

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591413

研究課題名(和文)HLA-Gの移植免疫における機能について—急増する報告の検証—

研究課題名(英文)The potential role of HLA-G on transplantation immunity - examination of increasing recent reports -

研究代表者

石谷 昭子(Ishitani, Akiko)

奈良県立医科大学・医学部・その他

研究者番号：40112544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要(和文)：近年、各種臓器移植において、移植片の生着がHLA-Gの発現と相関するという報告が急増しているため、この検証を行った。その結果、移植の前後、移植片生着の有無に関わらず患者末梢血中にはHLA-G抗原やHLA-G陽性細胞が検出され、移植との有意の相関は認められなかった。ただし、ELISAにより検出された血漿中の可溶性HLA-G抗原は、現時点においては、Western blot によってはHLA-G蛋白であると証明されなかった。

研究成果の概要(英文)：Recently, the number of reports suggesting that HLA-G expression in blood after solid organ and hematopoietic stem cells transplants being associated with successful transplantation has been increasing. To address these findings, we reexamined HLA-G protein expression in kidney, liver and hematopoietic stem cell transplantation. These studies revealed HLA-G expression on peripheral mononuclear cells from patients before or after transplantation, but found no significant association of HLA-G expression with successful transplantation. We also detected HLA-G protein in plasma from patients by ELISA, although we were unable to confirm HLA-G protein in these samples by western analysis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科一般

キーワード：HLA-G 移植 移植片生着 腎移植 肝移植 造血幹細胞移植 可溶性HLA-G

### 1. 研究開始当初の背景

HLA-GはGeraghtyらにより発見された非古典的 HLA クラス 1 遺伝子の一つで多型性が著しく乏しい(*Proc Natl Acad Sci USA*, 1987)。また、HLA-G 分子は免疫担当細胞の表面に発現する ILT2/ILT4 や KIR2DL4 などへの結合を介して NK 細胞や CD8 陽性 T 細胞の増殖応答や細胞傷害活性を抑制することが知られており、免疫抑制能をもつと考えられている。しかも HLA-G は膜結合性のみならず可溶性抗原をも分泌している。

申請者は当初より発見者の Geraghty 氏との共同研究で、この遺伝子が mRNA 特異的な alternative splicing により、可溶性分子を含む多くの isoform を作りだしていることを報告した (Ishitani, Geraghty, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, Fujii et al. *J Immunol* 1994)。他の HLA ではこのように可溶性分子を作り出すものはないことから、この可溶性 HLA-G も重要な機能を持っているものと考えられている。このような HLA-G の機能から、癌免疫や移植免疫等に活用できないかと期待されてきた。

その中で、体外受精分野では 2002 年、Fuzzi らが体外受精卵の培養液中に HLA-G を分泌していない胚は着床しないと報告した (*Eur J Immunol* 2002)。これについて、申請者らも、彼らと全く同じ抗体、同じ方法により追試を行い、彼らの方法では、HLA-G を検出できないことを示した (Sageshima et al. *J Reprod Immunol*, 2007)。

移植医療分野でも近年、HLA-G に関する報告が急増している。2002 年、Lila らは、心移植において移植片および患者血清が HLA-G 陽性の患者は慢性拒絶・急性拒絶が HLA-G 陰性者と比較して少ないと報告した (*Circulation*, 2002)。また、Luque らは、移植前および免疫抑制剤投与後、血漿中 HLA-G 濃度が高い患者は生着率が高いと報告した (*Transpl Immunol*, 2006)。腎移植については、移植後の血清中可溶性 HLA-G の存在と移植片の生着とが関連しているという報告も多く発表された (Qiu et al. *Am J Transplant*. 2006, Crispim et al. *Transpl Immunol*. 2008)。

以上のごとく HLA-G が発現していると移植片生着・受精卵着床率が高いという非常に興味深い報告が、多く発表されている。これらが真実であるとすれば、HLA-G の機能解析に重要なデータであり、HLA-G の移植治療への応用が可能となる。しかし、申請者は、これまで体外受精卵における HLA-G 発現を詳細に検討した結果、これらのデータを否定せざるを得なかった。血漿を含む生体成分中 HLA-G の検出方法はいまだ確立されてい

い。上記の結果がもし真実でなければ、HLA-G を移植予後推察に使用するの是非常に危険である。一方、真実であれば、非常に有用なツールとなりうる。したがって、これを明らかにすることは、移植分野において急務であると考え、本研究を提案するに至った。

### 2. 研究の目的

近年、各種臓器移植において、移植片の生着と HLA-G の発現が関連しており、将来これが治療に応用できるという報告が急増している。本研究では、これらの報告を詳細に検証し、これらの結果が確認されれば、HLA-G の移植時免疫抑制機構を解析することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### 移植患者試料の収集

肝移植、腎移植、造血幹細胞移植患者の血液およびバイオプシ標本の残余を収集。血液試料の採取は移植前および移植後は通常、1 週間、2 週間、4 週間、6 週間、8 週間、半年、1 年後採取した。

#### ヒト血漿中 HLA-G の高精度測定法の確立

血漿を含め、生体成分中の HLA-G を正確に測定するための方法を確立する。共有蛋白の除去、免疫沈降による HLA-G の抽出等につき検討。

肝移植、腎移植、造血幹細胞移植患者における ) フローサイトメトリー、western blotting による単核球上の HLA-G の発現検索、 ) ELISA, western blotting による血漿中の HLA-G の発現検索。

### 4. 研究成果

#### 収集試料

肝移植 50 症例 237 検体、腎移植 66 症例 389 検体、造血幹細胞移植 41 症例 735 検体の血液試料を収集した。しかしバイオプシ標本は僅か 5 試料のみであった。

#### ヒト血漿中 HLA-G の高精度測定法の確立

これまでの研究成果から、抗 HLA-G 抗体 G233 と、抗 HLA class I 抗体 W6/32 を使用した系で、0.02ng/ml 以上であれば HLA-G を検出することが明らかであったので、この系を使用して、以下の条件で、血漿中の HLA-G 抗原検出を試みた。

) 血漿を 100 倍希釈して測定。

) サンプル中塩濃度を 0.5M にして測定 (非特異的反応抑制のため)

) ブロッキング剤

) 反応時間

しかし、これらの条件検討を行っても、血漿中の非特異的反応を抑えることができなかった。(非特異的反応であるかはサンプル中の

HLA-G をウエスタンブロッティングすることにより確認した。)

肝臓、腎臓、膵臓等の微量の組織片の免疫染色

バイオプシ標本が新鮮凍結標本でしか提供されない。新鮮凍結標本における免疫染色法は、すでに確立しているが、バイオプシ標本における HLA-G の発現解析は、標本収集が不十分であり、解析ができなかった。

肝移植、腎移植、造血幹細胞移植患者血液における HLA-G の発現

単核球上の HLA-G の発現(フローサイトメトリー、western blotting)

本研究期間内で収集可能であったサンプル

(術前、術後 1 年まで)について、解析を行った。

これまでの結果から、移植片の生着・拒絶反応・GVHD の有無に関らず、腎臓・肝臓・造血幹細胞移植患者の末梢血

単核球中に HLA-G 陽性細胞が出現することが明らかとなった(図 1)。これらの結果から、拒絶反応・GVHD と HLA-G 発現との相関を解析したところ、拒絶反応・GVHD の発生した症例では HLA-G 陽性細胞率が低い傾向がみられたが有意ではなかった(表 1)

表 1. 移植後患者における HLA-G 陽性細胞率

		拒絶反応/GVHD 有り	拒絶反応/GVHD 無し	p 値
HLA-G 陽性細胞率	肝臓移植	3.55 ± 5.33 (n=45)	5.28 ± 6.75 (n=39)	0.319
	造血幹細胞移植	0.77 ± 2.08 (n=91)	1.35 ± 4.04 (n=87)	0.16
	腎臓移植	症例なし	4.17 ± 3.24 (n=124)	

P 値: Mann-Whitney's U test, n=延べ測定回数

血漿中の HLA-G の発現 (ELISA, western blotting)

図 2 に肝移植患者の血中 HLA-G 陽性細胞率(折れ線グラフ)および血漿中の可溶性 HLA-G 濃度(棒グラフ)を示した。HLA-G 陽性細胞の検出には 87G, G233, MEMG9 の 3 種の抗 HLA-G モノクロナル抗体を用いて、可溶性 HLA-G の定量には、最も感度が高い G233 を用いた。しかし、これらサンプル中において、ELISA により検出された HLA-G はウエスタンブロットによっては検出されていない。このことから、ELISA により検出された蛋白が HLA-G であることには疑問が残された。

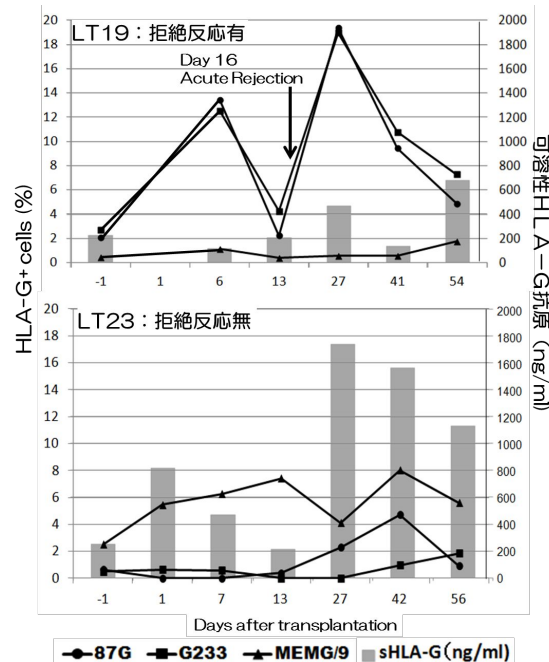


図 2. 肝臓移植患者における HLA-G 陽性細胞率および血漿中可溶性 HLA-G 抗原濃度の変動

これは、ごく一部の結果であるが、HLA-G 濃度、陽性率は、移植後の時期により大きく変動している。

拒絶反応有りの LT19 の場合は拒絶反応の前後で陽性率が大きく変動している。一方、拒絶反応なしの LT23 においても少し変動が見られた。投与薬剤の影響か?

HLA-G の発現量が個人により大きく異なっていた。個人の遺伝的素因か?

抗体によって、反応性が大きく異なっていた。発現している HLA-G の構造による影響?

以上のように、HLA-G 発現検索の結果からさらなる疑問が生じており、今後の研究が必要と考えられる。また、HLA-G は alternative splicing により多種の isoform をつくり (Ishitani et al), さらには 2 量体でも存在しうる (Kuroki & Maenaka, Eur J Immunol. 2007 37(7):1727) ことから、抗体の認識部位によって、その反応性が異なると考えられる。このような 4 次構造の違いによる抗体の反応性の違い等も検討を要すると考えられる。

以上の結果から、移植後患者末梢血中に、HLA-G 陽性細胞、HLA-G 抗原が検出され、移植前後で変動の見られる症例もあるが、拒絶反応・GVHD 発症例との有意の相関は見られなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2件)

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 9 月 15 日、明治大学駿河台キャン  
パス アカデミーコモン・リパティタワー

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

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

### (2)研究分担者

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

### (3)連携研究者

一戸 辰夫 (ICHINOHE TATSUO)  
広島大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：80314219

上本 伸二 (UEMOTO SHINJI)  
京都大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：40252449

高原 史郎 (TAKAHARA SHIRO)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：70179547

森井 武志 (MORII TAKESHI)  
奈良県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70264851

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