

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08597

研究課題名(和文) ヒト化マウスによる抗ドナー特異的HLA抗体産生機序の解明と個別化治療への臨床応用

研究課題名(英文) Elucidation of anti-donor specific HLA antibody production mechanism using a humanized mouse model and clinical application for individualized treatment

研究代表者

田原 裕之 (TAHARA, HIROYUKI)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：30423354

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)：当研究の目的は、従来解析困難であったヒト免疫担当細胞の抗体関連型拒絶反応メカニズムをヒト化マウスモデルにより解明することである。HLA抗体産生促進シグナルを誘導するヒトCD40リガンドを高発現したマウス繊維芽細胞上でレシピエントおよびドナー末梢血単核球をin vitro混合培養しNSGマウスへ投与したところ、十分量のHLA抗体産生を高率に得られるHLA抗体産生ヒト化マウスの作製が可能になった。また、ドナー特異的HLA抗体のみ抑制されており、ヒトBAFF-BAFF受容体シグナル添加やレシピエント制御性T細胞除去に対しても同様に十分なHLA抗体産生を示すヒト化マウスモデルが構築された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植という医療は免疫抑制剤や治療法の進歩により術後早期の生存率/生着率が近年向上したが、長期生着例において慢性拒絶反応による移植片機能不全は長期成績が向上しない原因として位置づけされている。しかし慢性抗体関連型拒絶反応の原因や治療法は未だ解明されていない。従来解析困難であったヒト免疫担当細胞の抗体関連型拒絶反応メカニズムをヒト化マウスモデルにより解明し、慢性拒絶反応に対する個別化治療への臨床応用は大きな学術的意義をもたらすことが期待できる。本研究成果によって同種移植における慢性拒絶反応克服の可能性や抗ドナーHLA抗体陽性レシピエントに対する移植適応の拡大が大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the antibody-related rejection mechanism of human immunocompetent cells, which was difficult to analyze in the past, by using a humanized mouse model. When recipient and donor peripheral blood mononuclear cells were mixed and cultured in vitro on mouse fibroblasts expressing a high expression of human CD40 ligand that induces a HLA antibody production promoting signal and administered to NSG mice, a sufficient amount of HLA antibody production was produced. It has become possible to produce HLA antibody-producing humanized mice that can be obtained at a high rate. In addition, a humanized mouse model was constructed in which only donor-specific HLA antibodies were suppressed, and similarly sufficient HLA antibody production was observed for human BAFF-BAFF receptor signal addition and recipient regulatory T cell depletion.

研究分野：移植免疫

キーワード：抗体関連型拒絶反応 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

移植成績の向上により長期生着例も多く見られるようになったが、慢性拒絶反応により難治性のグラフト機能不全に陥ることが問題視されている。慢性拒絶反応のメカニズムとしてドナー白血球抗原(HLA)に対する HLA 抗体による抗体関連型拒絶反応が原因として挙げられるが、明確な機序は現在も明らかにされていない。マウス細胞によるメカニズム解析の報告はあるが、臨床に直結したヒト細胞での報告は皆無であった。我々はヒト免疫細胞が構築されたヒト化マウスに着目し、その研究を進めてきた。従来のヒト化マウスでは B 細胞・NK 細胞・マクロファージなどの T 細胞以外の免疫担当細胞の構築が不十分であったが、ヒト胎児由来胸腺細胞と幹細胞を重度免疫不全マウスに同時投与することにより、T 細胞のみならず B 細胞、マクロファージの十分な機能性を示すヒト免疫構築細胞を持つマウス(ヒト化マウス)を作製した。本邦で入手困難なヒト胎児組織の代わりにヒト臍帯血幹細胞を用いても各免疫担当細胞を構築し得ることが確認された。また、ヒト化マウスにアロ(同種異系)の末梢血ないし皮膚組織を移植したところ、十分なヒト IgG 産生が得られることが証明された。このヒト IgG 抗体産生ヒト化マウスモデルが構築されたことにより、ヒト細胞における慢性抗体性拒絶反応メカニズムの *in vivo* 解析や新規治療法の開発が可能になった。

### 2. 研究の目的

移植医療は近年目覚ましい進歩を遂げてきている。しかし長期生着例における慢性拒絶反応によるグラフト廃絶や絶対的なドナー不足は世界的に深刻な問題とされており、依然として解決に至っていない。当教室では以前から、ドナー不足の究極的解決策の一つとされる異種移植における研究を重ね、臨床応用に向けた最後の障壁とされる遅延型異種抗体性拒絶反応の存在をマウスモデルで証明した。また同種慢性拒絶反応モデルに用いるヒト化マウス作製に成功した。本研究は、従来解析困難であった同種/異種移植におけるヒト細胞の抗体性拒絶反応メカニズムをヒト化マウスモデルにより解明し、その制御法の確立を目的とする。これにより同種移植における慢性拒絶反応克服の可能性やレシピエントの適応拡大、異種移植の臨床応用が十分に期待される。

### 3. 研究の方法

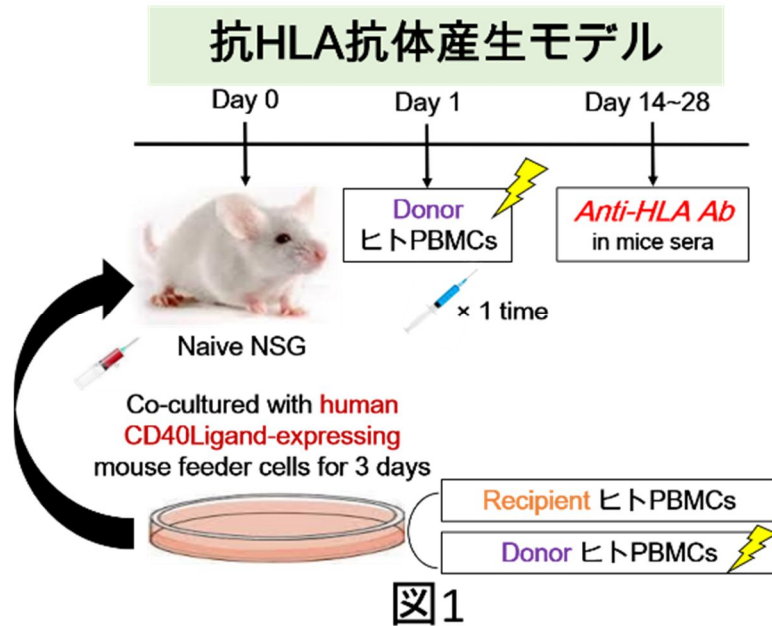
HLA 抗体産生ヒト化マウスモデルの作製：

末梢血単核球を用いた同種 HLA 抗体産生マウスモデルを確立した。健常人 responder ヒト末梢血と HLA 型の異なる(アロ)放射線照射 stimulator ヒト末梢血を B 細胞活性化伝達シグナル(CD40-CD40 ligand)遺伝子導入したマウス線維芽細胞(feeder 細胞)上で3日間 *in vitro* 共培養し、重度免疫不全 naïve NSG マウスに脾臓内注射し抗ドナー特異的 HLA 抗体(DSA)産生を図った(図1)。

### 4. 研究成果

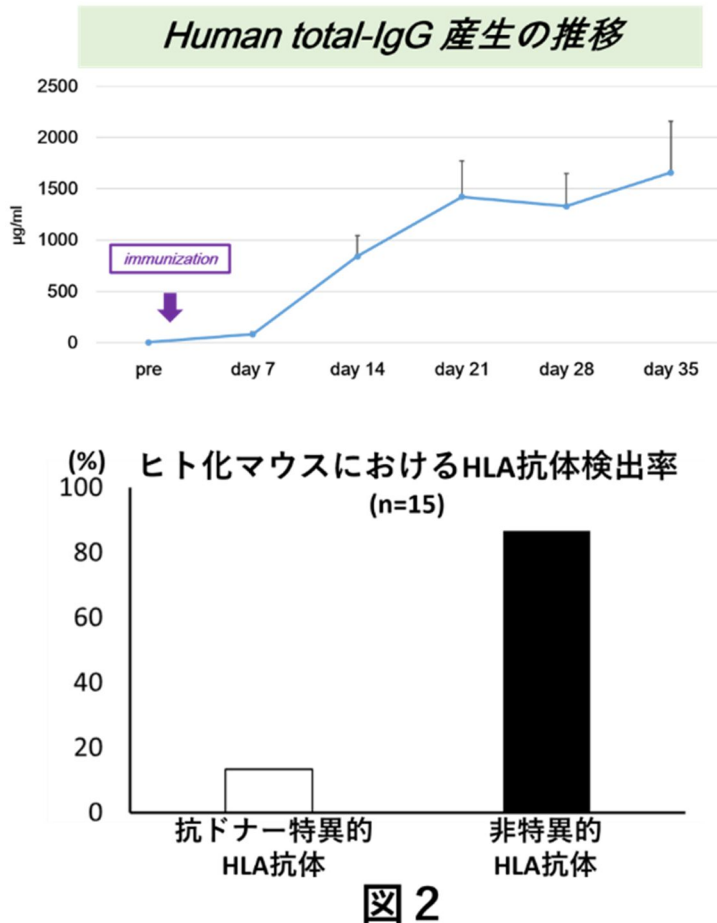
(1)HLA 抗体産生ヒト化マウスモデルの構築：

先述の末梢血を用いたヒト化マウスモデルにおいて、興味深いことに、このマウスでは human total IgG 抗体や非特異的な HLA 抗体は数多く産生されるものの、抗ドナー特異的 HLA 抗体 (Donor specific antibody; DSA) の産生が明らかに抑制されている傾向を示した(図 2)。つまり、このヒト化マウスモデルには DSA 産生のみを抑制するメカニズムが潜在しており解析対象になるのではないかと推察された。

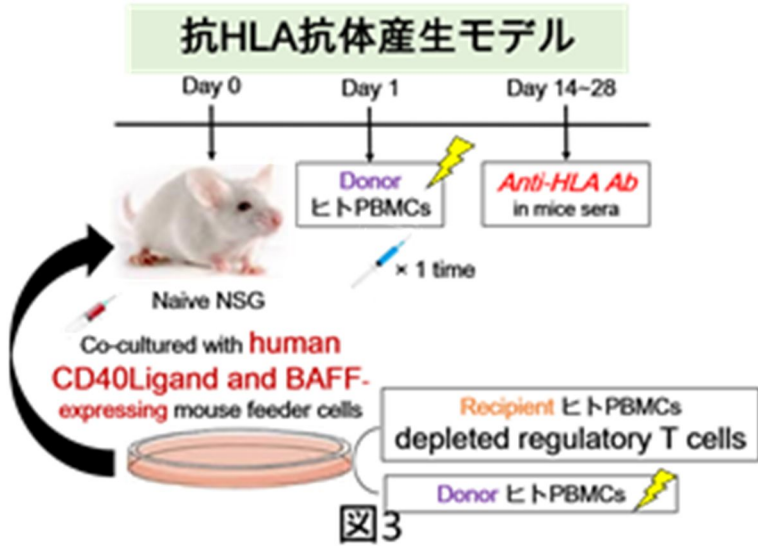


(2)ヒト化マウスモデルにおける抗ドナー特異的抗体産生抑制メカニズムの解析：

既に作製した HLA 抗体産生ヒト化マウスにおいて、別の抗体産生促進シグナルが欠如しているために DSA 産生の認められなかった可能性があると考えた。ヒト自己免疫性疾患患者血清中の BAFF(B cell activating factor belonging to the TNF family)濃度が過剰になれば、自己 HLA 抗原を認識した B 細胞から抗体産生が生じるという報告があり、これまでに用いたヒト CD40 リガンド強発現マウス繊維芽細胞にさらにヒト BAFF を強発現させ、ヒト BAFF-BAFF 受容体シグナルを加えた新しい抗体産生促進を誘導した HLA 抗体産生ヒト化マウスを構築した。一方で、NSG マウスへ投与する前段階のレシピエントとドナー末梢血単核球 in vitro 混合培養中には、DSA 産生を抑制する制御性 T 細胞や制御性 B 細胞も増殖/活性化している可能性があるため、培養中のレシピエント制御性 T 細胞を CD4+CD25+ regulatory T cell isolation kit を用いて除去した状態で新たに HLA 抗体産生ヒト化マウスモデル(図 3)を構築し、DSA の選択的産生抑制が解除されるか確認した。



BAFF-BAFF 受容体シグナル、制御性 T 細胞除去を行ったどちらの培養系においても、DSA 産生のみが抑制され、非特異的 HLA 抗体は十分量産生されるという結果であった。このことから、この DSA 産生抑制メカニズムはこうした抗体産生促進シグナルの特異的欠如から生じていないことが示唆された。そこで、この培養系で使用した responder



細胞上の他の抑制性シグナルを調べたところ、T 細胞活性抑制シグナル PD1-PDL1 がドナー抗原特異的に増強している可能

性を見出し、responder 抗原提示細胞上の PDL1 発現の upregulation が確認された。これに対して先述の培養系に human PD-L1 抗体を添加したところ、responder 抗原提示細胞上の PDL1 発現は減弱した。ごく一部のマウスにおいて十分量の DSA 産生が得られたが、再現性に乏しかった。また非特異的 HLA 抗体産生が得られているものの抗体価および抗体産生数の減弱を認めた。今後はこの抗原特異的 HLA 抗体産生ヒト化マウスを改良していく必要がある。

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 1件）

1. 著者名 Yanagawa Senichiro, Tahara Hiroyuki, Shirouzu Takayuki, Kawai Shintaro, Tanaka Yuka, Ide Kentaro, Akimoto Shuji, Ohdan Hideki	4. 巻 16
2. 論文標題 Development of a humanized mouse model to analyze antibodies specific for human leukocyte antigen (HLA)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0236614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0236614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田原裕之
2. 発表標題 ヒト化マウスを用いた抗HLA抗体産生機序の解明へ向けて
3. 学会等名 第21回日本異種移植研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

9. ヒト化マウスを用いた慢性拒絶反応機序解明の試み <a href="https://home.hiroshima-u.ac.jp/home2ge/research/trans/">https://home.hiroshima-u.ac.jp/home2ge/research/trans/</a>
---

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------