

令和元年5月8日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10416

研究課題名(和文) ヒト血管移植片に対する抗ドナー抗体の病的意義と免疫抑制性細胞による治療効果の検討

研究課題名(英文) The role of anti-donor HLA antibodies and the its treatment in organ transplantation

研究代表者

後藤 了一 (Goto, Ryoichi)

北海道大学・大学病院・特任助教

研究者番号：10645287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は免疫不全マウスにヒト組織を移植するヒト化マウスを通じ、抗ドナーHLA抗体(DSA)の役割と治療法を探索することであった。ヒト化マウス作成のためヒト血管と皮膚を移植したが、自然免疫反応により障害された。DSAは肝移植後症例から採取し、Luminex法で測定、血清を保存した。この臨床データから、DSA力価と線維化との関連、抗体価高値と高齢ドナーによる肝グRAFT線維化進行の関与を示した。また治療法としてBリンパ球除去が線維化進行を抑制する可能性を示した。今後自然免疫の関与が少ないマウスに変更し、ヒト化マウス移植モデルにDSAを投与し病理学的機序解析を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床検体を用いたヒト化マウスモデルの可能性を探索し、免疫不全マウスの種類によって自然免疫の関与により作成が困難であったが、この知見はヒト化マウスの学術的意義として重要であった。一方、大腸癌患者の腸管膜動脈やヒト皮膚移植片の余剰組織を用いるヒト化マウス研究は、高次動物や臨床でないと検討しえないヒト化抗体やヒト細胞治療などの臨床前研究として有用なツールとなる。特にマウスのMHC-class II抗原の発現はヒトと異なり、抗体研究でのヒト化マウス移植モデルは貴重である。本研究で明らかになった抗ドナーHLA抗体の臨床的意義は、臨床にリアルタイムで反映しえる重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：In this study our aim is to clarify the role of anti-donor HLA antibody (DSA) and find its effective treatment in organ transplantation. To establish the humanized mouse model, we obtained a human vessel or skin from the patient who underwent a colectomy or skin transplantation and transplanted them to severe immunodeficient mice. However, we could not overcome an arterial thrombosis and tissue injuries after transplantation due to innate immune responses in immunodeficient mice. Therefore, we decided to change the immunodeficient mice to another one. Also, we collected the serum samples including DSAs from the liver transplant recipients. We identified the correlation between the mean fluorescence intensities (MFI) of the DSA and graft fibrosis in the recipients who had been transplanted the liver graft from elderly donors. Thus, we identified the clinical impact of DSA in liver transplantation, however, the underlying mechanism warrant further study by using humanized mouse model.

研究分野：移植免疫

キーワード：ヒト化マウス 抗HLA抗体 移植

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

1. 研究開始当初の背景

臓器移植では長期経過後グラフト不全となる症例があり、その主原因とされる慢性拒絶反応について、抗HLA抗体の関与が注目されている。しかし、慢性拒絶反応の主病変である血管病変と抗ドナーHLA抗体(DSA)の病的意義、治療法は確立していない。

2. 研究の目的

肝移植患者の移植後に産生される抗体、いわゆる de novo 抗HLA抗体(大部分がClass II(DQまたはDR)に対する抗体)を採取し、ヒト化マウス血管移植モデルに投与することで、ヒト血管に作用するHLA-class II抗体の病的意義、血管傷害の機序を解明する。またこの治療法として、細胞治療である免疫抑制性細胞、アナージー細胞の治療効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト化マウス血管移植モデルの作成; 消化管手術患者に同意を得た上で手術検体から適切なサイズ(直径約1mm)の腸管膜動脈採取し、臓器保存液(UW液)で冷保存し、これを免疫不全マウスである NOD.Cg-Prkdc^{scid}/l2rg^{tm1Wj}/SzJ (NSG)マウスに移植する。モデル作成の可否は術後42日目の病理組織学的検査での血管内膜肥厚で判定する。

(2) 抗HLA抗体の採取; 当院でフォロー中の肝移植患者のうち de novo HLA抗体が発現した症例に同意を得た上で血清を採取し、抗HLA class II抗体量を Labscreen single antigen testにて測定する。これをヒト化マウス血管移植モデルに投与した時の血管病変の有無を調べる。

(3) 免疫抑制性細胞の作成 当院の臨床研究で用いた免疫抑制性細胞である抗CD80、抗CD86抗体の存在下にドナー細胞と共に共培養して得られるアナージー細胞を作成する。

4. 研究成果

(1) ヒト化マウスの作成 ヒト組織(血管、皮膚)移植モデル. NSGマウスをジャクソン研究所より購入、我々の研究室で繁殖させた。また消化管手術患者からの組織採取とヒト化マウスへの移植研究について北海道大学病院のIRBを取得し、手術検体の直動脈よりヒト血管を採取した。これをNSGマウスの腹部大動脈に間置グラフトとして顕微鏡下に血管吻合移植した。NSGマウス26匹に対し、大腸癌手術5症例のヒト血管を移植し、温阻血時間、冷阻血時間は中央値で32分(24-50分) 344.5分(120-1260分)であった。手術の完遂率は88%と良好であり、移植し得たマウスはいずれも生存したが、42日目の組織採取でいずれも血管閉塞した状態であることが確認された。NSGマウスは免疫不全マウスの中でも自然免疫の反応が強く、Gr1抗体を用いた異種反応の抑制が必要との報告がある[1]。そこで、我々の血管移植後血管閉塞の原因が、自然免疫による炎症反応によるのか、移植手技の問題であるのかを判断するために、手技的により簡便で確立されているヒト皮膚移植モデルを用いて検討した。ヒト皮膚を用いたヒト化マウス移植モデルのメリットとしては、一度に多数のマウスへの移植が可能で、冷阻血時間による影響も少なくできる。我々はIRBの再承認と患者への説明・同意を得た上で、形成外科にて皮膚移植の際に大腿からデルマトームで採取したヒト皮膚の余剰部分を採取し、これによる皮膚移植モデルを作成した(n=8)。結果血管移植と同様にNSGマウスの自然免疫による反応でヒト皮膚移植片が廃絶した。このことからNSGマウスへのヒト組織片の移植はマウスが引き起こす自然免疫由来の炎症反応の結果、モデルの確立が困難であると判断した。そのため研究代表者が留学中にヒト化マウス血管移植モデルの作成に使用し、血管移植の成功が確認できているBALB/c IL2Rgamma^{-/-} Rag^{-/-} (BRG)マウスに変更することとし、このマウスを購入、繁殖させた。BRGマウスは繁殖後にまずマウス間での移植を検討し、C57BL6をドナーとした心移植を実施した(n=3)。拒絶反応無く全例生着し、興味深いことに心グラフト内のpassenger細胞が免疫不全マウスに生着し、マウス末梢血でT細胞の存在が確認された。即ち少量のリンパ球も移入可能な実験ツールとしての有用性が示唆されたことは予想外の結果であった。

ヒト化マウスへの免疫細胞の構築慢性拒絶反応を惹起しうるヒト免疫細胞のNSGマウスへの移入を確認した。ヒトPBMC 5×10^6 個のNSGマウス腹腔内投与では十分な再構築が得られず、 10×10^6 個で約10%程度の再構築であった(図1)。そこで放射線照射によるpreconditioningがヒト免疫担当細胞の再構築に優位であるとの報告[1]から事前にマウスに2Gyの照射をした後、healthy volunteerのヒトPBMCを腹腔内に輸注した。ヒトPBMC 2.5×10^6 個の投与で約40%近くのヒトCD45陽性リンパ球が2週間後のマウス末梢血で確認できた(図1)。また 2.5×10^6 個のヒトPBMC投与後のNSGマウスに再構築されるリンパ球はほとんどがCD3陽性T細胞であったが、一部にB細胞の移入も確認でき、ヒト化マウスによる抗体関連の免疫反応の関与についても検討し得ることを確認した(図2左側)。一方で、肝移植後の患者で de novo 抗体を産生する症例の免疫細胞

図1. ヒトCD45陽性細胞再構築率 Day14

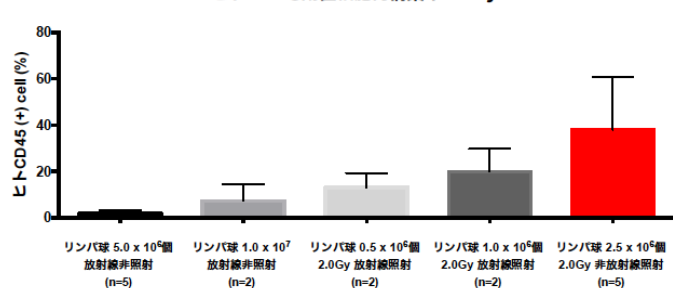
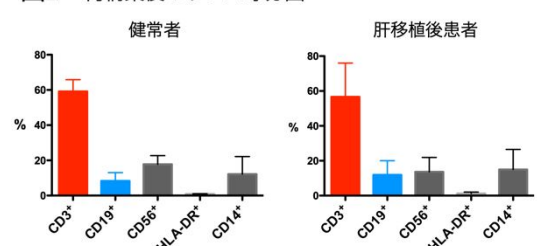


図2 再構築後のリンパ球分画



胞もヒト化マウスに構築可能か検討した。肝移植後の症例は免疫抑制剤を内服していることから、ヒト化マウスへの免疫構築の可否については不明であったが、我々は免疫抑制剤内服中の症例においてもヒト CD3 陽性細胞、ヒト CD19 陽性細胞が同程度構築できることを確認した(図 2 右側)。

(2) 抗 HLA 抗体の採取 当院の IRB での承認と十分な説明・同意の元、肝移植後の de novo HLA class II 抗体陽性 14 例から延べ 28 回の研究計画通りの抗体量を採取し、-80 度に保存した。

抗体価(抗ドナー抗体(DSA)の MFI 値)は Labscreen single antigen test で測定した。この DSA-MFI 値のデータを用い、臨床的特徴-特に肝グラフト線維化に關与する DSA の特徴-を検討した。肝グラフトの線維化進行は DSA-MFI 高値症例にのみ確認されたが、DSA-MFI が高値で、グラフト年齢(ドナー年齢)が高齢の場合にグラフト線維化が進行する傾向があった。また de novo DSA 陽性症例のうち、グラフト線維化進行(線維化スコア F2 以上)と非進行の 2 群に分けて群間比較するとドナー年齢、グラフト年齢で有意な違いが観察された(図 3)。この興味深い知見について第 54 回日本移植学会などで報告した。また移植後に出現する抗体はほぼ全例 HLA class II に対する抗体であることから、HLA class I に対する検討は困難な状況であったが、移植前のリンパ球クロスマッチ陽性症例の保存血清(12 例)の使用について当院 IRB の承認と患者の説明同意が得られ、Labscreen 検査を実施したところ、HLA-class I に対する高力価の抗体を含む血清が得られた。さらに 12 例のうち 5 例は DSA-MFI が 2 万を越える高力価であり、これらは移植後早期にグラフト不全で死亡した予後不良な症例であった。このことから臨床的にも高力価の HLA-class I 抗体による直接的なグラフト障害の可能性が示唆された(図 4)。抗 HLA 抗体の臨床的な意義についてはいくつかの新しい知見を提供できたが、病理学的機序については未だ不明であり、今回の研究で得られたこれらの保存抗体をヒト化マウスに投与し、in vivo における抗体の基礎的研究を進展させる。

(3) 免疫抑制性アナージー細胞の作成。

本研究では抗体関連のグラフト障害がヒト化マウスにおいて観察された場合、これに対し細胞治療の可能性について検討する予定であった。細胞治療については当院の生体肝移植後にドナー特異的抑制細胞(アナージー細胞)を用いた免疫寛容誘導プロトコルを用いて 10 例中 7 例に免疫抑制剤の中止が可能になるという画期的な治療法を 2016 年に報告した[2]。この細胞治療後の免疫抑制剤中止可能症例においても線維化の進行はみられないが、DSA 陽性症例が 1 例確認された。またこの細胞治療を進展させるべく多施設共同研究を計画したが、再生医療法の制定により、想定症例数の計画実施は困難となった。1 例のみを多施設共同研究として、我々から長崎大学に赴いて共にドナー細胞とレシピエント細胞を抗 CD80・CD86 抗体の存在下に共培養し、作成した免疫抑制性のアナージー細胞を生体肝移植後の患者に投与した。当院主導でのアナージー細胞の作成が可能であることが確認でき、ヒト化マウスモデルにおいて抗体の組織障害が観察されれば免疫抑制性のアナージー細胞による治療効果を検討しえる。

<引用文献>

1. Kenney, L.L., et al., *Humanized Mouse Models for Transplant Immunology*. Am J Transplant, 2016. 16(2): p. 389-97.
2. Todo, S., et al., *A Pilot Study of Operational Tolerance with a Regulatory T Cell-Based Cell Therapy in Living Donor Liver Transplantation*. Hepatology, 2016.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Todo S, Yamashita K, Goto R, Zaitzu M, Nagatsu A, Oura T, Watanabe M, Aoyagi T, Suzuki T, Shimamura T, Kamiyama T, Sato N, Sugita J, Hatanaka K, Bashuda H, Habu S, Demetris JA, Okumura K. A Pilot Study of Operational Tolerance with a Regulatory T Cell-Based Cell Therapy in Living Donor Liver Transplantation. *Hepatology*. 2016; 64(2)632-643. 査読有

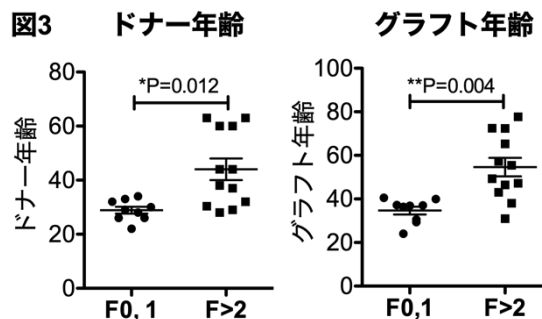
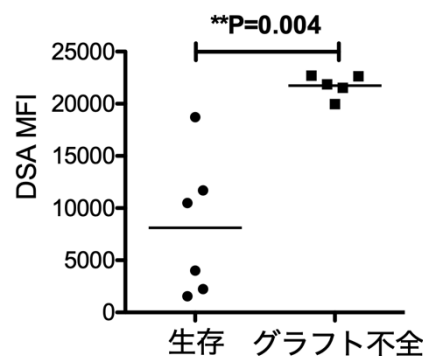


図4 肝移植前リンパ球
クロスマッチ陽性症例



〔学会発表〕(計8件)

後藤了一、川村典生、渡辺正明、腰塚靖之、太田 稔、武富紹信、嶋村 剛
生体肝移植後 de novo ドナー特異的 HLA 抗体に対する免疫抑制強化療法の効果
第 36 回 日本肝移植研究会
2018 年

後藤了一、川村典生、渡辺正明、財津雅昭、嶋村 剛、武富紹信
De novo ドナー特異的 HLA 抗体陽性の生体肝グラフト線維化進行症例の特徴
第 54 回 日本移植学会
2018 年

Goto R, Zaitu M, Kawamura N, Watanabe M, Kamiyama T, Shimamura T, Taketomi A.
The impact of preformed donor-specific antibodies in living donor liver
transplantation depending on graft volume.
The 12th Japan Korea Transplantation Forum 2018. Tokyo, 2018.
2018 年

Goto R, Zaitu M, Nagatsu A, Emoto S, Fukasaku Y, Ganchiku Y, Watanabe M, Oura T,
Ota M, Suzuki T, Shimamura T, Todo S, Yamashita K
The immune monitoring for operationally tolerant recipients following a regulatory
T cell-based cell therapy.
The Transplant Society 2018.
2018 年

後藤了一、腰塚靖之、川村典生、渡辺正明、太田稔、山下健一郎、武富紹信、嶋村 剛
肝移植における移植前抗ドナー抗体陽性の臨床的意義
第 53 回日本移植学会
2017 年

Goto R, Koshizuka Y, Kawamura N, Zaitu M, Ota M, Kamiyama T, Yamashita K, Taketomi
A, Shimamura T.
The impact of preformed donor-specific antibodies in short-term graft survival of
adult living donor liver transplantation.
Asian Transplantation Week 2016.
2016 年

Goto R, Koshizuka Y, Kawamura N, Zaitu M, Ota M, Yamashita K, Taketomi A, Shimamura
T.
The impact of preformed donor-specific antibodies in living donor liver
transplantation depending on graft volume.
The Transplant Society annual meeting 2016.
2016 年

後藤了一、腰塚靖之、川村典生、渡辺正明、太田稔、山下健一郎、武富紹信、嶋村 剛
肝移植の組織適合検査 HLA タイピングとリンパ球クロスマッチ
第 52 回日本移植学会
2016 年

〔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〕

北海道大学病院消化器外科 ホームページ

<http://www.surg1-hokudai.jp/research/group/exp/details/1010.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者 無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：深作 慶友

ローマ字氏名：Fukasaku Yasutomo

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。

