：臓器移植

キーワード：molecular mismatch 抗ドナーHLA抗体 一塩基多型 抗体関連型拒絶反応

1. 研究開始当初の背景

抗体関連型拒絶反応 (AMR) は移植臓器廃絶の主要な原因の 1 つであり、ドナー特異的抗 HLA 抗体 (DSA) の存在は AMR の危険性を高める。我々はこのように高度に感作した移植希望患者に対して、B 細胞分化様式に即した脱感作療法を独自に考案し、DSA の産生を制御し移植を可能とさせた。しかし本脱感作療法施行後には抗ドナー T 細胞応答の亢進を来し、細胞性拒絶反応発症の危険性を高めるため、プロトコルの更なる改良が望まれている。

我々はこの抗ドナー T 細胞応答亢進の機序には、制御性 B 細胞 (Breg) の欠落が影響しているのではないかという知見を得た。

2. 研究の目的

本研究では高感作マウスモデルで Breg 機能を保持しつつ DSA 産生を制御する、新規 AMR 治療薬の可能性について検証する。

また臨床検体を使用し、AMR 危険因子の探索を行い、本基礎研究の裏付け調査を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

B 細胞特異的 IL-10 欠損マウスを作製し、このマウスに同種異型マウスからの皮膚移植を行うことにより、抗ドナー MHC 抗体を産生する感作マウスモデルを作製する。そしてレシピエントマウスの脾細胞を Responder としたリンパ球混合試験 (MLR) を行い、感作後の Wild type マウスの脾細胞を Responder とした時よりも抗ドナー T 細胞応答が亢進しているか否かを解析する。

また移植レシピエントにおいて、新規 DSA (dnDSA) 産生とエプレットミスマッチおよび獲得免疫系における一塩基多型 (SNPs) の関係を解析する。

4. 研究成果

(1) 我々はこれまで高感作 Balb/c マウス(class I H-2K^d) マウスモデルを用い、T 細胞応答亢進機序の解明を行ってきた。本研究では B 細胞特異的 IL-10 欠損マウスを用い、同種異型 T 細胞応答の抑制機序の解明を行うこととしているが、Balb/c バックグラウンドで B 細胞特異的 IL-10 欠損マウスを作製することは困難であるため、C57/BL6 マウス(class I H-2K^b)バックグラウンドで、B 細胞特異的 IL-10 欠損マウスの作製を行うこととした。マウス作製前に高感作 C57/BL6 マウスにおいても高感作 Balb/c マウスと同様に、抗 CD20 抗体投与により同種異型 T 細胞応答が亢進するかの確認を行った。その結果、高感作 C57/BL6 マウスにおいても高感作 Balb/c マウスと同様の結果が得られた (図 1)。しかし研究期間中に C57/BL6 マウス(class I H-2K^b)バックグラウンドでの B 細胞特異的 IL-10 欠損マウスの作製はできなかった。

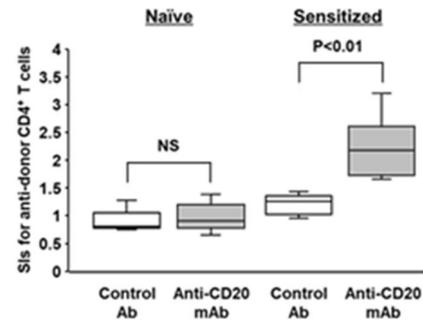


図1: 感作マウスモデルにおける抗CD20抗体投与後の同種異型T細胞応答
Balb/cマウス(class I H-2K^d)にC57/BL6マウス(class I H-2K^b)の皮膚を2回移植後、抗CD20抗体を投与すると、CD4陽性T細胞の抗ドナー応答は亢進する。

(2) 肝移植レシピエントにおいて、T 細胞性拒絶反応 (TCMR) および dnDSA 産生とエプレットミスマッチ (EpMM) の関係を解析した。対象は 2010 年 1 月から 2019 年 12 月までに当院で施行した生体肝移植症例のうち、ドナー、レシピエント共に HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 の allele 解析が行われ、移植前後に HLA 抗体検査およびリンパ球混合試験が行われた 45 症例。その結果、HLA-DQB1 の EpMM 数が 7 以上、HLA-DQB1 PIRCHE score 16 以上での場合、TCMR の危険因子が高くなること、また EpMM 高値群では、反応性 CD8+T 細胞中の CD25 表出率が高いことを明らかにした (図 2)。さらに HLA-DQB1 EpMM 数が 9 以上、HLA-DQB1 PIRCHE score 3 以上での場合、dnDSA のリスクが高くなることを明らかにした (図 3)。

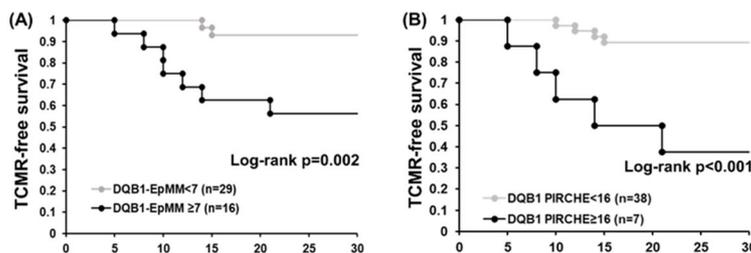


図2: 肝移植レシピエントにおける TCMR と EpMM および PIRCHE score との関係
(A) HLA-DQB1 の EpMM 数が 7 以上、
(B) HLA-DQB1 PIRCHE score 16 以上での場合、TCMR の危険因子が高くなる。

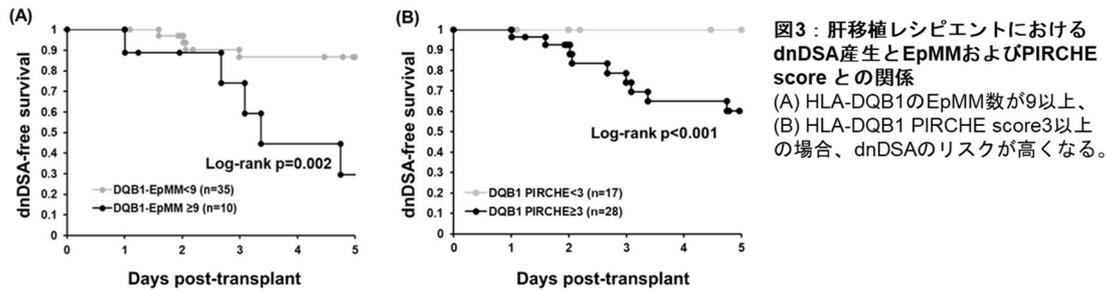


図3：肝移植レシピエントにおけるdnDSA産生とEpMMおよびPIRCHE score との関係
(A) HLA-DQB1のEpMM数が9以上、
(B) HLA-DQB1 PIRCHE score3以上の場合、dnDSAのリスクが高くなる。

(3) 腎移植レシピエントにおいて、dnDSA産生と獲得免疫系におけるSNPsの関係を解析した。2013年1月から2020年2月までの間、当院で施行した生体腎移植症例（移植前DSA症例および二次移植症例を除く）83例を対象に濾胞性T細胞（Tfh）の分化過程に関わる6つのSNPs(BCL6, CXCR5, CXCL13, ICOS, CD40L, IL-21) およびCTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) SNPs と dnDSA産生との関連を評価した。

その結果、Tfhの分化に関わるCXCR5およびCTLA-4のSNPs解析において、いずれもTfh細胞が増加するgenotypeではdnDSA産生のリスクが高くなることを明らかにした（図4）。

また、CXCR5, CTLA-4 SNPがともにTfh細胞が増加するgenotypeであるGroup 1と、それ以外のGroup 2に分けると、dnDSA free survivalの層別化がより鮮明となった。以上より、Tfh細胞関連のSNPsの解析は、腎移植後のdnDSA産生の予測因子となり得ることを明らかにした。

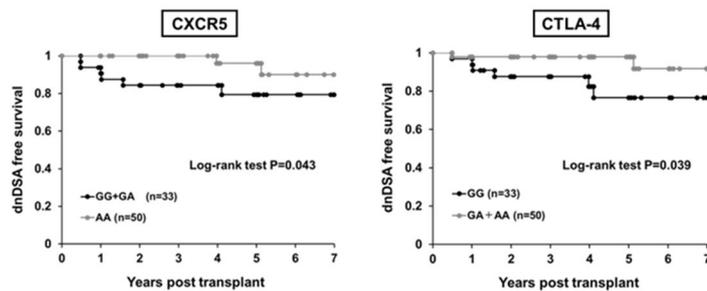


図4：腎移植レシピエントにおけるdnDSA産生とCXCR5およびCTLA-4 SNPsの関係。
CXCR5およびCTLA-4のSNPにおいて、いずれもTfh細胞が増加するgenotypeではdnDSA free survivalが有意に低下していた。

CTLA-4はT細胞応答を抑制するT細胞表面分子で、CTLA-4の発現が低下する、つまりT細胞が活性化するgenotypeでは、急性拒絶反応の発症率が高いと報告されている。またCTLA-4ノックアウトマウスでは、脾臓内のCD4陽性T細胞におけるTfh細胞の割合が有意に増加すると報告されている。CTLA-4の細胞外ドメインとヒトIgG1のFc部分との融合蛋白であるCTLA4-IgはCD80/86とCD28の相互作用を阻害することによりT細胞の活性化を抑制する作用がある。これまでCTLA4-Ig単剤ではAMRの制御は不能であると報告されているがプロテアソーム阻害薬でDSA産生細胞を同時に抑制することにより、AMRが制御可能となる可能性がある（図5）。

今後は、高感作マウスの移植モデルでTfh細胞とDSA産生細胞の制御により抗体関連型拒絶反応が克服可能か否かが検証し、実臨床への応用を目指す。

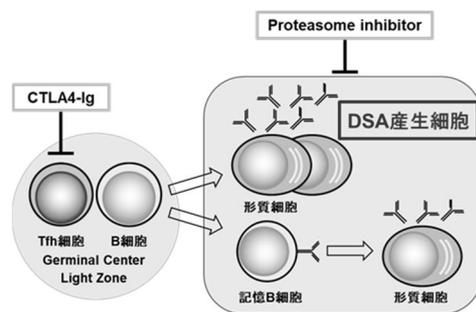


図5：濾胞性T細胞および記憶B細胞・形質細胞制御による抗体関連型拒絶反応の克服
Tfh分化を抑制するCTLA4-Igと抗体産生細胞を抑制するプロテアソーム阻害薬の投与によりDSA産生細胞を制御可能か？高感作マウスの移植モデルで解析する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tanaka Asuka, Ide Kentaro, Tanaka Yuka, Ohira Masahiro, Tahara Hiroyuki, Ohdan Hideki	4. 巻 11
2. 論文標題 B cell depletion with anti-CD20 mAb exacerbates anti-donor CD4+ T cell responses in highly sensitized transplant recipients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97748-9	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 -

1. 著者名 Ono Kosuke, Ide Kentaro, Tanaka Yuka, Ohira Masahiro, Tahara Hiroyuki, Tanimine Naoki, Yamane Hiroaki, Ohdan Hideki	4. 巻 27
2. 論文標題 Molecular Mismatch Predicts T Cell Mediated Rejection and De Novo Donor Specific Antibody Formation After Living Donor Liver Transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Liver Transplantation	6. 最初と最後の頁 1592 ~ 1602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lt.26238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井手健太郎、田中友加、柏原真由、山岡愛子、野間慎尋、周藤聡美、川井信太郎、大段秀樹
2. 発表標題 臓器移植患者に対するLuminex法を用いた DSA-IgGサブクラス解析の経験
3. 学会等名 第29回日本組織適合性学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井手健太郎、大平真裕、田原裕之、谷峰直樹、今岡祐輝、佐藤幸毅、山根宏昭、井出隆太、築山尚史、小野紘輔、望月哲矢、荒田了輔、箱田啓志、田中友加、大段秀樹
2. 発表標題 当院における抗体関連型拒絶反応制御を目指した術前治療の実際
3. 学会等名 第57回日本移植学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井手健太郎、大平真裕、田原裕之、谷峰直樹、今岡祐輝、佐藤幸毅、山根宏昭、井出隆太、築山尚史、小野紘輔、望月哲矢、荒田了輔、箱田啓志、田中友加、大段秀樹
2. 発表標題 Preformed DSA陽性腎移植症例に対する免疫グロブリン静注療法を用いた術前脱感作の経験
3. 学会等名 第57回日本移植学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井手健太郎、大平真裕、田原裕之、谷峰直樹、秋本修志、今岡祐輝、佐藤幸毅、山根宏昭、井出隆太、築山尚史、小野紘輔、望月哲矢、田中友加、大段秀樹
2. 発表標題 肝移植におけるHLA抗体検査の意義 エピトープ解析と免疫応答の関連性についての検討
3. 学会等名 第56回日本移植学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井手健太郎、田中友加、田原裕之、大平真裕、谷峰直樹、秋本修志、今岡祐輝、山根宏昭、井出隆太、築山尚史、小野紘輔、望月哲矢、大段秀樹
2. 発表標題 広島大学病院における移植後免疫抑制療法の現状
3. 学会等名 第54回日本臨床腎移植学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------