

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591874

研究課題名(和文) 生体の持つ抑制性液性免疫システムを利用した慢性拒絶反応の新しい治療戦略

研究課題名(英文) Practical strategies for treatment of antibody mediated chronic rejection with inherent immune system

研究代表者

羽根田 正隆 (HANEDA, MASATAKA)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50436995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：形質細胞の免疫グロブリンの遺伝子情報を得るための超可変領域をターゲットとしたPCR primer setの設計を行い、抗A抗体を産生するヒト由来ハイブリドーマの免疫グロブリンの遺伝子情報を得、IgG4抗体を作成し補体活性化に対する抑制効果を確認した。末梢血B細胞をin vitroで形質細胞まで分化誘導する系に、TNFスーパーファミリーに属するBAFFおよびAPRILを添加しその効果を検討した。BAFF添加では形質芽細胞まで効率よく分化誘導したが、形質細胞への分化は逆に抑制し、APRIL添加では形質細胞まで効率よく分化誘導出来、IgGの産生量を格段に増加させる事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We designed the PCR primer sets to obtain the sequences of hypervariable regions of immunoglobulins from specific plasma cell. Actually we obtained the sequence from hybridomas producing human type anti-A antibodies, and created the recombinant IgG4 subtype anti-A antibody, which was class-switched from IgM. Recombinant anti-A IgG4 antibody showed competitively bonding to the type A carbohydrate antigen to prevent serum anti-A antibody binding for suppressing complement activation. To improve the in vitro B cell culture system, we checked the effects of TNF superfamily cytokines. BAFF (B cell activating factor) induced efficient differentiation until plasma blasts, but plasma cells differentiation was inhibited in reverse. On the other hand, APRIL (a proliferation inducing ligand) was able to be remarkably increased the production of IgG and to induce efficient differentiation until plasma blasts and plasma cells.

研究分野：免疫学

キーワード：移植免疫 抗体関連型拒絶反応 IgG4 形質細胞 DSA 抗ABO抗体

## 1. 研究開始当初の背景

近年、移植後早期に起こる急性拒絶反応は、免疫抑制薬の発達と治療レジメン改良により制御されつつある。一方、移植 2~3 年後より起きる慢性拒絶反応により毎年 3 ~ 5 % の割合で移植腎機能が喪失することがあきらかとなり、現在でも改善が認められていない。慢性拒絶反応は移植組織由来の非自己成分に対して抗ドナー抗体が産生されることによって起きる。多くはドナーHLA に対する抗体(donor specific antibody; DSA)や ABO 不適合移植の際の抗 ABO 抗体によるものであり、現在までのところ確立された治療法は存在しておらず、抗体価の上昇に伴い、病態が悪化し移植組織は拒絶されるようになる。我々のグループでは拒絶反応のメカニズムの解析を行ってきたが、DSA が HLA 抗原に結合し架橋をすることにより、血管内皮細胞が活性化し、炎症反応が起き(Biochemical and Biophysical Research Communications 2010;391:1210-1215)、同時に抗体結合による補体や凝固系の活性化が起こり(Xenotransplantation 2010;17:26 -37)、微小血管障害・微小循環障害が起こりやがて慢性拒絶反応へと進展してゆくことを明らかにしてきた。

抗ドナー抗体を産生する形質細胞については末梢血中にはほとんど存在しておらず、骨髓穿刺を行わなければ確認する事が出来ないといった報告がなされてきたが(American Journal of Transplantation 2008; 8: 133- 143)、2011 年アメリカ移植学会において DSA 陽性患者の末梢血中に DSA と結合しうる B 細胞受容体(B Cell Receptor; BCR)を持つ B 細胞群が存在することが報告された。我々は、Michel Jourdan らが報告した培養法(Blood 2009;114:5173-5181)を一部改良し、末梢血中の B 細胞を形質細胞まで分化させることに成功しており(第 41 回日本移植学会報告)、DSA 陽性患者の末梢血中に存在する B 細胞から DSA 産生形質細胞を分化誘導できる可能性を見出した。

## 2. 研究の目的

DSA の IgG サブクラスには補体活性の強い IgG1/G3 が多く含まれており、補体活性の無い IgG4 の割合はわずかしかないと報告されている(Transplantation 2011;92:41-47)。また IgG4 には抗炎症作用があるとされ(Science 2007;317:1554-1557)、実際に臨床開発中のモノクローナル抗体で免疫機能を押し場合は、IgG サブクラスを IgG4 にスイッチして作成される(Nature Biotechnology 2007;25:1369-72)。以上の事から移植臓器に対して攻撃をする IgG1/3 サブクラスの DSA を IgG4 サブクラスにする事で、補体活性や

抗体依存性細胞傷害活性を抑制し、DSA の結合する抗原に対する特異的な抑制抗体を作成する事を目的とする。

DSA だけでなく抗 ABO 抗体に対しても超可変領域の DNA 塩基配列を得る事で、IgG サブクラスを補体活性の強い IgG1/G3 から補体活性のない IgG4 にサブクラススイッチし、IgG4 サブクラスの抗 ABO 抗体を ABO 不適合移植の患者に投与し、ABO 抗原を補体活性の無い IgG4 が覆うことで、補体活性の強い IgG1/gG3 が結合出来なくすることで病態の進展を止める、といった治療法を開発できると考える。

## 3. 研究の方法

本研究ではまず、(1)形質細胞の免疫グロブリンの遺伝子情報を得るための PCR primer set の設計を行い、実際に抗 A 抗体を産生するヒト由来ハイブリドームを用いて免疫グロブリンの遺伝子情報が得られるか試みた。次に(2)得られた遺伝子情報から免疫グロブリンのクラスあるいはサブクラスを IgG4 に改変し、IgG4 抗体を作成、精製し細胞への結合性や補体結合への抑制効果、細胞傷害への抑制効果を確認した。最後に(3)DSA 陽性患者より得られた末梢血 B 細胞を培養により効率よく形質細胞まで分化誘導し、培養上清から DSA を検出できるか試みた。

## 4. 研究成果

(1). 現在まで、イムノグロブリンの超可変領域を PCR によって増幅する primer set が様々な報告がなされてきたが、実際には全ての  $V_H$  および  $V_K, V_L$  を網羅しているのではない事が blast search により判明したため、新たに  $V_H$  および  $V_K, V_L$  および定常領域の PCR primer の設計を行った。市販されている抗 A 抗体を産生するヒト由来 anti-A IgM 産生ハイブリドーム(ATCC-HB8534)を用いて IgH および IgK を遺伝子を単離し、塩基配列を決定した。得られた IgH および IgK の VDJ および VJ 領域の塩基配列は NCBI に登録されている anti A BCR を持つ EBV-transformed B cell line とほぼ一致していた。由来の全く異なる抗 A 抗体でありながら、IgH の超可変領域は完全に一致している事を報告した。マウスの実験系において affinity の低い抗体を遺伝子移入したマウスが抗原刺激によって affinity の高い抗体へと親和性成熟する際に一定の方向性がある事が報告されており、ヒトにおいても抗原に対して affinity maturation が起こる際にはランダムではなく親和性成熟には一定の方向性がある可能性を見出した。

(2). 得られた遺伝子情報から VH の転写開始点以降 VDJ を in vivo 社 pFUSE-CH1g-hG4 Vector に組み込み抗 A IgHG4 を作成した。IgK 全長も同様に pFUSE vector に組み込んだ。

IgG1 と IgG を CHO 細胞へ遺伝子移入し、薬剤選択を行い、安定発現株を得た。培養上清より anti-A IgG4 antibody を得た。ELISA により A 型糖鎖抗原に反応する抗体であることを確認し、A 型赤血球に対して anti-A IgG4 を添加したところ、クームス試験陽性であった。また血清中の抗 A 抗体に対する anti-A IgG4 の結合抑制および補体活性の抑制を確認した。

(3) B 細胞を形質細胞まで分化誘導する系を改良し、より多くの形質細胞まで分化誘導する事を試みた。方法としては TNF ファミリーに属する BAFF および APRIL を培養系に添加しその効果を検討した。BAFF 添加では形質芽細胞まで効率よく分化誘導することが出来たが、形質細胞への分化は逆に抑制された。また BAFF によって誘導された形質芽細胞は約 2 週間で死滅した。一方 APRIL 添加では形質芽細胞および形質細胞まで効率よく分化誘導することが出来、また IgG の産生量は非添加群に比べて day25 で約 4 倍、day35 で約 12 倍に増加した。APRIL の作用について詳細に検討したところ、BCMA を介して形質細胞を生存維持させる作用があること、memory B 細胞では B 細胞数の増加がおこる事より、分化を促進してしまうために最終的には形質細胞数の増加が望めないこと、naïve B 細胞では培養初期に細胞数の増加がおこり、次いで BCMA を介する形質細胞を生存維持させる作用により最終的に形質細胞数の増加と IgG 産生量の増加が起こることを明らかにした。(Cell Immunol. 2015. 295. 127-136)。この培養法を用いて DSA 陽性患者 B 細胞を培養したが、single antigen beads を用いた検査に十分な量の DSA 産生はほとんどの例で得られなかった。血清中に DSA が充分量ある 2 症例において検出する事が出来、患者血清と培養上清の DSA のプロファイルが一致していることが確認できた。B 細胞培養系については特に memory B 細胞の生存維持・分化誘導だけでなく、さらに増殖が必要である事を明らかにした。一方、抗 ABO 抗体を産生する形質細胞への分化誘導系に関しては、上記培養系では抗 ABO 抗体は検出出来ず、用いるサイトカインの種類を変更し様々な条件で培養を試みた。IL-2, IL-10, IL-15 を用いた培養系で抗 A 抗体は最大量となった。文献的には IL-15 レセプターが B1-B 細胞に発現しているといった報告があり、IL-15 と B1-B 細胞の関連が抗 A 抗体産生に重要な役割を果たしている可能性を見出した。また抗 ABO 抗体の産生量には個人差が極めて大きい事を明らかにし、この事が ABO 不適合移植後の抗体産生に影響を与えている可能性があることを報告した。

## 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 4 件)

Matsuda Y, Haneda M, Kadomatsu K, Kobayashi T. A proliferation-inducing ligand sustains the proliferation of human naïve (CD27(-)) B cells and mediates their differentiation into long-lived plasma cells in vitro via transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor and B-cell mature antigen. Cell Immunol. 査読有、295 巻、2015、127-136 DOI:

10.1016/j.cellimm.2015.02.011.

Miwa Y, Yazaki S, Iwamoto M, Suzuki S, Iwasaki K, Haneda M, Yamamoto K, Maruyama S, Onishi A, Kobayashi T. Functional Difference Between Membrane-bound and Soluble Human Thrombomodulin.

Transplantation. 査読有、2015 99 巻、2015、702-709. DOI:

10.1097/TP.0000000000000571.

Kurata Y, Kuzuya T, Miwa Y, Iwasaki K, Haneda M, Amioka K, Yamada K, Watarai Y, Katayama A, Uchida K, Kobayashi T.

Clinical relevance of post-transplant pharmacodynamic analysis of cyclosporine in renal transplantation. Int Immunopharmacol. 査読有、22 巻、2014、384-391. DOI:

10.1016/j.intimp.2014.07.022.

Haneda M, Owaki M, Kuzuya T, Iwasaki K, Miwa Y, Kobayashi T. Comparative analysis of drug action on B-cell proliferation and differentiation for mycophenolic acid, everolimus, and prednisolone.

Transplantation. 査読有、97 巻、2014、405-412. DOI:

10.1097/01.TP.0000441826.70687.f6.

[学会発表](計 12 件)

羽根田正隆、三輪祐子、岩崎研太、小林孝彰 血液型 A 型糖鎖に対するリコンビナント IgG4 抗体の作成、第 50 回 日本移植学会総会、2014/9/10-12/12、京王プラザホテル(東京)

羽根田正隆、松田佳子、三輪祐子、岩崎研太、小林孝彰 ヒト末梢血メモリー B 細胞の安定増殖培養法の試み、第 50 回日本移植学会総会、2014/9/10-12/12、京王プラザホテル(東京)

羽根田正隆、松田佳子、三輪祐子、岩崎研太、小林孝彰: IVIG の B 細胞増殖分化に与える薬剤効果の解析、第 50 回日本移植学会総会、2014/9/10-12、京王プラザホテル(東京)

松田佳子、羽根田正隆、三輪祐子、岩崎研太、小林孝彰: In vitro における末梢血 B 細胞から形質細胞分化誘導の試みー抗体関連型拒絶反応制御を目指してー、第 50 回日本移植学会総会、2014/9/10-12、京王プラザホテル(東京)

松田佳子、羽根田正隆、三輪祐子、岩崎研太、小林孝彰: In vitro での long-lived plasma cell 分化への Biological mechanism の解明、第 50 回日本移植学会総会、2014/9/10-12、京王プラザホテル(東京)

Haneda M, Matsuda Y, Miwa Y, Iwasaki K, Watarai Y, Uchida K, Kobayashi T. Peripheral B cell culture for assessment of immune response to ABO blood type carbohydrate antigens IXA 2013, Osaka (Japan), 2013/11/10-13

羽根田正隆、成田由紀子、三輪祐子、岩崎研太、小林孝彰 In vitro 形質細胞分化誘導系を用いた、血液型糖鎖抗原に対する抗体産生系の確立、第 49 回日本移植学会総会、2013/9/5-7、京都国際会議場(京都府)

羽根田正隆、三輪祐子、岩崎研太、小林孝彰 リコンビナント抗血液型 A 型糖鎖糖鎖 IgG 抗体の作成、第 49 回日本移植学会総会、2013/9/5-7、京都国際会議場(京都府)

Haneda M, Owaki M, Iwasaki K, Miwa Y, Watarai Y, Uchida K, Kobayashi T. Analysis of drug action using a B cell culture model for differentiation into plasma cell. CAST 2013, Kyoto (Japan), 2013/9/2-6

Haneda M, Owaki M, Iwasaki K, Miwa Y, Watarai Y, Uchida K, Kobayashi T. In Vitro Differentiation of Naive/Memory B Cells into Plasma Cells: Difference in Mode of Drug Action between Mycophenolic Acid and Everolimus. American Transplant Congress 2013, Seattle (USA), 2013/5/18-22

大脇麻未、成田由紀子、羽根田正隆、倉田洋子、葛谷孝文、網岡克雄、三輪祐子、岩崎研太、小林孝彰: 免疫抑制薬の抗体産生抑制効果に対する薬力学解析の試み、第 48 回日本移植学会総会、2012/9/20-22、名古屋国際会議場(愛知県)

羽根田正隆、黒木聖久、成田由紀子、大脇麻未、葛谷孝文、岩崎研太、渡井至彦、打田和治、小林孝彰: In vitro B cell differentiation assay を用いた DSA 検出法の検討第 48 回日本移植学会総会、2012/9/20-22、名古屋国際会議場(愛知県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/tx-immunology/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

羽根田 正隆 (HANEDA, Masataka)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座  
講師  
研究者番号: 50436995

##### (2) 研究分担者

小林 孝彰 (KOBAYASHI, Takaaki)  
名古屋大学大学院医学系研究科・寄附講座教授  
研究者番号: 70314010

##### (3) 研究分担者

岩崎 研太 (IWASAKI, Kenta)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座  
講師  
研究者番号: 10508881

##### (4) 研究分担者

三輪 祐子 (MIWA, Yuko)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・研究員  
研究者番号: 90572941

##### (3) 研究協力者

松田 佳子 (MASTUDA, Yoshiko)