

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591886

研究課題名(和文)HLA-Fによる免疫抑制法 制御性T細胞を100%残すアロ反応性細胞除去法の開発

研究課題名(英文)Immunosuppression system by HLA-F - the development of the eliminating system of allo-reactive T cells except for regulatory T cells

研究代表者

王寺 典子(下嶋典子)(Ouji-Sageshima, Noriko)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30398432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、HLA-Fが制御性T細胞以外の活性化免疫担当細胞表面に発現することをみいだしたので、これを利用して、HLA-F陽性細胞除去による免疫抑制法の開発を目指し、移植患者末梢血リンパ球におけるHLA-Fの発現を解析してきた。

研究期間中に検討した症例数は肝移植99例、腎移植114例、造血幹細胞移植52例、のべ1538検体となった。HLA-F陽性細胞は検出されたが、各臨床データおよび拒絶反応の有無との相関は得られなかった。本研究を進める中で、定常状態のB細胞表面にHLA-Fが発現することを見出した。以上の結果からHLA-Fによる免疫抑制法の開発は困難であるという結論に至った。

研究成果の概要(英文)：HLA-F is expressed on the cell surface of activated immune cells except for regulatory T cells. We considered that HLA-F expressing immune cells except for regulatory T cells associated with rejection. To aim the establishment of new immunosuppression system by elimination of HLA-F positive cells, we analyzed the expression of HLA-F on peripheral lymphocyte from patients who received transplantation.

We analyzed 1538 samples from 265 patients who received transplantation including 99 liver transplantation, 114 kidney transplantation and 52 stem cell transplantation. We detected HLA-F positive cells on peripheral lymphocyte from patients who received transplantation, although the HLA-F expression did not associate with rejection. Additionally, we detected HLA-F expression on steady-state B cells. We concluded that it was difficult to establish the new immunosuppression system using by HLA-F expression.

研究分野：免疫学

キーワード：移植外科学 HLA-F 制御性T細胞

### 1. 研究開始当初の背景

HLA-F は非古典的 HLA クラス I 遺伝子の一つであり、同じく非古典的 HLA クラス I 遺伝子である HLA-E、HLA-G と共に 1990 年頃、Geraghty らが発見した遺伝子である。これらは古典的 HLA クラス I の HLA-A、-B、-C と異なり、非常に多型性が乏しく、また発現部位も限局されている。HLA-F は、それまで Wainwright ら (J Immunol., 2000)、Lepin ら (Eur J Immunol., 2000) から、細胞質には存在するが、細胞表面には発現しない分子であると言われていたが、石谷・Geraghty DE らは、細胞表面に発現する HLA-F を検出するモノクロナル抗体の作製に成功し、定常状態の B 細胞は HLA-F を発現していないが、EB virus を transform した B 細胞は HLA-F を発現することを示した (J Immunol., 2003)。HLA-F の特徴を利用して我々が考えた、抗 HLA-F 抗体を使用した活性化細胞除去による免疫抑制法の開発を目指す本研究は、国内・国外のいずれにおいても、行われていない。

### 2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、石谷、Geraghty との共同研究の中で、HLA-F の発現解析を行ってきた。その結果、HLA-F は妊娠後期胎盤トロホプラスト、腫瘍細胞 (未発表)、白血病細胞 (未発表)、transform した B 細胞、骨髄移植後、GVHD を起こしている患者末梢血単核球 (未発表)、マイトジェンで活性化された免疫細胞 (T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞) (Eur J Immunol. 2010)、混合リンパ球反応 (MLR) で刺激された末梢血単核球 (未発表) に発現することを見出した。以上の結果から、HLA-F は、細胞が活性化状態になると発現してくる分子であると考えた。すなわち移植において、アロ反応を起こしている細胞は HLA-F を発現しているのではないかと考え、予備実験として、GVHD を起こしている骨髄移植患者の末梢血単核球の HLA-F 発現を解析したところ、HLA-F 陽性細胞を検出し得た。次に MLR において HLA-F 陽性細胞を除去すれば、アロ反応が抑制されるのかを検討したところ、2 次 MLR のアロ反応が抑制された。移植片生着には、制御性 T 細胞が重要であるが (Lombardi, Immunotherapy, 2011)、現在の免疫抑制剤には、制御性 T 細胞を低下させるものも多い (Wekerle T., Transplant Proc., 2008)。HLA-F は制御性 T 細胞には発現しない (Eur J Immunol. 2010) ことから、抗 HLA-F 抗体を利用して HLA-F 陽性の活性化アロ反応性細胞を除去することにより、拒絶反応を抑制し、かつ制御性 T 細胞を 100% 残す免疫抑制法の開発を目的とし、本研究を計画した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 移植患者試料を用いた in vivo 解析

腎臓・肝臓・造血幹細胞移植後患者を対象として、移植前・後、および拒絶反応あるいはその兆候が現れた時の末梢血単核球中の

HLA-F 陽性細胞率および HLA-F 発現強度を明らかにする。

#### (2) 健常人試料を用いた in vitro 解析

細胞刺激法の違いによる HLA-F 発現レベルの比較、および細胞活性化レベルの違いによる HLA-F 発現レベルの比較を行う。また HLA-F の発現における免疫抑制剤の効果を検討する。

### 4. 研究成果

研究期間中に検討した症例数は肝移植 99 例、腎移植 114 例、造血幹細胞移植 52 例、計 265 名の患者から、術前・術後 8 週間にわたり採取した 1538 検体となった。

現時点で臨床経過が明らかになっている症例について、拒絶反応出現時期と HLA-F 陽性細胞出現時期を比較したところ、これらは一致しなかった。そこで、観察期間中の拒絶反応有群および拒絶反応無群の 2 群について HLA-F 陽性細胞率を比較検討した。

#### (1) 肝移植

肝移植 99 例のうち、現時点で臨床経過が明らかになっているもの 37 例について、観察期間中の拒絶反応有群および拒絶反応無群の 2 群における HLA-F 陽性細胞率を比較検討した (図 1)。

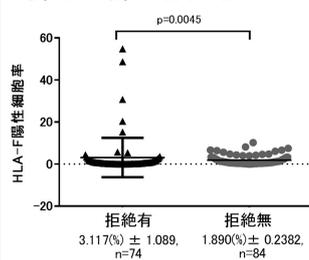


図1 肝臓移植患者末梢血中のHLA-F陽性細胞率

拒絶反応の有無および移植前後に関わらず、HLA-F 陽性細胞は 0 ~ 3% 程度検出された。HLA-F の発現解析には、6 種の抗 HLA-F 抗体を使用したが、このうち 1 種の抗 HLA-F 抗体のみで識別される HLA-F を発現している細胞が、拒絶有群で有意に高かった。しかし拒絶無群においてもこの抗 HLA-F 抗体で識別される細胞は 2% 弱程度検出され、この HLA-F 陽性細胞が、拒絶反応に直接関与しているのかについては、さらに検討が必要であると考えられた。

#### (2) 腎移植

腎移植 114 例のうち、現時点で臨床経過が明らかになっているもの 11 例について拒絶反応有群および拒絶反応無群の 2 群における

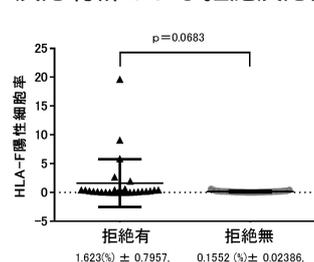


図2 腎臓移植患者末梢血中のHLA-F陽性細胞率

HLA-F 陽性細胞率を比較検討した (図 2)。

腎移植においても、HLA-F 陽性細胞は 0 ~ 2% 程度検出された。このうち肝移植と同じ抗 HLA-F

抗体で識別される HLA-F を発現している細胞は、拒絶有群でわずかに多い傾向が見られた。

### (3) 造血幹細胞移植

造血幹細胞移植 52 例のうち、現時点で臨床経過が明らかになっているもの 35 例について観察期間中の拒絶反応有群および拒絶反応無群の 2 群について HLA-F 陽性細胞率を比較検討した (図 3)。

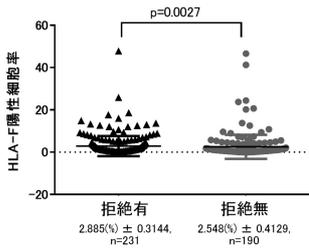


図3 造血幹細胞移植患者末梢血中のHLA-F陽性細胞率

造血幹細胞移植においても、HLA-F 陽性細胞は 0 ~ 3 % 程度検出された。造血幹細胞移植においては、肝移植・腎移植とは異なる抗

HLA-F 抗体で検出される HLA-F を発現している細胞が拒絶有群で有意に検出された。しかし、拒絶無群と比較して 0.3% 程度しか差がなく、造血幹細胞移植においても HLA-F 陽性細胞と拒絶反応の関わりについては、さらに検討が必要であると考えられた。

また、肝・腎移植において拒絶有群で高い陽性細胞率を示した抗 HLA-F 抗体は、造血幹細胞移植では拒絶無群において、わずかに高い陽性細胞率を示した。

これらの違いは、HLA-F が多様な発現様式をとることに起因すると考えられる。

以上の結果から、移植患者末梢血中の HLA-F 陽性細胞検出を拒絶反応の検出法に応用するには、さらに検討を要すると判断した。また、in vitro における活性化細胞上の HLA-F 検出に際しては、我々が所有する 6 種の抗 HLA-F 抗体全てが有用であることは、これまでの研究で明らかであったが、末梢血中の HLA-F 陽性細胞には、これらの抗 HLA-F 抗体が均一の反応性を示さなかったことから、生体における HLA-F の発現様式については、さらに詳細な解析が必要であると考えられた。

### (4) B 細胞における HLA-F の発現

腎臓・肝臓・造血幹細胞移植後患者末梢血中リンパ球の HLA-F 発現解析を詳細に行う中で、我々は 6 種の抗 HLA-F 抗体のうち、1 種

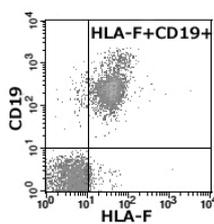


図4 B細胞におけるHLA-Fの発現

のみが定常状態 B 細胞に発現する HLA-F を検出することを見出した。この抗 HLA-F 抗体は定常状態の B 細胞のほぼ全てに反応した (図 4)。

### (5) 総括

移植患者末梢血中には、移植の前後および拒絶反応の有無に関わらず HLA-F 陽性細胞を検出した。また、定常状態の B 細胞が HLA-F を発現していることが明らかとなった。

以上のことから、我々は生体における HLA-F の発現様式については、さらに詳細な解析を行う必要があると考え、抗 HLA-F 抗体を利用した新規免疫抑制法の開発は難しいと判断した。

各抗体により反応性の違いは、抗体のエピトープの違いと HLA-F が多様な発現様式をとるためと考えるが、実際にどのような構造の違いがあるのかは明らかにできなかった。

今後は、抗 HLA-F 抗体のエピトープの違いが、HLA-F の多様な構造をどのように識別しているのかを明らかにし、その際の HLA-F の構造・機能の違いについて検討する予定である。さらに、本研究期間中に採集した全ての検体の臨床経過と、これまでに得た結果を継続して解析し、現在得られている結果について検証を重ねる予定である。

### 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 2 件)

- (1) Nakazawa T, Nakamura M, Park YS, Motoyama Y, Hironaka Y, Nishimura F, Nakagawa I, Yamada S, Matsuda R, Tamura K, Sugimoto T, Takeshima Y, Marutani A, Tsujimura T, Ouji N, Ouji Y, Yoshikawa M, Nakase H. Cytotoxic human peripheral blood-derived T cells kill glioblastoma cell lines: implications for cell-based immunotherapy for patients with glioblastoma. *J Neurooncol.* 2014 Jan;116(1):31-39. doi:10.1007/s11060-013-1258-4.

- (2) Ommori R, Ouji N, Mizuno F, Kita E, Ikada Y, Asada H. Selective induction of antimicrobial peptides from keratinocytes by staphylococcal bacteria. *Microb Pathog.* 2013, 56: 35-39. doi:10.1016/j.micpath.2012.11.005.

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 王寺(下嶋)典子、赤崎正佳、Geraghty DE、喜多英二、石谷昭子、羽竹勝彦、伊藤利洋  
可溶性 HLA-G 抗原検出法の確立、第 29 回日本生殖免疫学会総会、2014 年 12 月 13 ~ 14 日、伊藤国際学術研究センター、東京都文京区
- (2) OUJI-SAGESHIMA Noriko, ISHITANI Akiko, Daniel E GERAGHTY, ITO Toshihiro  
Establishment of the detection system of soluble HLA-G in body fluids. 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 10 ~ 13 日、国立京都国際会館、京都府京都市

- (3) 王寺(下嶋)典子、中西真理、貝森淳哉、矢澤浩治、市丸直嗣、吉澤淳、長谷川淳、米田龍生、森井武志、吉田克法、一戸辰夫、高原史郎、上本伸二、赤崎正佳、Geraghty DE、伊藤利洋、石谷昭子、喜多英二、羽竹勝彦  
体液中の可溶性 HLA-G 抗原検出法の確立、第 23 回日本組織適合性学会大会、2014.9/13-15、長崎大学熱帯医学研究所、長崎県長崎市
- (4) Sageshima N.、Lee N.、Ishitani A.、Geaghty DE.、  
The alternative expression patterns and conformational forms of HLA-F.  
第 42 回日本免疫学会 学術集会、2013 年 12 月 11~13 日、幕張メッセ、千葉県幕張市
- (5) 下嶋典子、Ni Lee、勇井克也、中西真理、貝森淳哉、矢澤浩治、吉澤淳、長谷川淳、米田龍生、森井武志、吉田克法、一戸辰夫、高原史郎、上本伸二、喜多英二、羽竹勝彦、Geraghty DE、石谷昭子  
免疫細胞上の HLA-F の多様な発現様式  
第 22 回日本組織適合性学会大会、2013 年 9 月 14~16 日、コラッセふくしま、福島県福島市
- (6) 下嶋典子、勇井克也、貝森淳哉、矢澤浩治、吉澤淳、一戸辰夫、森井武志、長谷川淳、米田龍生、高原史郎、上本伸二、吉田克法、羽竹勝彦、喜多英二、Geraghty DE、石谷昭子  
移植患者末梢血リンパ球における HLA-G、HLA-F の発現、第 21 回日本組織適合性学会大会、2012 年 09 月 15 日~2012 年 09 月 17 日、明治大学駿河台キャンパス アカデミーコモン・リバティタワー、東京都千代田区

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

王寺(下嶋) 典子(Ouji-Sageshima Noriko)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30398432

### (2) 研究分担者

石谷 昭子(Ishitani Akiko)  
奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：40112544

### (3) 連携研究者

一戸 辰夫(Ichinohe Tatsuo)  
広島大学・医学部・教授  
研究者番号：80314219

### (4) 連携研究者

高原 史郎(Takahara Shiro)  
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・  
寄付講座教授  
研究者番号：70179547

### (5) 連携研究者

上本 伸二(Uemoto Shinji)  
京都大学・医学(系)研究科(研究院)・  
教授  
研究者番号：40252449

### (6) 連携研究者

吉田 克法(Yoshida Katsunori)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50192422

### (7) 連携研究者

森井 武志(Morii Takeshi)  
奈良県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70268451