

平成 26 年 4 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659587

研究課題名(和文)末梢血B細胞から形質細胞分化誘導システムの樹立と高感度抗体産生モニタリング

研究課題名(英文)Development of in vitro culture for peripheral B cell differentiation into plasma cell

研究代表者

小林 孝彰(Kobayashi, Takaaki)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座教授

研究者番号：70314010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血B細胞から形質細胞まで分化誘導する新しいin vitro培養システムの樹立を試みた。CD40L, CpGODN, サイトカインなど最適の因子を各ステップで添加する3ステップ法にて、各種免疫抑制剤のB細胞の分化過程における作用部位の違いを明確にした。APRIL、BAFF、mitogen刺激T細胞分泌因子、脂肪由来間葉系幹細胞を利用して効率的なHLA抗体産生培養系を確立した。移植後の末梢血B細胞を用いて慢性抗体関連型拒絶反応の早期診断の可能性を評価する。

研究成果の概要(英文)：We attempted to develop a novel in vitro culture assay for proliferation and differentiation of peripheral B cells into plasma cells. Using 3 step culture method, the difference in action points (in the process of B cell differentiation) between clinical available immunosuppressive agents such as calcineurin inhibitor (CNI), mTOR-inhibitor (mTOR-I), anti-metabolite and steroid was clarified. The results showed anti-metabolite, mTOR-I and steroid could suppress B cells in the early, middle and late phase, respectively. Effective method for HLA antibody secretion in the B cell culture system has been established using APRIL (A proliferation-inducing ligand), BAFF (B cell activating factor), mitogen-stimulated T cell secretion and adipose-derived mesenchymal stem cells. We can move on to the next step to evaluate early diagnosis of chronic antibody mediated rejection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植・再生医療 Bリンパ球 形質細胞 培養 HLA抗体

1. 研究開始当初の背景

(1) 臓器移植後には、拒絶反応の制御が重要である。拒絶反応には(急性・慢性) T細胞関連型と抗体関連型拒絶反応に分類される。腎移植領域では、急性 T細胞関連型拒絶反応の発現率は 10-15%程度まで減少し、短期成績は大幅に改善された(生体腎移植生着率 95.9%(1年)、91.5%(5年))。

(2) 短期成績が向上した一方で、5-10年以降の長期成績は、改善されていない。移植を多く実施しているアメリカでも同様に長期成績の改善が重要課題となっている。

(3) HLA抗体による慢性拒絶反応が長期生着を妨げている(長期生着は医療経済的に重要)。慢性拒絶反応は、ドナーHLAに対する抗体(DSA)によって引き起こされる。患者QOLだけでなく、医療経済の見地から移植腎廃絶による透析再導入を減らすことが重要である(年間透析費用500万円 vs 移植1年目600万円2年目以降150万円)。腎移植数は2010年1481例であり、2万人以上の臓器移植患者をFollow Upしている。改正臓器移植法の施行により、この数年で増加することが期待される。

(4) 現在の血清中 HLA抗体モニタリングには限界(False Negative)がある。最近Microbeadsに1種類のHLA抗原を付着させ、Luminexシステムにて血清中のDSA(donor specific antibody)の詳細な解析が可能となり、私どもはHLA class IIとくにDRBに対する抗体が予後に影響を及ぼすことを見出した。しかし、DSAはグラフト血管内皮に吸着されるため移植後では微量抗体は検出されにくい。

(5) 慢性拒絶反応の早期診断と治療のため、高感度かつ特異的な解析方法の開発が望まれる。慢性拒絶反応は不可逆的な変化を示すため、治療開始が遅れば無効となる。繰り返し検査が可能な末梢血のB細胞を用い*in vitro*培養系で形質細胞まで増殖、分化を自在に操作できる方法の開発をめざす。分化した形質細胞が産生する抗体を解析することで、患者の抗体産生状態を詳細に把握する事が可能と考えた。

2. 研究の目的

(1) 臓器移植において、近年の有効な薬剤の開発等によりT細胞性拒絶反応はほぼ克服されたが、長期成績を妨げる慢性抗体関連型拒絶反応の制御が課題となっている。慢性抗体関連型拒絶反応は、移植後ドナーのHLAに対して産生される抗体が原因とされ、早期診断、治療が重要である。末梢血中のHLA抗体の検出、特異性解析が各種臓器移植で行われているが、CAMR初期の段階では移植グラフトに抗体が吸着されて末梢血では検出が困難である。また、輸血、移植、妊娠などHLAに感作され、移植前にドナーに対する抗体が存在するドナー特異的HLA抗体(Donor

Specific Antibody: DSA)陽性移植では、移植後の免疫反応(抗体産生)を予測する方法がないため、移植適応、脱感作療法の適応について正確に評価できるアッセイを確立したい。

(2) 末梢血B細胞を用い、形質細胞まで分化増殖可能な培養アッセイ系を確立することで、抗体関連型拒絶反応に関する有用な情報を提供する。

(3) このアッセイを用い、培養上清中に産生されたHLA抗体を解析することで、グラフト吸着の影響を受ける血中HLA抗体とは異なり、より高感度の検出系が樹立される。難治性と考えられた慢性抗体関連型拒絶反応の早期に診断・治療が可能となる。

(4) メモリーB細胞を用い、このアッセイ系で抗体産生を解析することで、移植前DSA陽性移植例における、移植後の免疫反応(抗体産生)の程度を予測し、正確な移植適応判定、適切な脱感作療法の実施が可能となる。

(5) このアッセイを移植前に各種免疫抑制剤のB細胞感受性試験に用い、個々の患者に最適の免疫抑制剤の選択、投与設計を行うことができる。

3. 研究の方法

(1) 採血後、末梢血単核球(Peripheral Blood Mononuclear Cell: PBMC)をHIstopaque-1077を用いて比重遠心法にて分離した。B細胞薬力学解析の一つとして細胞増殖をCFSE-flow cytometryにて評価した。T細胞刺激はmitogen(PHA)、CD3/28 beadsを用いた。B細胞刺激は、BCR抗体(IgM抗体)、CD40Lを用いた。シグナル伝達経路、細胞表面マーカーの変化を解析した。

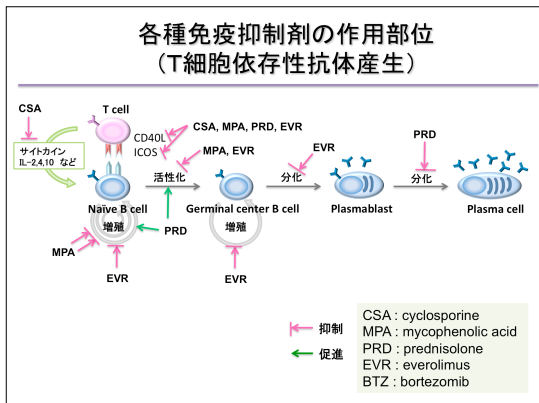
(2) MACS separationキット(Milteny Biotec GmbH)を用いてCD19陽性細胞を回収して、B細胞培養実験を行った。IMDM(Iscove's modified Dulbecco medium)培養液を用い、3ステップ法では、各ステップ毎に異なるサイトカインを調整して添加した(ステップ1ではCD40L, CpGODN, IL-2, 10, 15、ステップ2ではIL-2, 6, 10, 15、ステップ3ではIFN-alpha, IL-6, 15)。1ステップ法では、CD40L, CpGODN, IL-21のみで実施した。免疫抑制剤として、calcineurin inhibitor(CNI)はcyclosporine, tacrolimusを、mTOR阻害剤(mTOR-I)はeverolimusを、代謝拮抗剤(anti-metabolite)はmycophenolic acidを、ステロイドはprednisoloneを用いた。

(3) さらに効果的なB細胞分化培養システムを樹立するために、B細胞増殖因子であるAPRIL(A proliferation-inducing ligand)、BAFF(B cell activating factor)などのTNF

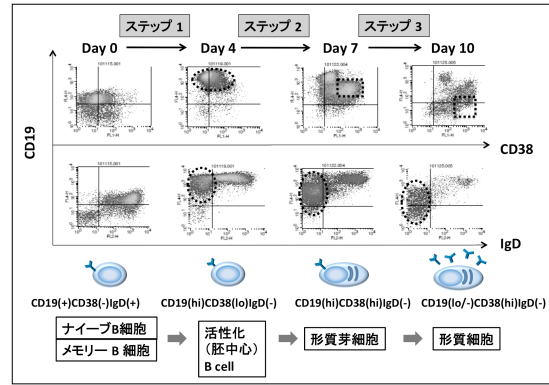
α サイトカインファミリーに属する B 細胞増殖関連因子の働き、Toll Like Receptor 9 のアゴニストである CpGODN、それ以外に効率的な B 細胞分化培養に必要な因子について詳細な検討を加えた。HLA 抗体は ナイーブ B 細胞より、メモリー B 細胞の関与が大きいと考へ、CD27 ビーズを用いて分離して形質細胞までの分化、抗体産生について解析した。

4. 研究成果

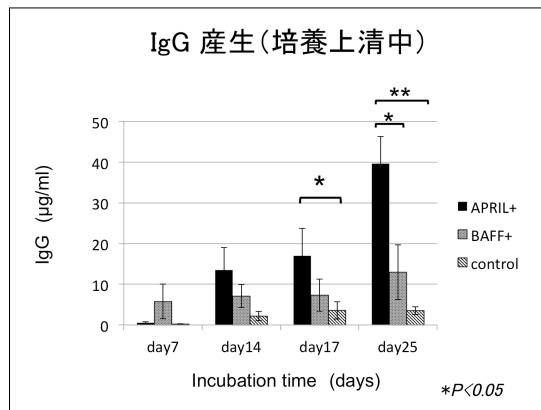
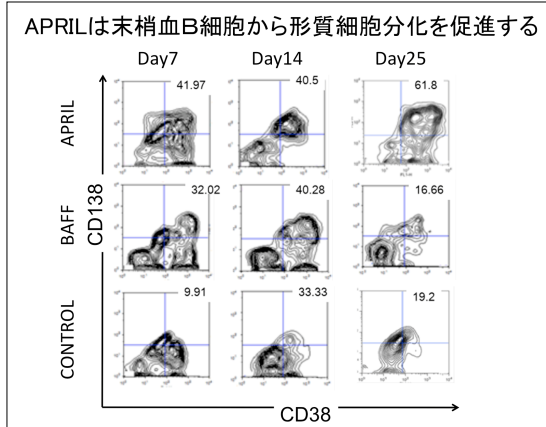
(1) B 細胞の薬力学解析として細胞増殖を評価するアッセイを確立した。(A) T 細胞非依存性 (抗 IgM 抗体を用いた BCR を介した刺激)、(B) T 細胞依存性 (CD40-CD40L 経路からの刺激) の B 細胞培養増殖後、CFSE-flow cytometry およびシグナル伝達解析を実施した。B 細胞には、PI3K/Akt, MAPK, NF-κB だけでなく NFAT シグナル伝達が関与し、前者 (A) はとくに NFAT の関与により CNI での抑制が認められたが、後者 (B) は認められなかった。しかし、T 細胞には、CNI, Anti-metabolite, mTOR-I ともに CD40L, ICOS の 発現抑制が認められ、T 細胞依存性の B 細胞抑制に働くと考えられた。



(2) 培養系で末梢血 B 細胞から形質細胞まで分化誘導を試みた。CD40L, CpGODN, IL-2, IL-6, IL-10, IL-15 を用いた 3 ステップ培養法により、末梢血 CD19 陽性 (成熟) B 細胞から、活性化 B 細胞、形質芽細胞、形質細胞まで分化誘導に成功し、7 日以降の培養上清に IgG 産生を認めた。現在臨床で使用されている代謝拮抗剤、mTOR 阻害剤を用いて、B 細胞分化増殖の作用部位の違いを明らかにした。3 ステップによる末梢血 B 細胞から形質細胞への分化培養方法を樹立した。成熟 B 細胞 → (ステップ 1) → 活性化 B 細胞 → (ステップ 2) → 形質芽細胞 → (ステップ 3) → 形質細胞までを詳細解析することで、各種免疫抑制剤の作用部位の違いを明らかにした。Anti-metabolite は、分化早期の段階で細胞増殖を抑制し、mTOR-I は中期の段階で増殖と分化を抑制し、ステロイド (高用量のみ) は後期で分化を抑制した。



(3) 主として BAFF は分化の前半で、APRIL は分化の後半で作用する。ともに B 細胞の分化増殖促進作用があるが、APRIL のみ培養上清に IgG 産生を増加し、形質細胞までの分化、生存維持に重要な役割を果たしていることが判明した。HLA 抗体陽性患者の B 細胞を解析し、培養上清および血清中の HLA 抗体の特異性を解析したところ、同じような傾向が見られたが、血清中で高い MFI 値を示す B 細胞検体のみ培養で同じ種類の HLA 抗体を産生した。CD27 ビーズを用いてメモリー B 細胞とナイーブ B 細胞に分けて APRIL の効果を比較したところ、APRIL は、IgG 産生を増加するが、主としてナイーブ B 細胞由来の形質細胞であり、メモリー B 細胞に対する作用は弱いことが判明した。



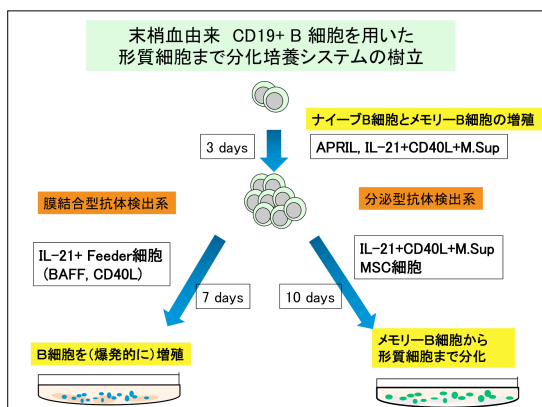
(4) T 細胞をマイトジェンで刺激し、分泌されたサイトカインを含む培養上清 (T cell

sup)を利用することで、著しい形質細胞数の増加とIgG産生量を認めた。ナイーブ細胞とメモリー細胞に分けて解析した結果、T cell sup + APRIL が効率的に形質細胞分化、IgG産生増加を誘導した。

(5) メモリーB細胞を効率的に分化させる方法として間葉系幹細胞 (MSC) との共培養による効果を確認した。とくにIgM型メモリーB細胞由来のクラススイッチ、IgG型の分化増殖を促進した。TLR9のアゴニストであるCpGODNは、ナイーブB細胞のクラススイッチを促進するが、メモリーB細胞には作用しなかった。

(6) BAFF feeder細胞 (BAFF発現) fibroblastは、成熟B細胞の増殖を著しく促進するが、培養上清にはIgG産生につながらず、形質細胞までは分化誘導しにくいことが判明した。

(7) 臨床検体では、大量採血が困難であり、また細胞数が少ないことを考慮し以下の方法を確立した。まず、細胞数を増加させるため、最初の3日間をAPRIL+IL-21+CD40L+T cell supで培養し、以下の2つの方法で解析する。(A)分泌型抗体を検出するために、IL-21+CD40L+T cell sup+ MSCで10日培養、(B)膜型抗体を検出するために、IL-21+BAFF, CD40L発現Feeder細胞上で7日培養、それぞれ、培養上清中、細胞膜のIgG, IgMを解析する方針を立てた。臨床検体を用いた、Prospective Studyを効率的に進めて行くことが可能となった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 15 件)

- ① 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.
- ② Satoshi Ashimine, Yoshihiko Watarai,

Takayuki Yamamoto, Takahisa Hiramitsu, Makoto Tsujita, Koji Nanmoku, Norihiko Goto, Asami Takeda, Akio Katayama, Kazuharu Uchida and Takaaki Kobayashi, Neither pre-transplant rituximab nor splenectomy affects de novo HLA antibody production after renal transplantation, Kidney International, 査読有、85 巻、2014、425-430.

- ③ Takeda Y, Bui VN, Iwasaki K, Kobayashi T, Ogawa H, Imai K. Influence of olive-derived hydroxytyrosol on the toll-like receptor 4-dependent inflammatory response of mouse peritoneal macrophages. Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有、446 巻、2014、1225-1230.
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.094.
- ④ Shigeyoshi Yamanaga, Yoshihiko Watarai, Takayuki Yamamoto, Makoto Tsujita, Takahisa Hiramitsu, Koji Nanmoku, Norihiko Goto, Asami Takeda, Kunio Morozumi, Akio Katayama, Hiroh Saji, Kazuharu Uchida, and Takaaki Kobayashi, Frequent development of subclinical chronic antibody-mediated rejection within 1 year after renal transplantation with pre-transplant positive donor-specific antibodies and negative CDC crossmatches, Human Immunology, 査読有、74 巻、2013、1111-1118.
DOI: 10.1016/j.humimm.2013.06.022.
- ⑤ Kenta Iwasaki, Yuko Miwa, Masataka Haneda, Takafumi Kuzuya, Haruko Ogawa, Akira Onishi and Takaaki Kobayashi, AMPK as a promoting factor, but complement and thrombin as limiting factors for acquisition of cytoprotection: Implications for induction of accommodation, Transplant International, 査読有、26 巻、2013、1138-1148.
DOI: 10.1111/tri.12186.
- ⑥ Nishi T, Iwasaki K, Ohashi N, Tanaka C, Kobayashi D, Nakayama G, Koike M, Fujiwara M, Kobayashi T, Kodera Y. Phosphorylation of 4E-BP1 predicts sensitivity to everolimus in gastric cancer cells, Cancer Letters, 査読有、331 巻、2013、220-229.
DOI: 10.1016/j.canlet.2013.01.004.
- ⑦ Iwasaki Kenta, Ray Paul, Huang Bo-Wen, Sakamoto Kensuke, Kobayashi Takaaki, Tsuji Yoshiaki. Role of AMP-activated Protein Kinase in Ferritin H Gene Expression by Resveratrol in Human T cells,

Biochemistry, 査読有、52 卷、2013、2075-5083.

doi: 10.1021/bi400399f.

- ⑧ Iwasaki K, Miwa Y, Ogawa H, Iwamoto M, Furusawa T, Onishi A, Kuzuya T, Haneda M, Watarai Y, Uchida K, Kobayashi T. Comparative Study on Signal Transduction in Endothelial Cells after Anti-A/B and HLA Antibody Reaction: Implication of Accommodation, Transplantation, 査読有、93 卷、2012、390-397
DOI: 10.1097/TP.0b013e3182424df3.
- ⑨ Takeda A, Otsuka Y, Horike K, Inaguma D, Hiramitsu T, Yamamoto T, Nanmoku K, Goto N, Watarai Y, Uchida K, Morozumi K, Kobayashi T, Significance of C4d deposition in antibody-mediated rejection, Clin Transplantation, 査読有、26 (Supple 24) 卷、2012、43-48.
DOI:10.1111/j.1399-0012.2012.01642.

[学会発表] (計 64 件)

- ① Masataka Haneda, Yoshiko Matsuda, Yuko Miwa, Kenta Iwasaki, Yoshihiko Watarai, Kazuharu Uchida, Takaaki Kobayashi. Peripheral B cell culture for assessment of immune response to ABO blood type carbohydrate antigens. International Xenotransplantation Association (IXA) 2013. 2013/11/10-13. Osaka International Congress Center, Osaka (Japan).
- ② Yoshiko Matsuda, Masataka Haneda, Takahisa Hiramitsu, Yoshihiko Watarai, Takaaki Kobayashi. The impact of TNF-alpha cytokine family on the B cell assay in vitro - naïve B cell differentiation for long lived plasma cell. 3rd ESOT Basic Science Meeting/13th TTS Basic Science Meeting. 2013/11/7-9. Paris (France).
- ③ 松田佳子、稲永由紀子、平光高久、三輪祐子、岩崎研太、羽根田正隆、小林孝彰. In vitro における Tumor necrosis family-alpha (TNF- α) cytokine の B 細胞培養系への影響. 49 回日本移植学会. 2013/9/5-7. 国立京都国際会館、京都
- ④ 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. 49 回日本移植学会. 2013/9/5-7. 国立京都国際会館、京都
- ⑤ 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. 49 回日本移植学会. 2013/9/5-7. 国立京都国際会館、京都
- ⑥ Yoshiko Matsuda, Yuko Miwa, Kenta Iwasaki, Masataka Haneda, Takaaki

Kobayashi. Plasma cell maturation and transformation in vitro. Congress of Asian Society of Transplantation (CAST) 2013. 2013/9/2-6. Kyoto International Conference Center, Kyoto (Japan)

- ⑦ Yoshiko Matsuda, Yuko Miwa, Kenta Iwasaki, Masataka Haneda, Takaaki Kobayashi. The impact of the tumor necrosis factor-alpha family on B cell proliferation in vitro. Congress of Asian Society of Transplantation (CAST) 2013. 2013/9/2-6. Kyoto International Conference Center, Kyoto (Japan)
- ⑧ 小林孝彰. 抗体スクリーニングに基づく個別化免疫抑制法. 29 回腎移植血管外科研究会. 2013/6/29. 青森県浅虫温泉海扇閣、青森
- ⑨ M. Haneda, M. Owaki, K. Iwasaki, Y. Miwa, Y. Watarai, K. Uchida, T. Kobayashi. 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. 2013/5/18-22. Seattle (USA)
- ⑩ Takaaki Kobayashi. Expansion of donor sources. Hurdles of xenotransplantation. The 42nd Annual Congress of the Korean Society for Transplantation & The 9th Korea-Japan Transplantation Forum. 2012/10/19-20. Incheon (Korea)
- ⑪ 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. 48 回日本移植学会. 2012/9/20-22. 愛知県産業労働センター、名古屋
- ⑫ 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. 48 回日本移植学会. 2012/9/20-22. 愛知県産業労働センター、名古屋
- ⑬ Kobayashi T, Yamamoto T, Kuroki K, Hiramitsu T, Tsujita M, Goto N, Nanmoku K, Nagasaka T, Ohtsuka S, Katayama A, Watarai Y, Takeda A, Morozumi K, Uchida K. No Inhibitory Effect of Pre-Transplant Desensitization Treatment with Rituximab or Splenectomy on de Novo HLA Antibody Production in Renal Transplantation. 24th International Congress of The Transplantation Society. 2012/7/15-19. Berlin (Germany)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

羽根田 政隆 (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

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

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

葛谷 孝文 (KUZUYA, Takafumi)
名古屋大学・医学部附属病院・薬剤部副部
長
研究者番号：00444406
平成 24 年 4 月辞退

(3) 連携研究者 なし