

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08584

研究課題名(和文)ドナー特異的抗体(DSA)制御に向けたHLA産生B細胞への多角的アプローチ

研究課題名(英文)A multifaceted approach to HLA antibody-producing B cells for donor-specific antibody (DSA) regulation

研究代表者

野田 貴幸(NODA, Takayuki)

愛知医科大学・その他部局等・薬剤師

研究者番号：50817088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では慢性拒絶反応の早期診断を可能とする移植後のドナー特異的抗HLA(DSA)抗体モニタリング法の確立を目的としている。培養系での抗体検出は、血清中より明瞭であり、血清中よりも早期診断には有利である患者の存在が明らかになった。また、体内でのDSA産生B細胞の解析を目的としたHLA抗体産生ヒト化マウスモデルの作製に着手した。しかし、抗体産生が安定性に欠けるためモデルマウスは未だ確立できていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植における拒絶反応は、主にT細胞が関連する細胞性の拒絶反応と、B細胞が関連する抗体関連型拒絶反応(Antibody-Mediated Rejection: ABMR)の二つが存在する。免疫抑制剤の進歩により細胞性拒絶反応の制御がほぼ可能となった現在、ABMRの克服が臨床的に重要な課題となっている。中でもde novoのドナー特異的抗HLA抗体(Donor Specific HLA Antibody: DSA)産生を引き金とする慢性抗体関連型拒絶反応(Chronic ABMR: CAMR)に対する有効な予防法・治療法は確立されていない。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish a method for monitoring donor-specific anti-HLA (DSA) antibodies after transplantation that enables early diagnosis of chronic rejection. Detection of antibodies in the culture system was clearer than in serum. This method was found to be more advantageous for early diagnosis in some patients than in serum. We started to create a humanized mouse model of HLA antibody production to analyze DSA-producing B cells in the human body. However, model mice have yet to be established due to the lack of stability in antibody production.

研究分野：移植免疫

キーワード：臓器移植 DSA ヒト化マウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腎移植後の生着率は、移植された年代により大きく異なっているが、その背景には移植免疫抑制療法の進歩がある。日本移植学会の臓器移植ファクトブック 2020 によると、生体腎移植成績は、1982 年までは 1 年生着率 74.1 %、5 年 54.9 %、1983~1991 年の 1 年生着率 91.7 %、5 年 75.2 %が 1992~2001 年には 1 年生着率 94.4 %、5 年 83.4 %と飛躍的に向上している。

現在の標準的免疫抑制療法が導入された 2000 年以降の成績はさらに改善し、2010~2018 年には 1 年生着率 96.6 %、5 年 87.8 %までになっており、これは短・中期の腎移植成績向上には強力な免疫抑制療法による拒絶反応抑制が最も有効であることを示している。

生着率の妨げとなる拒絶反応は、大きく分けると T 細胞関連型拒絶 (T cell-mediated rejection: TCMR) と抗体関連型拒絶 (Antibody-mediated rejection: ABMR) の二つがあり、免疫抑制剤の進歩により TCMR の制御がほぼ可能となった。現在、ABMR の克服が臨床的に重要な課題として挙げられる。

ABMR とはレシピエントが持っているドナー抗原に対する抗体 (donor-specific antibody: DSA) がグラフトに結合することによって引き起こされる液性免疫反応である。

### 2. 研究の目的

B 細胞が関連する ABMR、中でも *de novo* のドナー特異的抗 HLA 抗体 (Donor Specific HLA Antibody: DSA) 産生を引き金とする慢性抗体関連型拒絶反応 (Chronic ABMR: CAMR) に対する有効な予防法・治療法は確立されていない。我々も、*de novo* DSA 患者や腎生検により拒絶反応を認めた患者に対し、B 細胞除去療法や、免疫抑制剤の増量・転換などを行ったが、その効果は限定的であった。その大きな理由に、DSA 産生 B 細胞が同定されておらず、DSA 産生 B 細胞を効果的に除去できたかどうかの指標が存在しないことが挙げられる。現段階では *de novo* DSA をなるべく早期に検出することが必要ではあるが、DSA は移植臓器へ沈着されるため、検出時には ABMR が既に進行していることが多い。

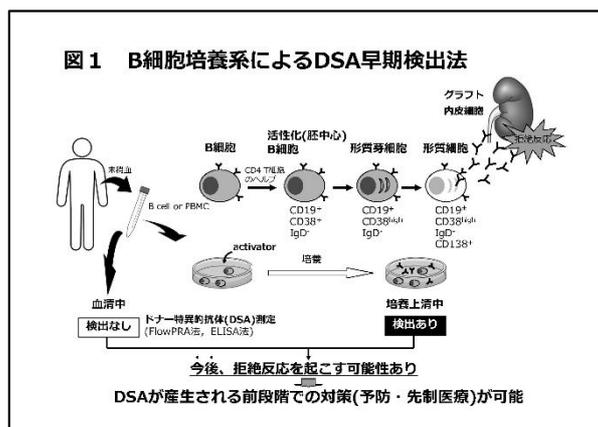
本研究では慢性拒絶反応の早期診断を可能とする移植後の DSA モニタリング法の確立と DSA 産生 B 細胞の同定・制御を目的として、i) 末梢血単核球からの DSA 早期検出 および ii) ヒト化マウスを用いて体内での DSA 産生 B 細胞の挙動解析 について多角的な検証を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 末梢血単核球 (PBMC) 培養系による DSA 早期検出法の確立

同意の得られた腎移植患者の末梢血から末梢血単核球 (PBMC) を分離し、刺激剤として IL-2、IL-10、IL-21 と R848 (TLR7/8 アゴニスト) を添加し培養した。3 日目に medium 交換を行い、最終的に 8 日間培養した (図 1)。

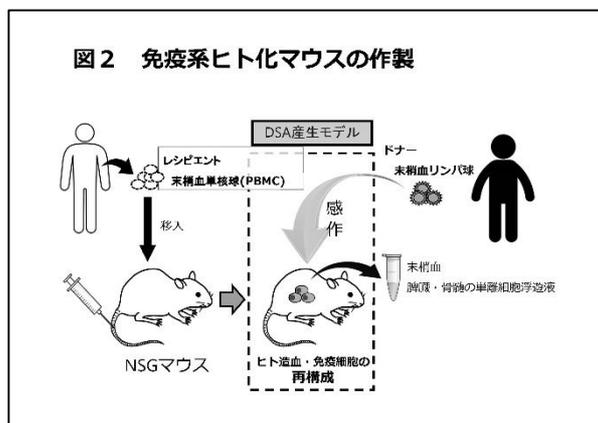
B 細胞の分化はフローサイトメトリーで確認し、培養上清中の IgM、IgG 濃度は ELISA 法で、HLA 抗体の特異性を FlowPRA と Luminex 法で測定した。



#### (2) HLA 抗体産生ヒト化マウスの作製

T, B, NK 細胞の欠失した重度免疫不全マウス (NSG) に、尾静脈内にレシピエント PBMC を移入した。経時的に末梢血を採取し、フローサイトメトリーにて、ヒト免疫担当細胞の生着を検討した。

このヒト化マウスに HLA 型の異なる健常人の末梢血リンパ球を免疫し、ヒト IgG 抗体産生を確認した (図 2)。さらに、このヒト化マウス血清を Luminex 法により HLA 抗体の定量化を行った。



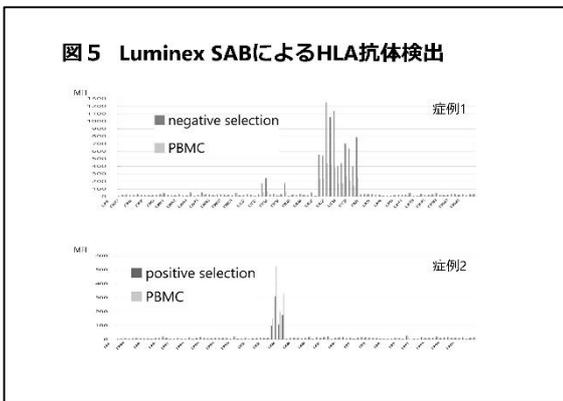
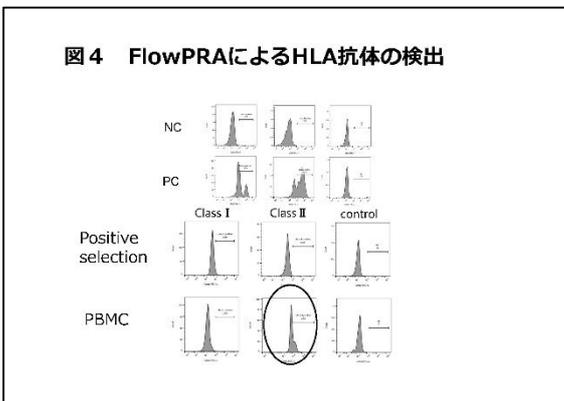
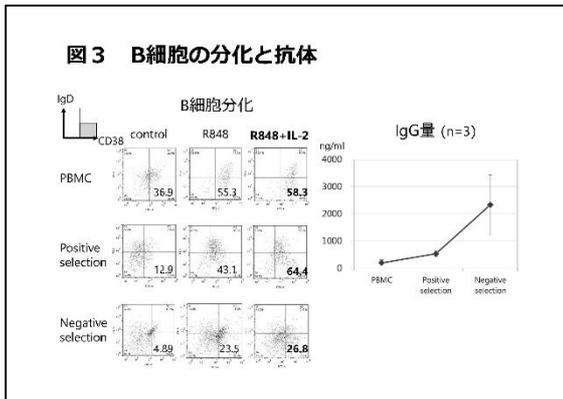
#### 4. 研究成果

##### (1) 末梢血単核球 (PBMC) 培養系による DSA 早期検出法の確立

当初、末梢血より B 細胞を単離し、B 細胞のみを形質細胞まで分化させるという方法により検討を行ってきた。しかし、細胞数の確保ができないことや抗体の検出率が低いなどの問題があった。そのため、末梢血より PBMC を取り出し、マイクロビーズを用いて、B 細胞を分離し、残りの PBMC に対し、放射線照射を行い、その後、再び単離した B 細胞と共に、培養を行った。また、B 細胞を分離せず、PBMC を培養する方法も検討した。

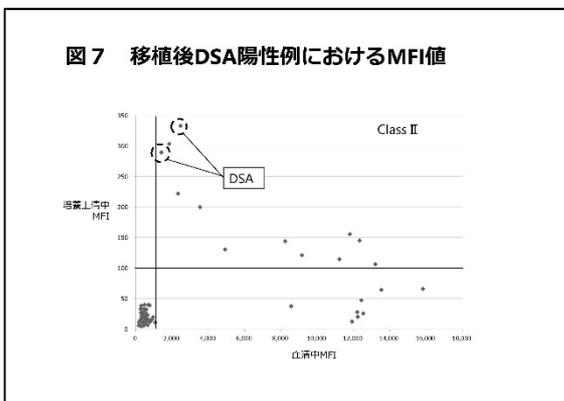
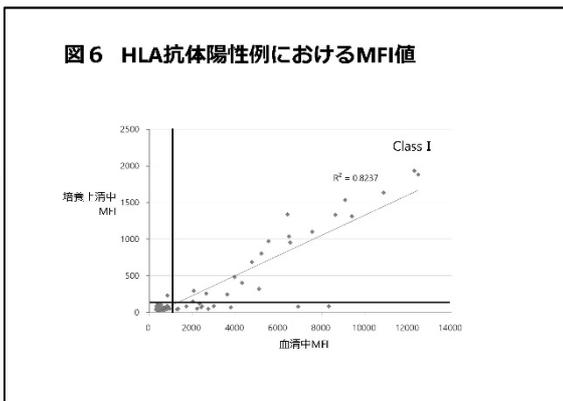
B 細胞の分化に関しては全ての方法で、R848 により CD38 が陽性化し、IL-2 で IgD が陰性化する様子が観察され、ELISA を用いた IgG 量は negative selection で最も多く、続いて positive selection、PBMC の順であった (図 3)。B 細胞の単離と PBMC を比べたところ、双方にほとんど大きな違いはなく、ELISA による IgG 量の結果とは相関しなかった。

これらの結果を基に、HLA 陽性患者の検体で検討を行った。HLA 抗体の存在を確認するために、FlowPRA を行い、さらにより検出感度のよい Luminex 法にて詳細な確認を行なった (図 4)。



血清中 HLA 抗体陽性例における培養上清中 HLA 抗体の検出をみたところ、Class I では 13 例中 7 例で、Class II においては 21 例中 7 例で検出された (図 5)。カットオフ値は血清で MFI 1000、培養上清の場合、MFI 100 とした。

妊娠で感作歴のある症例で検討した場合、血清中と培養上清中 MFI には相関がみられ、同一クローンの B 細胞からの形質細胞への分化、抗体産生であると推測された (図 6)。



しかし、移植後の DSA 陽性症例においては、先程とは違って相関がなかった。血清中 DSA が低値であったにもかかわらず、培養上清中に高値の DSA を認めました。これらは DSA の組織への沈着が疑われた (図 7)。

移植後の症例における DSA は、血清中より培養系で MFI 値が高いこともあり、血清中よりも早期診断には有利であることが示唆された。

(2) HLA 抗体産生ヒト化マウスの作製

DSA 産生 B 細胞の挙動とその表現型について検討するため、DSA 産生を実験動物に再現するヒト化マウスシステムの確立を試みた。まずは HLA 型の異なる健康人 PBMC をレシピエントとドナー細胞に見立てて検討を行った。

マウスにヒト細胞を移入することによる GVHD の発症が予想されたため、尾静脈よりヒト PBMC を移入し、7 日おきにマウス末梢血中のヒト CD3 陽性細胞を確認した。35 日目頃から著明に増え、その増殖は GVHD 発症との関連を認めた。一方、末梢血では CD19 陽性細胞は顕著な増加はみられなかった (図 8)。

また、GVHD 症状の観察項目として、体重減少と脱毛を確認すると、 $10^6$  個移入したマウスは 7 週目あたりから、徐々に体重減少がみられ、さらに目視でも脱毛が確認できるようになってきた。 $10^5$  個移入マウスの場合には、9 週目あたりから脱毛が確認されるようになった (図 9)。

レシピエント PBMC を移入してから、感作するまでの期間を変え、抗体産生を検討した。移入から 1 週間経過してから、感作を行った群を 1w 群、2 週間を 2w 群、4 週間を 4w 群、そして、ctr 群としてレシピエント細胞のみを移入した群を設定した。

ELISA によるヒト IgG 量は 2w 群で最も多く、続いて 1w 群、4w 群の順でした。抗体量は 2 回目の感作後から徐々に増えてくるのが分かった (図 10)。

図 8 マウスにおけるヒト細胞の生着

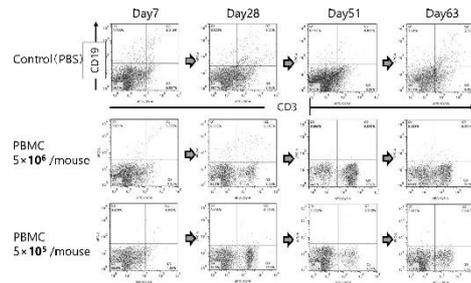


図 9 ヒトPBMC移入後の体重変化

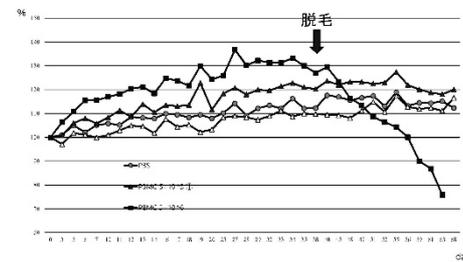
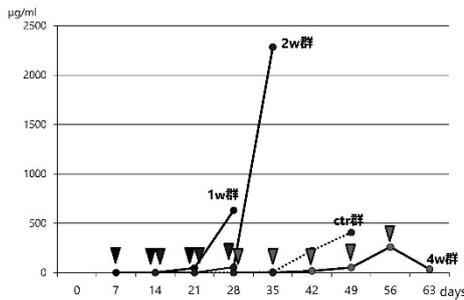


図10 ヒトIgG量



次に Luminex にて抗 HLA 抗体を確認した。1w 群、2w 群、ctr 群においては、いずれにおいても抗体は陰性であった。唯一、検出はされたのが 4w 群であるが一部の DSA が検出されたが、他のピークに比べ、MFI が低いものであり、いずれも、推定した DSA 以外の nonDSA が多く検出された。抗 HLA 抗体産生には、感作施行回数を増やすことが有効であると考えられた。

マウス体内でのヒト抗原提示細胞の減衰、免疫細胞の成熟に重要な役割を果たす微小環境はマウスに依存しているため、クラススイ

ッチが上手くいかないなどの報告もされている。このようなマウスの欠点を克服するため、現在、抗原提示細胞を含むヒト PBMC と抗原を事前に培養を行い、マウス内へ移入する方法に移行している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwasaki Kenta, Kitahata Nana, Hiramitsu Takahisa, Yamamoto Takayuki, Noda Takayuki, Okada Manabu, Narumi Shunji, Watarai Yoshihiko, Miwa Yuko, Uchida Kazuharu, Matsuoka Yutaka, Horimi Kosei, Kobayashi Takaaki	4. 巻 30
2. 論文標題 Increased CD40L+PD-1+ follicular helper T cells (Tfh) as a biomarker for predicting calcineurin inhibitor sensitivity against Tfh-mediated B-cell activation/antibody production after kidney transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 345 ~ 355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxy039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野田貴幸、岩崎研太、三輪祐子、小林孝彰
2. 発表標題 ヒト化マウスを用いたドナー特異的抗体(DSA)産生モデルの構築
3. 学会等名 第3回東海北陸HLA研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田貴幸、岩崎研太、三輪祐子、小林孝彰
2. 発表標題 ドナー特異的抗体(DSA)検出に向けたヒト化マウスの作製
3. 学会等名 第28回日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田貴幸、岩崎研太、三輪祐子、小林孝彰
2. 発表標題 ヒト化マウスを用いたドナー特異的抗体(DSA)産生モデルの樹立
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田貴幸、岩崎研太、三輪祐子、小林孝彰
2. 発表標題 ドナー特異的抗体(DSA)検出を目指したヒト化マウスの作製
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田貴幸、岩崎研太、三輪祐子、相原祐子、河野あゆみ、斎藤寛子、小林孝彰
2. 発表標題 DSA産生B細胞の機能解析に向けたin vitro培養系の確立とヒト化マウスの作製
3. 学会等名 第27回組織適合性学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野田貴幸、岩崎研太、三輪祐子、相原祐子、河野あゆみ、斎藤寛子、小林孝彰
2. 発表標題 DSA産生B細胞の機能解析のためのin vitro培養系とヒト化マウスの作製
3. 学会等名 第54回移植学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	小林 孝彰  (KOBAYASHI Takaaki)  (70314010)	愛知医科大学・医学部・教授    (33920)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩崎 研太  (IWASAKI kenta)  (10508881)	愛知医科大学・医学部・准教授    (33920)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関