

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09525

研究課題名(和文)臓器移植におけるIgM抗体検出の臨床的意義についての新知見の検討

研究課題名(英文)New insights on Clinical potential of IgM antibodies in transplantation

研究代表者

松田 佳子(Matsuda, Yoshiko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・RI管理室・リサーチアソシエイト

研究者番号：90790303

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)：メモリーB細胞を抗体産生細胞まで分化誘導可能なインビトロアッセイ系を利用し、培養上清中のIgMとIgG型の抗ドナーHLA抗体を合わせて評価することで抗原抗体反応の賦活化レベルをより詳細に評価可能であること、IgM抗体が産生されている症例において移植臓器が抗原抗体反応から保護されていること、IgMメモリーB細胞が免疫抑制機能を有しB cell mediated diseaseの病態、発症抑制に関与する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B細胞分画ごとの免疫抑制機能を評価することで、臓器移植における抗体関連型拒絶反応を含む、B cell mediated diseaseにおける、病態改善や発症抑制に有用な分画が同定できた。またIgM-BCR stimulationとTLR9 signalingの組み合わせがこれらの分画の生存、分化を調節していることが明らかとなったため、免疫抑制機能を有するB細胞分画の生存、分化の誘導に応用できる可能性が示唆された。今後、従来の免疫抑制療法に代わり、臓器移植分野における免疫寛容誘導などへの治療応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Using an in vitro assay system that can induce memory B cells to differentiate into antibody-producing cells, we found that the level of activation of the antigen-antibody reaction can be evaluated in detail by evaluating IgM and IgG type donor-specific HLA antibodies together in the culture supernatant, and that transplanted grafts are protected from antigen-antibody reaction in cases in which IgM antibodies are produced. We found that IgM memory B cells have an immunosuppressive function and may be involved in the pathogenesis and suppression of B cell mediated disease.

研究分野：移植免疫

キーワード：制御性B細胞 IgMメモリーB細胞 Transitional B細胞 B細胞レセプター Tool-like receptor 9 IL-10 CpG-ODN 免疫寛容

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

臓器移植分野において抗体関連型拒絶反応 (ABMR) の制御が課題となっている。発症前より早期での診断が困難であり、病態が不可逆的に進行した後に腎生検で診断されることが多い。診断の補助として主に IgG 抗体に臨床的意義が認められてきた。IgM 抗体は高い補体活性を有し、組織への傷害をもたらすことが知られてきた。一方で炎症反応による傷害から組織を保護するなどの相反する効果も報告されており、IgM 抗体においては一致した見解を認めていない。メモリー-B 細胞の抗体産生細胞への分化を誘導する、インビトロ末梢血単核球アッセイ系を利用して培養上清中の IgG (抗ドナーHLA 抗体 (DSA)), IgM DSA 産生を解析した結果、IgM DSA 検出例において移植臓器が抗原抗体反応から保護されている可能性が示唆された。よって IgG 抗体に加え、IgM 抗体も評価対象とすることでより詳細に ABMR の病態把握が可能となると考えられた。インビトロ末梢血単核球培養上清中の IgM 抗体に着目することで特定の抗原に対する液性免疫反応の賦活化を予測できることから早期診断法としての応用も期待された。よって従来、着目されてこなかった IgM 抗体の臨床的意義が明らかになりつつあった。

### 2. 研究の目的

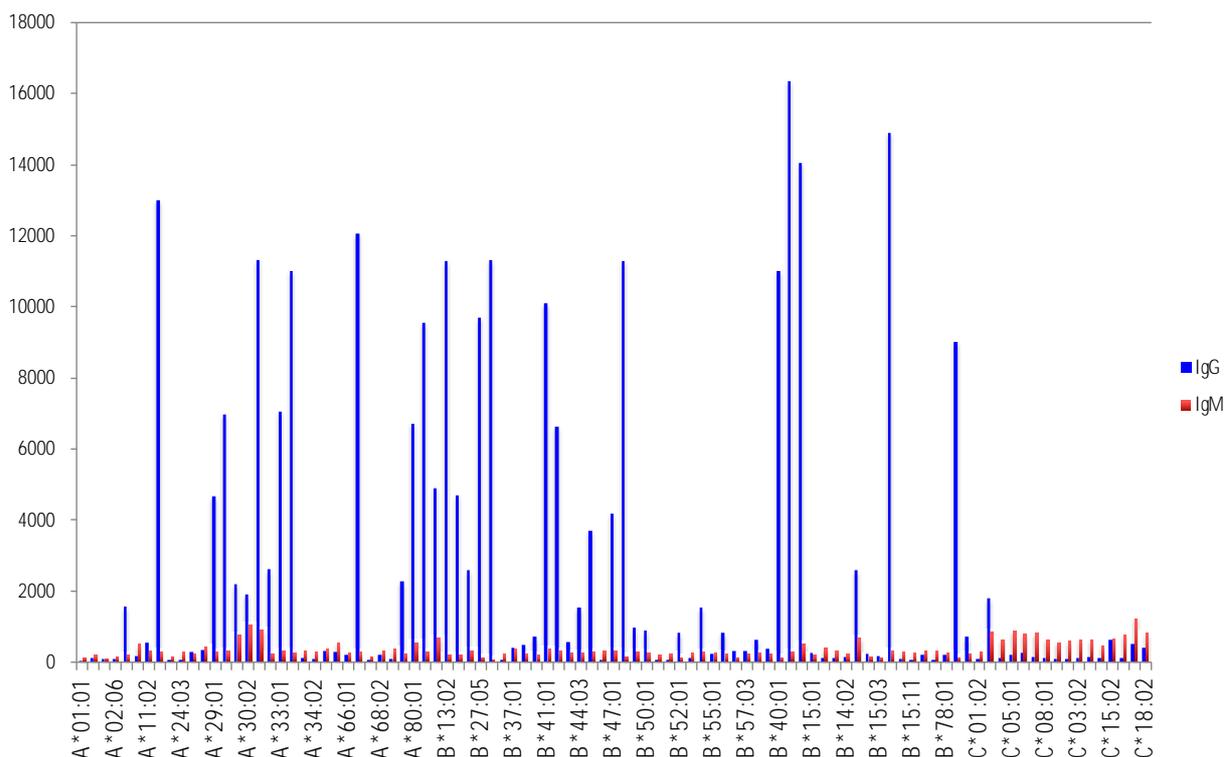
本研究では IgM 抗体の ABMR への関与方法と関与方法に影響を及ぼすサイトカインなどを明らかにし、臓器移植分野における臨床的意義を証明することである。また IgM 抗体を対象とした、薬剤感受性試験なども行い、新規の ABMR 治療法の開発につなげる。よって本研究の発展により病態に即した免疫抑制療法の導入などの ABMR 制御法の発展につながり、移植後生命予後と移植臓器予後の改善、さらには腎移植においては透析再導入数の減少など医療経済への貢献することを目的としている。またインビトロでメモリー-B 細胞を抗体産生細胞まで人工的に分化誘導しており、抗体産生細胞分化前のメモリー-B 細胞の機能も評価することで、免疫抑制機能なども検証することで、B 細胞の機能を考慮した、より有効な免疫抑制療法の導入につなげたいと考えている。

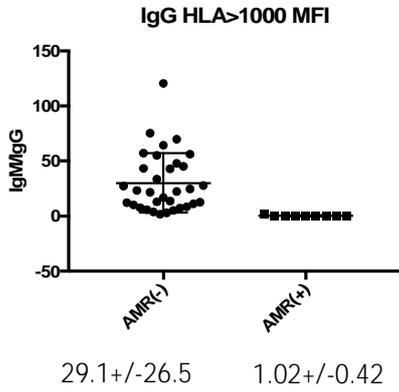
### 3. 研究の方法

【1】IgM 抗体の ABMR 発症における役割を明らかにする。

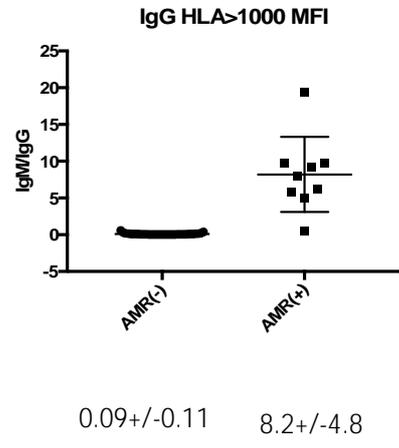
(方法) 移植後、血清中に IgG 抗ドナーHLA 抗体 (DSA) 検出例において、IgM 抗体も Luminex single antigen beads assay にて解析し、IgG DSA、IgM DSA 検出と病態との関連を検証した。IgM DSA 抗体価/IgG DSA 抗体価と ABMR 発症との関係と比較検討し、結果、IgM DSA が IgG DSA と比べ、多く産生されている症例において ABMR 発症が抑制されている可能性が示唆された。今後、IgM DSA の移植臓器保護機能などを明らかにするためには患者背景 (免疫抑制療法、性別など) を考慮した上でより多くの症例における検証が必要となる。

## Case1 抗体関連型拒絶反応非発症例



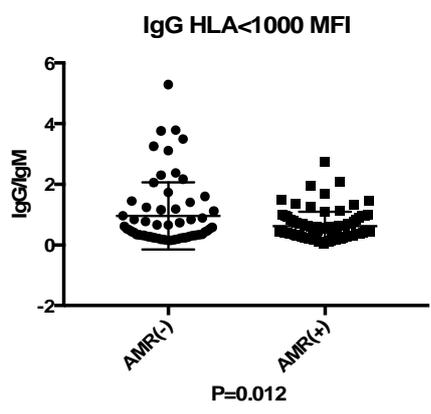
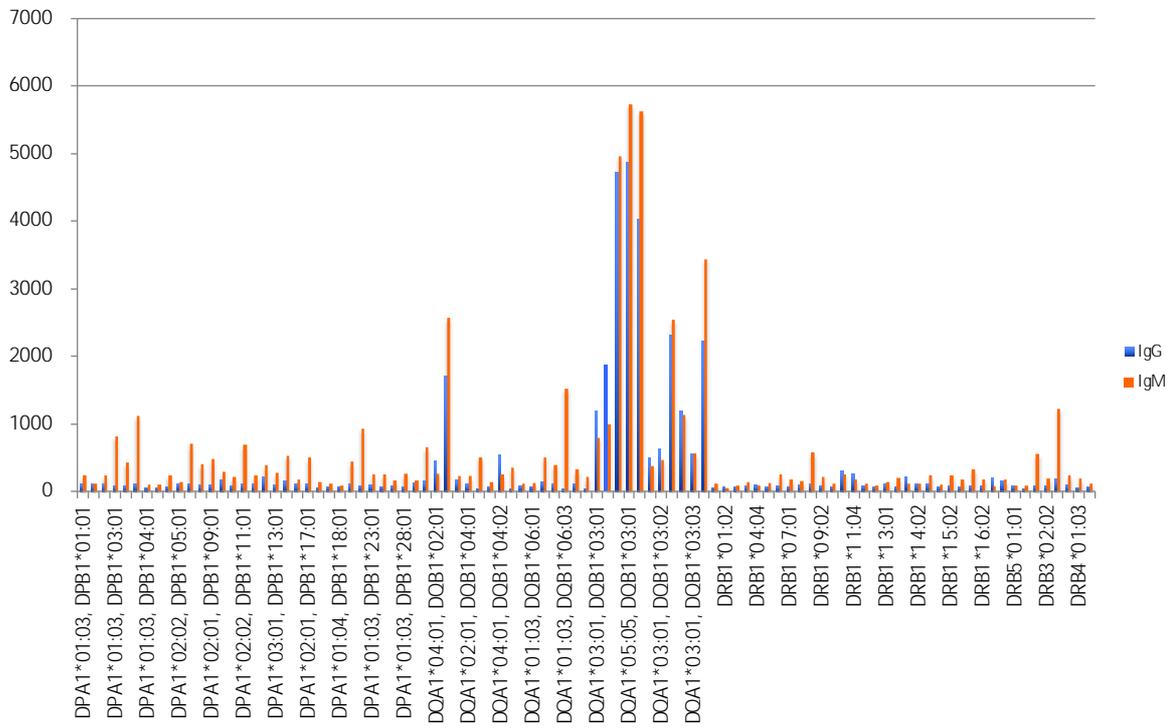


P=0.0035



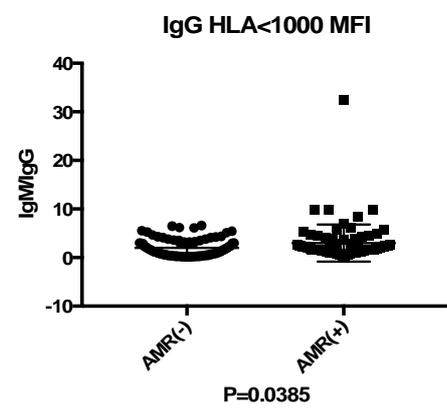
P<0.0001

Case2 抗体関連型拒絶反応発症例



0.96 +/- 1.1

0.6 +/- 0.47



2.5 +/- 1.8

3.0 +/- 3.8

【2】B細胞の各分画における、免疫抑制機能を比較検討し、生存分化に関する因子などを明らかにする。

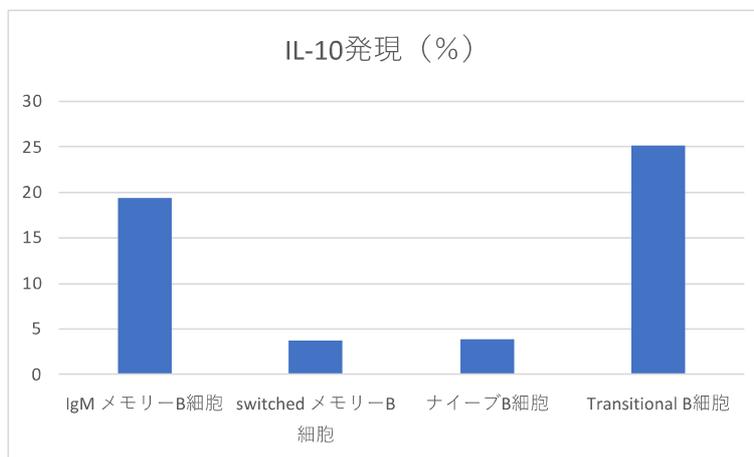
(方法)

(1) B cell mediated disease 発症時を模倣したインビトロアッセイ系を確立する。IgM -BCR (B cell 受容体) stimulation と TLR (Toll 様受容体) 9 signaling の組み合わせは自然免疫、獲得免疫のバランスを制御するなど、B細胞免疫応答を調節し、抗体の産生など発症に重要な役割を果たし、疾患発症への関与、さらに IL-10 産生を介し、免疫担当細胞活性化や抗原提示能などを調節し、B cell mediated disease での病態改善、発症抑制に働くとの報告を認めている。これらの報告を参考に健康人由来の PBMCs (n=5) に IL-21, CD40 ligand, phorbol myristate acetate (PMA), and phytohemagglutinin/leucoagglutinin (PHA-L) を基本培地として加え、さらに IgM BCR 刺激のために AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgM, Fc5 $\mu$  fragment specific (anti-IgM) と TLR agonist として CpG-ODN をそれぞれ添加し、36 時間培養する。

(2) IgM メモリーB細胞の免疫抑制機能をその他 B 細胞分画と比較する。

(方法)

Flow cytometry にて B細胞を Class switched メモリーB細胞、IgM メモリーB細胞、Transitional B細胞、ナイーブ B細胞の各分画に分類し、IL-10 発現を比較検討した。IgM メモリーB細胞と Transitional B細胞において有意に IL-10 が高発現であることを確認した。



(3) IgM BCR stimulation と TLR 9 signaling の組み合わせが IL-10 enriched B cell subset (Transitional B細胞, IgM メモリーB細胞) の生存分化へ及ぼす影響を比較検討する。

(方法)

Anti-IgM (0, 10 $\mu$ g/ml) と CpG-ODN (0, 2.5, 5 $\mu$ g/ml) をそれぞれ添加の上、36 時間培養し、IL-10 enriched B cell subset (Transitional B cell, IgM メモリーB細胞) の生存分化を Flow cytometry にて比較検証した。

Transitional B cell は anti-IgM 非添加群では CpG ODN 添加濃度間に有意差は認めなかった。一方で anti-IgM 添加群 (10 $\mu$ g/ml) では CpG-ODN 濃度依存性に分化が有意に抑制された。IgM メモリーB細胞は anti-IgM 非添加群では CpG ODN (5 $\mu$ g/ml) 添加で分化が抑制され、anti-IgM 添加群では CpG -ODN (2.5, 5 $\mu$ g/ml) 添加群で分化が優位に抑制された。Transitional B cell への CpG ODN 関与は抗原による、IgM BCR 刺激により強調され、IgM メモリーB細胞は IgM BCR と CpG ODN が協力して分化を抑制することが示唆された。

#### 4. 研究成果

抗体関連型拒絶反応を含む、B cell mediated disease における IgM 抗体の役割を明らかにした。インビトロアッセイ系を利用することで B-2 細胞を由来とする IgM 抗体を選択的に評価可能となり、B-1 細胞由来の自然抗体の影響を除外することができた。結果、IgG DSA と IgM DSA を培養上清中より早期に高い精度で検出することが可能となり、今後の臨床での応用も期待される。さらに IgM DSA が移植臓器を抗原抗体反応から保護している可能性が明示されたことがきっかけとなり、IgM メモリーB細胞の機能に着目した結果、B細胞各分画の免疫抑制機能を比較検討につながり、免疫抑制機能を有する分画の生存分化に抗原刺激下では TLR 9 signal が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。インビボにおける、検証も必要であるが、インビトロでの結果より、抗原による IgM BCR 刺激下において CpG -ODN シグナルの遮断は B cell mediated disease 発症、病態の進展抑制に有効である可能性が示唆され、新たな抗体関連型拒絶反応制御法の開発につながる可能性が明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsuda Yoshiko, Watanabe Takeshi, Li Xiao-Kang	4. 巻 12
2. 論文標題 Approaches for Controlling Antibody-Mediated Allograft Rejection Through Targeting B Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	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） 10.3389/fimmu.2021.682334	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 Ryoichi Imamura, Yoshiko Matsuda, Koichi Tsutahara, Norio Nonomura, Shiro Takahara	4. 巻 9 (9)
2. 論文標題 Impact of Immunoglobulin M-Type Donor-Specific Human Leukocyte Antigen-Antibody Levels in Supernatants from Cultured Peripheral Blood Mononuclear Cells as Predictors of Antibody-Mediated Rejection.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 733
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens9090733.	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 Yoshiko Matsuda, Takahisa Hiramitsu, Xiao-Kang Li, Takeshi Watanabe	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Characteristics of Immunoglobulin M Type Antibodies of Different Origins from the Immunologic and Clinical Viewpoints and Their Application in Controlling Antibody-Mediated Allograft Rejection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens10010004.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 松田 佳子
2. 発表標題 Comparison Of Igg And Igm Type B Cell Receptor-mediated Mtor Phosphorylation Signal
3. 学会等名 American Transplant congress ( 国際学会 )
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiko Matsuda, Hiroyuki Tezuka, Ryoichi Imamura, Shiro Takahara
2. 発表標題 New evelorimus administration targeting the prevention of the development of antibody-mediated rejection considering the comparison of growth and survival in IgG and IgM memory B cells
3. 学会等名 American transplant congress ( 国際学会 )
4. 発表年 2020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
---------	---------