

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461911

研究課題名(和文) ヒト化マウスを用いた同種移植における抗ドナー抗体産生制御法の開発

研究課題名(英文) Development of an anti-donor HLA antibody producing humanized mouse model.

研究代表者

井手 健太郎 (Ide, Kentaro)

広島大学・病院(医)・病院助教

研究者番号：50511565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脱感作療法および慢性抗体関連型拒絶反応に対する新規治療法の開発を目的とし、ヒト化マウスで抗ドナーHLA抗体を産生する感作モデルの作製を行った。重度免疫不全マウス(NSG)にヒト末梢血単核球を投与後、放射線照射を施したHLA不一致のヒト末梢血単核球を投与し感作させた。そしてSingle beads assay法で抗HLA抗体が検出されるか解析したところ、抗ドナーHLA特異的抗体を産生しないマウスが作製された。この手法はレシピエントリンパ球のドナー抗原に対する寛容化を導いている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic antibody-mediated rejection due to anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies (Abs) is an important problem in organ transplantation. To investigate anti-HLA Ab-producing cells, we developed an anti-HLA Ab-producing humanized mouse model. Severely immunodeficient (NSG) mice were humanized by injection of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) derived from healthy volunteer. After the appearance of T, B, and myeloid cells in the peripheral blood of the humanized mice, irradiated PBMCs derived from the other healthy volunteer were injected in the mice. We measured anti-HLA antibody levels in sera by using a multiple antigen beads-based assay. Non-DSA anti-HLA-Abs were detected; however, no DSA were detected. We are now developing humanized mouse model that can produce anti-HLA-Abs and believe that the success will enable further development of in vivo patient-specific therapies, including DSA desensitization.

研究分野：臓器移植

キーワード：抗体関連型拒絶反応

1. 研究開始当初の背景

末期臓器不全に対する移植医療は確立されているが、深刻ドナー不足が国際的な問題である。米国では約 10 万人以上の末期腎不全患者が移植待機患者として United network for organ sharing に登録し、さらに毎年 3 万人以上が新規に登録しているが移植件数は年間 1 万例程度であり、慢性的なドナー不足の状況である。また待機患者の約 30% が抗 HLA 抗体陽性症例で、そのうち高感作症例では年間約 5% しか移植を受けることができないと報告されている。

抗 HLA 抗体は輸血、妊娠、移植歴など自己の HLA 抗原と異なる同種抗原の移入により産生される。抗 HLA 抗体陽性症例は抗体関連型拒絶反応のハイリスク群であり、抗体関連型拒絶反応は未だ確実な治療法が存在せず、グラフト廃絶の主要な原因となっている。よって一般的に移植前にレシピエント血清中に高度な DSA が存在する場合、移植後超急性拒絶反応をおこすため移植は禁忌とされている。

我々はこのような高感作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、すなわち抗 CD20 抗体である Rituximab とプロテアソーム阻害剤である Bortezomib を段階的に使用する脱感作療法を独自に考案し、DSA 産生を制御し移植を可能とさせ、重篤な合併症なくグラフトを生着させた。この成果は国内外の学会で高く評価をされているが、脱感作期間に約 1 年要するため、代替療法のある腎移植希望患者には応用可能であるが、心臓、肺、肝臓移植希望患者への応用は困難であり、プロトコールの改良が望まれている。

また移植後に新規に産生された DSA は前述のように治療困難な慢性抗体関連型拒絶反応を引き起こし、グラフト廃絶の最大の原因として問題視されており、いかに抗体産生を抑制するかがグラフト生着延長への鍵とな

っている。

当教室では移植関連抗体の産生を制御する目的で、B 細胞の分化様式、活性化メカニズムとその制御法に関わる研究を行ってきた。すなわち移植関連抗原に反応する B 細胞は、それぞれ分化機構や組織局在の異なる B 細胞亜群に属し、血液型抗原に反応する B 細胞は B-1a 細胞、異種糖鎖抗原に反応する B 細胞は B-1b 細胞、HLA ペプチドに反応する B 細胞は B-2 細胞に分類されることを解明した。また各 B 細胞亜群に対する免疫抑制剤の感受性を解析する目的で、in vitro で B 細胞を活性化させるモデルを確立し各種免疫抑制剤に対する感受性を解析した。

さらに 2.5Gy 全身放射線照射を施した重度免疫不全マウス(NOD/SCID)に、ヒト末梢血由来 CD34 陽性幹細胞を投与することにより、ヒト免疫構築細胞を有するヒト化マウスを作製するプロトコールを確立している。

以上の研究成果より抗体関連型拒絶反応の克服に向けて、ヒト化マウスを用い B 細胞分化および抗ドナー抗体産生のメカニズム解析とそれらの制御法の開発ができるかと着想に至った。

2. 研究の目的

我々の考案した段階的脱感作療法の問題点は naïve B cell が回復するまで約 1 年を要することであり、脱感作期間を短縮する必要がある。本研究では naïve B cell の回復をいかに促進させ、かつ抗体産生を制御するか、抗ドナー HLA 抗体を産生するヒト化マウスを作製し、様々な薬剤を用い効率的な抗体産生細胞制御法の確立を目指す。

3. 研究の方法

重度免疫不全マウス(NSG)にヒト末梢血単核球を静脈内投与した翌日、放射線照射を施した HLA 不一致のヒト末梢血単核球を腹腔内に投与し感作させた。腹腔内投与 4 週後にマ

ウス血漿を採取し、Single beads assay 法で抗 HLA 抗体が検出されるか解析した。

4. 研究成果

腹腔内投与回数および細胞数の調整により抗 HLA 抗体が検出可能となったマウスを認めたが、抗ドナーHLA 特異的抗体を十分検出するには至らなかった。次にレシピエント末梢血単核球をあらかじめ放射線照射を施したドナーリンパ球と混合培養し活性化させた後に NSG マウスに投与することで抗 HLA 抗体の産生が促させるか検討したところ、前述の方法よりも効率の良く抗 HLA 抗体が検出されるようになったが、抗ドナーHLA 特異的抗体は検出されなかった。

以上、これまで様々な手法により抗ドナーHLA 特異的抗体を産生するヒト化マウスの作製を目指していたが、抗ドナーHLA 特異的抗体を産生しないマウスが作製されたことより、これらの手法はレシピエントリンパ球のドナー抗原に対する寛容化を導いている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Lalit Kumar Das, Kentaro Ide, Asuka Tanaka, Hiroshi Morimoto, Seiichi Shimizu, Naoki Tanimine, Yuka Tanaka, Hideki Ohdan, Fc-gamma receptor 3A polymorphism predicts the incidence of urinary tract infection in kidney-transplant recipients, Human Immunology, 査読有, 2017, 78(4):357-362. doi: 10.1016/j.humimm.2017.03.006.
2. 井手健太郎, 大段秀樹, 腎移植後拒絶反応のメカニズムと未来, 腎臓内科・泌尿器科, 査読無, 2016, 3(2):101-105
3. Hiroshi Morimoto, Kentaro Ide, Yuka Tanaka, Kohei Ishiyama, Masahiro

Ohira, Hiroyuki Tahara, Tomonori Akita, Junko Tanaka, Hideki Ohdan, Different sensitivity of rituximab-treatment to B-cells between ABO-incompatible kidney and liver transplantation, Human Immunology, 査読有, 2016, 456-63, doi: 10.1016/j.humimm.2016.04.013.

4. Kentaro Ide, Yuka Tanaka, Yu Sasaki, Hiroyuki Tahara, Masahiro Ohira, Kohei Ishiyama, Hirotaka Tashiro, Hideki Ohdan, A phased desensitization protocol with rituximab and bortezomib for highly sensitized kidney transplant candidates, Transplantation Direct, 査読有, 2015, 1 - 6, doi: 10.1097/TXD.0000000000000526
5. 井手健太郎, 大段秀樹, 抗体関連型拒絶反応のメカニズムと制御法, 日本臨床腎移植学会雑誌, 査読有, 2014, 2(1): 8-14

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Kentaro Ide, Hiroyuki Tahara, Asuka Tanaka, Shuji Akimoto, Sapana Verma, Lalit Kumar Das, Seiichi Shimizu, Masahiro Ohira, Kohei Ishiyama, Yuka Tanaka, Hideki Ohdan, Current status of desensitization protocol for highly HLA-sensitized kidney transplant candidates, 第 50 回日本臨床腎移植学会, 平成 29 年 2 月 15-17 日, 神戸市
2. 井手健太郎, 坂井寛, 田中友加, 大段秀樹, TLR-MyD88 シグナル阻害による異種糖鎖抗原反応性 B 細胞の制御, 第 43 回日本臓器保存医学会学術集会, 平成 28 年 11 月 26-27 日, 東京都
3. 井手健太郎, 田中友加, 田中飛鳥, 大段秀樹, ミコフェノール酸と MLR による

免疫モニタリング，第 32 回腎移植・血管外科研究会，平成 28 年 5 月 26-28 日，姫路市

4. 井手健太郎，田原裕之，田中友加，石山宏平，大平真裕，谷峰直樹，佐伯吉弘，清水誠一，坂井寛，広瀬貴行，矢野琢也，石田伸樹，柳川泉一郎，田中飛鳥，大段秀樹，広島大学における肝および腎移植既存抗体陽性症例に対する基本戦略，第 51 回日本移植学会総会，平成 27 年 10 月 1-3 日，熊本市
5. Kentaro Ide, Yuka Tanaka, Yu Sasaki, Hiroyuki Tahara, Masahiro Ohira, Kohei Ishiyama, Hirotaka Tashiro, Hideki Ohdan, A phased desensitization protocol with rituximab and bortezomib for highly HLA-sensitized kidney transplant candidates, CAST 2015, 平成 27 年 8 月 23-26 日, Singapore
6. 井手健太郎，田原裕之，田中友加，石山宏平，大平真裕，森本博司，佐々木由布，谷峰直樹，佐伯吉弘，清水誠一，坂井寛，矢野琢也，石田伸樹，柳川泉一郎，広瀬貴行，Das Lalit Kumar, Sapana Verma, 田代裕尊，大段秀樹，広島大学における前感作肝移植症例に対する脱感作療法，第 33 回日本肝移植研究会，平成 27 年 5 月 28-29 日，神戸市
7. 井手健太郎，田原裕之，大平真裕，石山宏平，田中友加，森本博司，佐伯吉弘，清水誠一，谷峰直樹，坂井寛，矢野琢也，広瀬貴行，佐々木由布，大段秀樹，前感作腎移植症例に対する脱感作療法の実際，第 50 回日本移植学会，平成 26 年 9 月 12 日，東京都

〔図書〕(計 1 件)

井手健太郎，大段秀樹，東京医学社，腎と透析 2014 年 76 巻増刊号 透析・腎移植のすべ

て，免疫抑制療法と拒絶反応の治療 免疫抑制薬の使用法と副作用 リツキシマブ，2014，728

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井手 健太郎 (IDE KENTARO)

広島大学・病院・助教

研究者番号：50511565