

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893143

研究課題名(和文)ヒト化異種糖鎖欠損免疫不全マウスを用いた抗体関連拒絶反応機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of antibody-related rejection bay using humanized immunodeficient mice lacking xenogeneic antigen

研究代表者

田原 裕之(TAHARA, HIROYUKI)

広島大学・大学病院・医科診療医

研究者番号：30711361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、移植医療において再重要課題とされている慢性抗体関連型拒絶反応を克服するため、ヒト化マウスモデルを用いた異種ないし同種移植における抗体性拒絶反応のメカニズムを解明しその治療法を開発することを目的としている。当研究期間において次の抗体産生ヒト化マウスの作製に着手し成功しつつある。ヒトと同様に異種抗原GalおよびNeuGcを欠損する重度免疫不全マウス ヒト免疫細胞を有する重度免疫不全マウス

研究成果の概要(英文)：We aim to elucidate mechanism of antibody-mediated rejection in xenogeneic or allogeneic transplantation and develop the therapy in order to overcome chronic antibody-related rejection which is the most important issue in transplantation. We are now approaching establishment of the humanized mouse model during this period (severe immunodeficient mice lacking Gal and NeuGc Ag, severe immunodeficient mice having human immune cells)

研究分野：外科学

キーワード：移植免疫

1. 研究開始当初の背景

脳死臓器移植症例数は依然として少なく、ドナー不足の問題は全世界的に深刻な問題である。その究極的解決策のひとつとして異種移植の臨床応用に向けた研究がなされており、遅延型異種抗体性拒絶反応の克服が次なるハードルとされていた。一方、同種移植においては長期生存症例における慢性抗体性拒絶反応の克服が、さらなる移植医療の安定に求められてきた。

脳死臓器移植症例数は依然として少なく、ドナー不足の問題は全世界的に深刻な問題である。その究極的解決策としてブタをドナーとする異種移植の研究が国際的に盛んに行われてきた。1990年代にブタからヒトへの異種臓器移植が試みられたが、ブタ細胞上の Gal 1,3Gal(Gal)抗原に対する自然抗体がヒト血液中に存在するため超急性拒絶反応が障壁となっていた。2002年 Gal 欠損ブタが誕生し超急性拒絶反応は解決され、このブタの腎臓や心臓を用いたヒトへの異種移植は数カ月間の長期生着を得た。しかし、こうした長期生着異種臓器には同種間移植では起こり得ないGal以外の抗原(non-Gal)に対する異種抗体の沈着を伴う遅延型異種拒絶反応が生じることが分かった。つまり次なるハードルとされる遅延型異種拒絶反応を克服すれば、異種移植は同種間移植に匹敵する成績が見込めるため、異種移植の臨床応用が期待されており、米国では異種膵島細胞移植臨床治験が準備されている。

我々の教室では1992年より異種移植を可能にし得る免疫制御法の開発を目指した基礎研究を重ねてきた。その一つの成果はGal以外の抗原(non-Gal)による異種抗体性拒絶反応の解明である。ブタの持つnon-Gal抗原の大半を占めるN-glycolylneuraminic acid (NeuGc)抗原に着目し、NeuGc欠損マウス(CMAH^{-/-}マウス)を用いて異種移植におけるNeuGcの抗原性を初めて証明した。CMAH^{-/-}マウス及びヒト血液中に存在するNeuGc抗体は、NeuGcを発現するwild-typeマウスの細胞に対して細胞傷害性を示すことが確認された。次にNeuGc発現wild-typeマウスの膵島を用いた膵島移植実験を行った。NeuGc抗体を持つCMAH^{-/-}マウスレシピエントではコントロール(CMAH^{+/+}マウス)と比べ有意に血糖降下が緩慢であり、移植3日後の膵島グラフトのインスリン産生が抑制された。またwild-type CMAH^{+/+}膵島へのNeuGc IgM/IgG抗体の沈着も示された。これらから、NeuGcに対する抗体性拒絶反応が生じることが示された。異種移植の臨床応用に最も近いブタ-ヒト間異種膵島移植においてNeuGc抗原は新たな標的抗原となりうることを初めて証明した。

これらの研究成果を発展すべく大動物モデルで証明するためにレシピエントとして

サルやヒヒを実験に用いたいが、NeuGc抗体を持つ種はヒトと鳥に限られており、これらの大動物を用いた実験は遂行できない。そこで、ヒト免疫細胞が構築されたヒト化マウスの作製に着目し、申請者が米国留学中にその研究を進めてきた。従来のヒト化マウスではB細胞・NK細胞・マクロファージなどのT細胞以外の免疫担当細胞の構築が不十分であったが、ヒト胎児由来胸腺細胞と幹細胞を重度免疫不全マウスに同時投与することにより、T細胞のみならずB細胞、マクロファージの十分な機能性を示すヒト免疫構築細胞を持つマウス(ヒト化マウス)を作製した。このヒト化マウスをレシピエントとして異種ないし同種移植モデルを構築することが可能になった。

2. 研究の目的

本研究は、従来解析が困難であった異種および同種移植における抗体性拒絶反応のメカニズムをヒト化マウスモデルにより解明し、その制御法を確立することを目的とする。よりヒトに近いモデルをつくるためGal/NeuGcダブル欠損マウスとNOD/SCIDマウスを交配させた異種抗体産生ヒト化マウスを作製し、遅延型異種拒絶反応の制御法開発について研究を展開する。また、アロ抗体を持つヒト化マウスを開発することにより同種移植における抗体性拒絶反応制御の可能性も探求する。

長期生着異種臓器にはNeuGcを主としたnon-Gal抗原に対する異種抗体の沈着を認めることから、同種移植に匹敵する成績を得るためにはNeuGc抗体による拒絶反応を制御する必要がある。我々は、ブタ-ヒト間異種膵島移植においてNeuGc抗原は新たな標的抗原となりうることを明らかにした。本研究では、これらの研究成果を解析し得る異種抗体産生ヒト化マウスモデルを開発する。またアロ抗体産生ヒト化マウスモデルも同様に開発し、現在臨床で使用されている抗体性拒絶反応治療薬の効果を検証する。

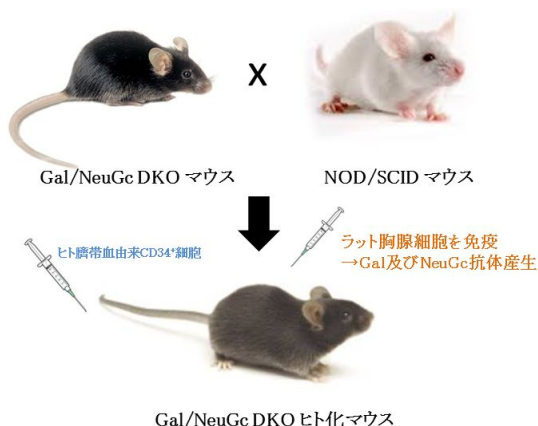
異種移植における遅延型抗体性拒絶反応の克服は、同種移植に成績が匹敵するための最後の障壁とされている。これまで我々はマウス間でNeuGc抗体による拒絶反応が生じることが証明してきたが、ヒトに近いモデルでは証明できておらず、また世界的にもこうしたレベルでの研究報告は皆無である。また、同種移植における抗体性拒絶反応の克服は長期生着を得るための重要課題である。これに対し現在臨床で用いられている治療薬の効果をin vivoでヒト化マウスを用いた検証した成果報告はない。我々の最終目標は、異種および同種移植における抗体性拒絶反応の制御法の確立である。抗体性拒絶反応の克服は異種移植の臨床導入に拍車がかかり、同種移植においては長期生着症例の増加や従来移植困難とされていた症例への適応拡大が予想される。

3. 研究の方法

我々は異種移植における新たな標的である NeuGc 抗原に対する抗体性拒絶反応の可能性をこれまでに証明してきた。この研究をヒト細胞において発展させるべく十分な免疫構築細胞を有するヒト化マウスを作製した。本研究ではこれらの研究成果を発展させ、異種抗体(Gal 抗体および NeuGc 抗体)かつヒト免疫構築細胞を有するヒト化マウスを作製し、プタ髒島細胞に対する異種抗体性拒絶反応を証明した上で、その制御法の確立を目指す。一方、アロ抗体を有するヒト化マウスを作製し、アロ細胞に対する抗体性拒絶反応が証明された場合、現在臨床で用いている抗体性拒絶反応治療薬の治療効果を解析し、その制御法の確立を目指す。

(1) 異種および同種移植における抗体産生ヒト化マウスモデルの作製

従来のヒト化マウスでは B 細胞・NK 細胞・マクロファージなどの T 細胞以外の免疫担当細胞の構築が不十分であったが、申請者が留学中の研究施設において、ヒト胎児由来胸腺細胞と幹細胞を重度免疫不全マウス(NSG)に同時投与することにより、T 細胞のみならず B 細胞、マクロファージの十分な機能性を示すヒト免疫構築細胞を持つマウス(ヒト化マウス)の作製が可能となった。また当研究室ではヒトが持つプタに対する異種抗体である Gal 抗体と NeuGc 抗体をそれぞれ有する Gal/NeuGc ダブルノックアウトマウス(Gal/NeuGc DKO)を既に作製している。本研究においては、異種抗体を持ちヒト免疫担当細胞を有する Gal/NeuGc DKO ヒト化マウスを作製する。NOD/SCID マウスと Gal/NeuGc DKO マウスは、すでに交配開始している。このマウスにヒト臍帯血由来 CD34 陽性幹細胞を 2.0Gy の全身放射線照射後に投与することにより、約 4 週間後からヒト免疫構築細胞を有するマウスが作製できる。さらにこのマウスに Gal および NeuGc 抗原を発現する wild-type ラットの胸腺細胞を免疫することにより、Gal および NeuGc 抗体産生するヒト化マウスを作製する。



一方、NOD/SCID マウスにヒト臍帯血由来 CD34 陽性幹細胞を投与しヒト化したマウスに HLA 組織型の異なるアロタイプの末梢血リンパ球を免疫することにより、抗 HLA 抗体を有するヒト化マウスを作製する。



(2) 細胞・臓器レベルでの抗体性拒絶反応の解析

異種抗体性拒絶反応を解析するために、作製した Gal/NeuGc 抗体産生ヒト化マウスをストレプトゾトシンで糖尿病化し、これに NeuGc を発現する新生児プタ髒島細胞(京都大学より提供)を腎被膜下に移植し、レシピエントの血糖値の推移やグラフトのインスリン産生およびヒト IgM/IgG 抗体の沈着を免疫組織染色により確認する。一方、同種移植における抗 HLA 抗体性拒絶反応を解析するために、抗 HLA 抗体を有するヒト化マウスに、抗体と同じ HLA 組織型を表出するヒト新鮮皮膚組織((株)ケー・エー・シー)を移植し、グラフトに対するヒト IgM/IgG 抗体および特異的 HLA 抗体の沈着を免疫組織染色により確認する。

4. 研究成果

(1) 異種移植における異種抗体産生ヒト化マウスモデルの作製

本研究において、異種抗体(Gal 抗体および NeuGc 抗体)を持ちヒト免疫担当細胞を有する Gal/NeuGc ダブルノックアウトヒト化マウスを作製すべく、NOD/SCID マウスと Gal/NeuGc ダブルノックアウトマウスを交配し、現在第 7 世代が誕生した。PCR 法で Gal および NeuGc のノックアウトを確認し得た。また、このヒト化マウス末梢血中のマウス T 細胞および B 細胞の出現が無いことも確認できており、NOD/SCID 遺伝子の継代ができていたことが確認された。このマウスにヒト臍帯血由来 CD34 陽性幹細胞を 2.5Gy の全身放射線照射後に静脈内投与しヒト免疫担当細胞の再構築を開始している。

(2) 同種移植における HLA 抗体産生ヒト化マウスモデルの作製

重度免疫不全マウス(NSG)にヒト臍帯血由来 CD34 陽性幹細胞を静脈内投与ないし脾臓内投与し、ヒト免疫担当細胞の再構築を確認した。T 細胞のみならず B 細胞やミエロイド系細胞の再構築を確認し得た。また新生児 NSG マウスの肝臓内にヒト臍帯血由来 CD34 陽性

幹細胞を投与することでヒトT細胞の再構築効率と早期出現を検証したが、ヒト免疫担当細胞再構築が不十分であった。さらにヒト骨髓由来 CD34 陽性幹細胞を NSG マウスに静脈投与した場合でも同様にヒト免疫担当細胞の再構築が得られたことが確認できた。現在、このマウスに HLA 型の異なる健常人アロ末梢血リンパ球を投与し HLA 抗体産生を促進している。

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

田原裕之、Establishment of a model for immune tolerance in allogeneic or xenogeneic transplantation using a next generation humanized model、第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3日、国立京都国際会館(京都)

田原裕之、ヒト化マウスを用いた異種免疫寛容モデルの構築、第17回日本異種移植研究会、2015年3月14日、自治医科大学(栃木)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

田原 裕之 (TAHARA, Hiroyuki)
広島大学・大学病院・医科診療医
研究者番号：30711361

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし