

令和元年6月18日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10022

研究課題名(和文) RNA干渉を利用した抗ドナーHLA抗体産生形質細胞に対する特異的治療戦略

研究課題名(英文) Therapeutic strategies for anti-donor HLA antibody-producing plasma cells using RNA interference

研究代表者

羽根田 正隆 (HANEDA, Masataka)

愛知県がんセンター(研究所)・個別化医療TR分野・研究員

研究者番号：50436995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗体はそれぞれ相補性決定領域(CDRs)を有しており、その部分に特異性がある。このCDRsをターゲットとしたRNA干渉による抗体産生への抑制効果について検討を行なった。ヒト抗A IgM抗体産生株HB8534を用いて、超可変領域のCDR2・3に対するRNA干渉を試みた所、mRNA発現およびIgM抗体産生は約30%抑制され、CDRsに対するRNA干渉による治療法の可能性について示すことが出来た。形質細胞に対する遺伝子導入試薬の選定を行ったが、市販の試薬ではRNA干渉の検討を行う事が出来なかった。CDRsに対するRNA干渉による治療法の実現に、形質細胞へ遺伝子導入可能な試薬の開発が望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患特異的抗体の作用により、臓器移植後の抗体関連型拒絶反応や自己免疫疾患が引き起こされる場合がある。B細胞や形質細胞全般に作用する治療薬はあるが、疾患特異的抗体を産生する形質細胞にのみ作用する治療法は今まで報告がなかった。

疾患特異的抗体には特異的な相補性決定領域(CDRs)を有しているが、今回このCDRsをターゲットとしたRNA干渉により、培養細胞において抗体産生抑制作用を示す事が出来た。しかし形質細胞へ遺伝子導入できる試薬は入手出来ず、形質細胞におけるRNA干渉の検討は出来なかった。

CDRsに対するRNA干渉による治療法の実現に、形質細胞へ安定的に遺伝子導入可能な試薬の開発が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Specific antibodies have complementarity determining regions (CDRs), and the positions are different from the other antibodies.

We examined whether it is possible to suppress antibody production by post-transcriptional gene silencing targeting CDRs, at first. When RNA interference against hypervariable region, CDR2 and 3, were designed and transfected to HB8534, human anti-A IgM antibody-producing cell line, about 25% of mRNA and about 30% of anti-A antibody reduction were observed. These results indicate that RNA interference targeting CDRs is valuable.

Next, we examined gene transfer reagents, which commercially available. But these reagents caused cytotoxicity to plasma cells, the effects of RNAi could not be analyzed. The further development of gene transfer reagents to plasma cells is required.

研究分野：移植免疫学

キーワード：RNA干渉 DSA 抗A抗体 抗HLA体 形質細胞

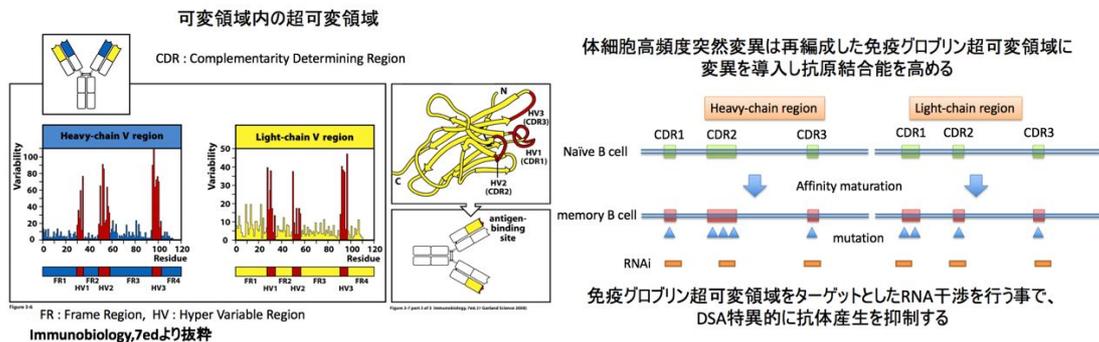
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗体関連型拒絶反応は移植組織由来の非自己成分に対して抗ドナー抗体が産生されることによって起きる。多くはドナーHLA に対する抗体(donor specific antibody; DSA)や ABO 不適合移植の際の抗 ABO 抗体によるものである。移植前にドナー抗体が存在することが判明している場合、急性抗体関連型拒絶反応を予防する方法として脾摘や抗 CD20 抗体(リツキシマブ)投与、IVIg、形質細胞に直接効果がある分子標的薬であるプロテアソーム阻害剤(ボルテゾミブ)などを組み合わせることで、術前減感作を行うなどの治療法が開発されている。一方、移植 2~3 年後より起きる慢性拒絶反応では de novo に抗ドナーHLA 抗体が産生され、抗体価の上昇に伴い移植組織は拒絶されるようになる。ボルテゾミブは抗体を獲得した移植半年以内の早期抗体関連型拒絶反応に対しては比較的有効であるが、晩期の拒絶反応や骨髄内に移行した長期生存形質細胞に対しては効果が低いといった報告がなされてきた (Semin Hematol.2012.49:263-9.)。一方、この慢性拒絶反応の原因となる DSA に対する治療法は研究開始時に報告がなかった。

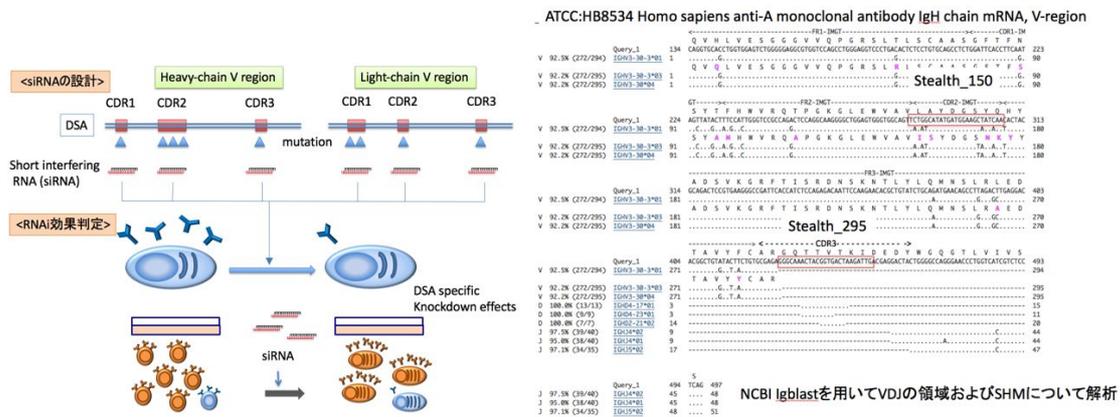
2. 研究の目的

抗ドナー抗体を産生する形質細胞については末梢血中にはほとんど存在しておらず、骨髄穿刺を行わなければ確認する事が出来ないといった報告がなされてきたが(American Journal of Transplantation 2008 ; 8:133-143)、我々は、Michel Jourdan らが報告した培養法(Blood 2009;114:5173-5181)を一部改良し、形質細胞まで効率よく分化誘導する系を確立した(Cell Immunol.2015;295:127-36)。この培養系を用いて DSA 陽性患者 B 細胞を培養し、血清中に DSA が充分量ある症例においては培養上清に DSA を検出する事が出来、そのプロファイルが一致していることが確認できた。血清中に DSA が充分ある場合には、最終分化すれば DSA を産生することになるメモリー-B 細胞が末梢血中に循環していることを明らかにした。この培養系を用いれば DSA のイムノグロブリンの塩基配列を構造決定することができる。一方、市販されている抗 A 抗体を産生するヒト由来 anti-A IgM 産生ハイブリドーマ (ATCC-HB8534)を用いて IgH および IgK の遺伝子を単離し、塩基配列を決定してきた。得られた IgH および IgK の VDJ および VJ 領域の塩基配列は NCBI に登録されている anti A BCR を持つ EBV-transformed B cell line とほぼ一致しており、由来の全く異なる抗 A 抗体でありながら、IgH の超可変領域は完全に一致しており、affinity maturation が起こると超可変領域のアミノ酸配列や塩基配列が収束する可能性を見出した。このように抗ドナー抗体(抗 A 抗体や抗 HLA 抗体)の塩基配列を入手する方法を確立していた。



形質細胞に対してはボルテゾミブにより増殖抑制をするといった治療法があるが、疾患の原因となる抗体産生に対する特異的な治療法は今まで報告がなかった。特異的抗体はそれぞれに相補性決定領域(CDR; complementary determining region)を有しており、その部分のみが他の抗体と異なっている。この CDRs をターゲットとした RNA 干渉による抗体産生抑制が可能であれば、疾患特異的抗体に対してのみ抗体産生抑制を誘導することが出来、通常の免疫反応に影響をし

ない、疾患特異的な治療法が確立できると考えた。



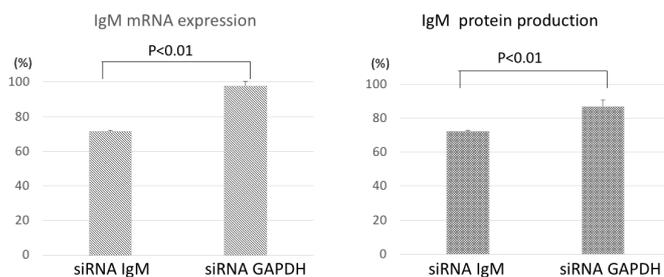
3. 研究の方法

(1) ヒト抗 A IgM 抗体に対する siRNA の設計

HB8534 hybridoma より得られた IgH の遺伝子情報より超可変領域の CDR2 および 3 に対する siRNA を設計した。

(2) ヒト抗 A IgM siRNA の抗体産生に与える抑制効果の検討

方法：siRNA は細胞内での安定性が高く、細胞毒性が低い Thermo Fisher 社の stealth siRNA を使用した。HB8534 hybridoma に対する抗体産生抑制について IgH mRNA および抗 A IgM 抗体産生の抑制作用を検討した。またトランスフェクション試薬として GenomeONE-Si を使用した。結果：投与後 24h, 48h, 72h で抑制効果を検討したところ 24h では IgH mRNA の発現抑制効果が認められたが、48h 以降では抑制効果が認められなかった。24h 後の時点で IgH mRNA では約 25% 抑制効果が認められた。抗 A IgM 抗体産生は 24h 後に約 30%の抑制効果が認められたが、陽性コントロールとして使用した GAPDH stealth siRNA でも約 20%の抑制効果が認められた。考察：培養細胞株は増殖してゆくため、時間経過とともに siRNA の相対量が減少し、投与後短い時間の場合にのみ RNAi の効果が認められた。GAPDH でも抑制効果が認められたのは double strand RNA による off-target 効果と考えられた。stealth siRNA は特異性が高いとされているが GAPDH siRNA でも抑制されており 25nt と比較的長いためと考えられた。



(3) ヒト IgG1 抗体および IgM 抗体特異的な siRNA を設計

抗ドナー特異的抗体産生形質細胞のみをターゲットとした抗体産生抑制効果がえられる siRNA を作成する事を最終目的とするが、ターゲットが少量である事や抗ドナー抗体を産生する形質細胞のみでは研究を行うには少量すぎて効果判定が難しいため、抗ドナー抗体の相補性決定領域(CDR;complementary detemining region)をターゲットとして siRNA を作成するのではなく、抗体の基本骨格であるフレームワーク領域(FR: framework region)をターゲットとして siRNA を作成し、siRNA の抗体産生抑制効果を検討することとした。

(4) ヒト IgG1 抗体および IgM 抗体特異的な siRNA の抗体産生に与える抑制効果の検討

方法：ヒト末梢血中の形質細胞をミルテニー社の Whole Blood CD138 マイクロビーズ kit を用いて採取し、短期間培養を行い IgG1 および IgM 特異的産生形質細胞数を ELISPOT assay にて判

定した。この培養系に対して、IgG1 および IgM の FR 特異的な siRNA を設計、作成し、トランスフェクション試薬として GenomeONE-Si を用いて核酸導入を行い、抗体産生細胞数の減少率を検討した。GenomeOne-Si を利用して siRNA を細胞に導入を行った。

結果：mRNA レベルおよび ELISpot アッセイで抗体産生の抑制を認めたものの、ネガティブコントロール(試薬のみ)でも抑制された。

考察：設計した siRNA の効果判定を行うことは出来なかった。形質細胞へ安定的に遺伝子導入できる試薬の選定が必要となった。

(5) 遺伝子導入試薬の選定

方法および結果：形質細胞へ安定的に遺伝子導入できる試薬の選定を行ったが、市販の試薬 (lipofectamine 2000, lipofectamine 3000, lipofectamine RNAiMAX, SuperFect Transfection Reagent, jetPEI, ポリアミドアミン (PAMAM) デンドリマーを使用した) が、形質細胞に対して遺伝子導入試薬を使用する事で、殺細胞効果が現れ、特異的抑制効果についての判定が困難であった。

考察：形質細胞への遺伝子導入についての報告は見出せないが、形質細胞腫である myeloma cell line への遺伝子導入についての報告があり、myeloma cell line の種類によっては Lipofectamine 2000 や jetPEI での遺伝子導入が可能であるとされる (Avicenna J Med Biotechnol. 2010 Jul-Sep; 2(3): 123-130.)。また primary culture B 細胞については AMAXA 社の Nucleofector kit が有効との報告があるが、当施設では持ち合わせていない。溶血性連鎖球菌 A、C および G 群によって産生されるスルフヒドリル活性化毒素であるストレプトリジン 0 を用いた形質細胞への siRNA 導入の報告がされた (J Immunol Methods. 2008 Apr 20; 333(1-2): 147)。しかしながらこの試薬は毒物であるため当施設では使用出来なかった。形質細胞は抗体を大量に産生できるタンパク質工場のように分化した細胞であり、タンパク質の品質管理が厳密に行われている。その為、細胞外からの刺激に対しては敏感に反応がおこり、細胞傷害がより強く出ている可能性がある。

近年、ウイルスベクターを利用した in vivo で microRNA を myeloma cell へ遺伝子移入するマウスモデルが報告された。しかし myeloma(形質細胞)特異的に遺伝子移入されるのではないため、実臨床への応用はまだ未知数である。

4. 研究成果

形質細胞が産生する抗ドナー抗体が抗体関連型拒絶反応を引き起こしているが、この形質細胞に対して直接作用するボルテゾミブは特異的でなく全ての形質細胞に対して作用してしまう。DSA などの疾患特異的抗体はそれぞれに相補性決定領域(CDR; complementary determining region)を有しており、その部分に他の抗体と異なる得意性を有している。今回、CDRs をターゲットにした RNA 干渉による抗体産生抑制が可能か検討を行なった。ヒト抗 A 抗体産生株 HB8534 を用いて実験では抗 A 抗体に対する CDRs の siRNA は抗体産生に一定の抑制効果が認められ、CDRs の RNA 干渉が治療戦略として可能である事が示された。次に形質細胞への遺伝子導入についてさまざまな市販の試薬を用いて検討したが、形質細胞への障害が強く起こり、安定的に遺伝子導入できる試薬を入手することは困難であった。形質細胞は他からの遺伝子導入試薬に対する反応が鋭敏であり、この問題をいかに克服するか、ドラッグデリバリーのさらなる研究が重要である。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。