

平成 31 年 5 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08938

研究課題名(和文) 遺伝子導入細胞を用いた新たな血小板抗体検査法の開発

研究課題名(英文) Development of a new method for platelet antibody testing using transfected cell line

研究代表者

松橋 美佳 (Matsubishi, Mika)

東京大学・医学部附属病院・客員研究員

研究者番号：00759384

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)：ヒト血小板特異抗原(human platelet antigen; HPA)に対する同種抗体は、新生児血小板減少症や血小板輸血時の副作用である血小板輸血不応の発症に関与し、時に脳内出血といった重篤な合併症をおこすため原因抗体の同定が必須である。

本研究では、レトロウイルス発現系を用いてヒト白血病細胞株にHPA抗原を強制発現させたHPA遺伝子導入細胞を樹立した。樹立したHPA遺伝子導入細胞を用いて複数の抗HPA抗体検査法の条件設定について検討し、その有用性を確認した。

本研究で樹立したHPA遺伝子導入細胞は、抗HPA抗体検出において検査法の有用なツールとなることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、複数の抗HPA抗体検出法が存在するが、何れの方法も末梢血より血小板を採取する必要がある。また、発現するHPA抗原の種類は、個人で異なるため検査毎に特異性既知の血小板を数名のドナーから採取する必要がある。さらに、被検血清中の抗A、抗B抗体や抗HLA抗体により、目的とする抗HPA抗体検出が困難となる場合がある。上記問題を解決するには、特定のHPA抗原のみを強制発現する不死化細胞を検査に用いることが望ましい。本研究において樹立したHPA抗原を強制発現した遺伝子導入細胞は、抗体検出法においていつでも利用可能な標準細胞になり、世界的にも多くの研究者がその検出に苦慮している現状において有用である。

研究成果の概要(英文)：Alloantibodies directed against human platelet antigen (HPA) are involved in the pathogenesis of immune-mediated thrombocytopenia, including neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) and platelet transfusion refractoriness (PTR). Therefore, for the diagnosis of these conditions, the detection of the causative alloantibody is crucial.

In this study, we aimed to establish HPA-transfected cell lines using retroviral vectors. We evaluated the effectiveness of the obtained HPA-transfected cells for the detection of the HPA antibodies, using different HPA alloantibody testing systems.

We confirmed that the established transfected cell lines can be applied as a valuable tool for the detection of HPA alloantibodies.

研究分野：輸血医学

キーワード：HPA抗原 抗HPA抗体 遺伝子導入細胞

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

1. 研究開始当初の背景

血小板表面には、血液型 ABO 抗原や HLA(human leukocyte antigen)抗原などの主要抗原の他、ヒト血小板特異抗原(HPA)が存在する。HPA は、現在までに 28 種類が確認されているが(Curtis B. Vox Sanguinis 2014; 106(2): 93-102)、HPA 型不適合の妊娠や輸血・移植などにより HPA に対する同種抗体(抗 HPA 抗体)が産生されることがある(Peterson JA et al. Br J Haematology 2013; 161(1): 3-14)。新生児血小板減少症(NAIT)は、新生児溶血性疾患と同様の機序で発症する。母親の持たない父親由来の HPA 抗原に感作され、産生された同種抗体が胎盤を通過し、胎児血小板を破壊する結果、胎児または新生児の血小板減少症が生じる病態であり、NAIT の重症例では胎児・新生児の脳内出血による神経学的な後遺症や死亡の原因となる。また、血小板輸血不応(PTR)は、HPA 型不適合の血小板輸血により産生された抗 HPA 抗体が原因で期待する血小板数の増加が得られない病態であるが、白血病治療のための化学療法中に PTR が発症すると、出血リスクが高まり、患者の生命を脅かすことがある。これらの病態を正確に診断するためには、原因抗体の同定が必須である。

抗 HPA 抗体検出法としては、MAIPA(monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen)法、MPHA(mixed passive hemagglutination)法、PIFT(platelet immuno-fluorescence test)法など複数の方法が報告されているが、我々の検討では、何れも単一の方法としては、すべての HPA 型に対する抗体を検出・同定するための十分な感度、特異度を有していないことが判明している(Matsuhashi M et al. Vox Sanguinis 2010; 99(supl.1): 387)。近年、サイトカイン検出や遺伝子タイピングなど様々な分野で用いられている xMAP テクノロジーでは、専用のマイクロビーズにそれぞれ 2 種類の蛍光色素を各 10 段階ずつ混合することで、合計 100 種類の識別可能な蛍光ビーズが作製可能である。特定のターゲット分子を検出するときは、まずマイクロビーズに標識された特異的に反応するプローブとターゲット分子を結合させた後、フィコエリスリン (PE) で標識した 2 次抗体などをターゲット分子に結合させ、Luminex (flowcytometry)装置で反応済み検体を読み込む。Luminex 装置の検出部分では、PE の蛍光強度およびマイクロビーズの 2 種類の蛍光強度から割り当てられたビーズの番号を同時に識別できる。ビーズ 1 色あたり数百個のデータを測定し、その中央値のデータを解析に用いることにより、検出精度および正確性の向上が可能となる。

2. 研究の目的

ヒト血小板特異抗原(human platelet antigen, HPA)に対する同種抗体は、新生児血小板減少症(neonatal alloimmune thrombocytopenia, NAIT)や血小板輸血時の副作用である血小板輸血不応(platelet transfusion refractoriness, PTR)など重篤な臨床像を呈する病態の原因となることが報告されている。抗 HPA 抗体検出法として複数の方法が提唱されているが、現状では、単独で全ての抗原系に適用可能な汎用性と確実性を兼ね備えた検出方法は存在しない。本研究では、レトロウイルス発現系を用いて、白血病細胞株に HPA 抗原を強制発現させた遺伝子導入細胞を作製し、xMAP(Multiple Analyte Profiling)テクノロジーと組み合わせることにより簡便・迅速かつ感度・特異度に優れた汎用性の高い抗 HPA 抗体検出法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 遺伝子導入に使用する細胞株の選択、遺伝子導入ベクター作製

flowcytometry 法により、正常ヒト血清と数種の白血病細胞(マウスまたはヒト)との反応性を確認し、非特異反応の低い細胞株を親株として選択するとともに、抗体検出に影響を及ぼす可能性のある ABO 抗原や HLA 抗原などが発現していない細胞を選択した。選択した細胞株候補については、レトロウイルス感染細胞の選別に用いるピューロマイシンによる薬剤感受性試験をおこない、その濃度と期間について検討した。目的の HPA 抗原を保有する市販ヒト組織や血液由来の RNA を template に PCR クローニング後、遺伝子配列の翻訳領域全長を含む cDNA のクローニングをおこなった。得られた cDNA を pcDNA3.1 にクローニングの上、一過性の強制発現系とウェスタンブロッティングを組み合わせて蛋白レベルでの正常な発現を確認後、cDNA はレトロウイルスパッケージング用ベクター-pMys-IRES-Puro に移し替えた。

2) HPA 遺伝子導入細胞作製

上記の HPA 発現レトロウイルスベクターを、PLAT-A 細胞(パッケージング細胞)に導入し、レトロウイルスを作製した。この遺伝子導入用組換えウイルスを 1)で選択した細胞に感染させ、組換えウイルス感染細胞とした。この感染細胞からピューロマイシンを用いた限界希釈法により HPA 発現の高いクローンを選択した。目的とする遺伝子の発現について特異モノクローナル抗体を用いた flowcytometry 法により確認した。

3) HPA 遺伝子導入細胞を用いた抗 HPA 抗体検出法の条件設定

HPA 遺伝子導入細胞を用いて既存の抗 HPA 抗体検出法(MPHA 法、flowcytometry 法、MAIPA 法)について細胞数、血清感作量、反応時間に関して詳細な条件を検討した。検出条件の最適化をおこなった後、上記方法について比較検討をおこなった。

4) xMAP テクノロジー(マイクロビーズ法)を用いた抗 HPA 抗体検出法の検討

3% サッカロース加生理食塩液を用いて HPA 遺伝子導入細胞から HPA 抽出抗原を採取し、Centricut Ultrafiltration filter を用いて適切な濃度に濃縮した。activation buffer、

sulfo-NHS(N-hydroxysulfosuccinimide), EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)を用いて活性化したビーズに特異モノクローナル抗体を結合し、結合量を確認後、HPA 抽出抗原を結合し、「マイクロビーズ - 特異モノクローナル抗体 - HPA 抽出抗原」から成るトリプレットを形成した。上記の調整したトリプレット(調整済マイクロビーズ)と抗体特異性既知血清を反応させた後、二次抗体を反応させ、Luminex 装置により測定した。

4. 研究成果

1) HPA 遺伝子導入細胞株の樹立

ヒト正常血清との反応性から非特異反応の低いパネル細胞株 K562(ヒト白血病細胞株)を親株として選択した。目的の HPA 抗原を保有する市販ヒト組織や血液由来の RNA を template に PCR クローニングした。遺伝子配列の翻訳領域全長を含む cDNA のクローニングをおこない、得られた cDNA を pcDNA3.1 にクローニングの上、一過性の強制発現系とウェスタンブロッティングを組み合わせて蛋白レベルでの正常な発現を確認した。cDNA はレトロウィルスパッケージング用ベクターに移し替え後、作製された遺伝子導入用組換えウィルスをヒト白血病細胞に感染させ、HPA 発現の高いクローンを選択した。目的とする HPA 抗原の発現について特異モノクローナル抗体を用いた flowcytometry 法により確認し、臨床上、重要な意義を持つ HPA-1、HPA-3、HPA-4、HPA-5、HPA-6、HPA-15、CD36 遺伝子導入細胞を樹立することができた。

2) HPA 遺伝子導入細胞を用いた抗 HPA 抗体検出法の条件設定

上記の HPA 遺伝子導入細胞を用いて、MPHA 法、flowcytometry 法、MAIPA 法の 3 法について細胞数、血清感作量、反応時間を検討したが、MPHA 法では、細胞数の条件が決定することができず、抗体を検出することは困難であった。また、flowcytometry 法では、抗体検出が可能であったものの、血清の種類により反応条件が一定しなかった。一方、MAIPA 法では血清の種類によらず一定した条件で抗体を検出することができ、細胞数 1×10^5 個に血清 50ul を反応させた場合に高い反応性を示した。また、反応時間が長い程、検出感度が高くなる一方で非特異反応がみられた。

3) HPA 遺伝子導入細胞の有用性確認

2) で設定した最適条件下で、MAIPA 法にて血小板及び HPA 遺伝子導入細胞と血清との反応性について比較した結果、血小板を用いて検査した場合より HPA 遺伝子導入細胞を用いたときにほとんどの血清において高い反応性を示し、検査に十分な HPA 抗原が発現していることが示された。

4) xMAP テクノロジー(マイクロビーズ法)を用いた抗 HPA 抗体検出法の検討

HPA 遺伝子導入細胞から抽出した HPA 抽出抗原を用いて xMAP テクノロジー(マイクロビーズ法)により Luminex 装置にて抗体検査を実施した結果、一部の抗体は検出可能であった一方で、検出することができない抗体も多数存在した。この原因については解明できていないが、HPA 遺伝子導入細胞から HPA 抗原が適切に抽出されていないことや、xMAP テクノロジーによる検出条件が最適でないことが考えられ、詳細な条件設定を再度進めている。

以上のように、本研究で樹立した HPA 遺伝子導入細胞は、抗 HPA 抗体検出において検査法の有用なツールとなることが示された。今後、xMAP テクノロジーによる検出条件を最適化し、簡便な検査法の導入について検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 9 件)

(1) Matsuhashi M, Tsuno HN, Morita S, Inoue S, Nagao N, Takahashi Okazaki H, Shibata Y: Neonatal alloimmune thrombocytopenia in Japan, XIV European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology, Stockholm, 2016 年 5 月

(2) 松橋 美佳, 抗血小板抗体検査の意義 ~ 最近の知見 ~, 第 33 回日本臨床化学会関東支部例会, 埼玉, 2016 年 11 月

(3) Matsuhashi M, Tsuno HN, Akamatsu N, Kaneko J, Tamura S, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N, Santoso S, Okazaki H, Anti-HPA-4b antibody in live-donor liver transplantation, 27th Regional Congress of the ISBT, Meeting of Platelet Immunology Working Party, Copenhagen, 2017 年 6 月

(4) Matsuhashi M, Tsuno HN, Akamatsu N, Kaneko J, Tamura S, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N, Santoso S, Okazaki H, Clinical case reports and laboratory investigation, 28th Regional Congress of the ISBT, Meeting of Platelet Immunology Working Party, Guangzhou, 2017 年 11 月

(5) 松橋 美佳, NAIT 検査の流れ, H30 年度日本血小板・顆粒球型ワークショップ研修会, 東京, 2018 年 3 月

(6) 新田 祥子、松橋 美佳、中村 潤子、川端 みちる、松下 誠, MAIPA 法を用いた抗 HPA 抗体検出条件に関する検討, 第 58 回日本臨床化学会年次学術集会, 名古屋, 2019 年 8 月

(7) 松橋 美佳, 新生児血小板減少症が疑われた時の検査と対応, H31 年度日本血小板・顆粒球型ワークショップ研修会, 名古屋, 2019 年 1 月

(8) Matsuhashi M, Tsuno HN, Issues of Anti-HPA-3 Antibody Detection, The Training Course on Platelet Immunobiology(Asia regional), Tokyo, 2019 年 3 月

(9) Matsuhashi M, Tsuno HN, Results of the Training Course on Platelet Immunobiology, The Training Course on Platelet Immunobiology(Asia regional), Tokyo, 2019 年 3 月

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：岡崎 仁

ローマ字氏名：OKAZAKI, Hitoshi

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：教授

研究者番号(8桁)：80261973

研究分担者氏名：池田 敏之

ローマ字氏名：IKEDA, Toshiyuki

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：助手

研究者番号(8桁)：80322759

研究分担者氏名：正本 庸介

ローマ字氏名：MASAMOTO, Yosuke

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 30706974

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。