

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：33920

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19593

研究課題名(和文)腎移植における精密医療の導入：TCR/BCR 制御によるHLAミスマッチの克服

研究課題名(英文) Introduction of precision medicine in renal transplantation: attempt to overcome HLA mismatch by TCR/BCR control

研究代表者

小林 孝彰 (Kobayashi, Takaaki)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70314010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：ドナーHLAに対する抗体(DSA)による慢性拒絶反応が長期成績を妨げる原因となっている。次世代シーケンシングにより、ドナーHLAの免疫応答に関わるT細胞受容体、B細胞受容体の解析を試みた。1兆種類以上あるT細胞受容体のうち、DSA産生後には個体ごとに異なるT細胞受容体レパトアを特定できた。従来開発が困難であったT細胞のIndirect Recognition Pathwayを評価するアッセイの確立に成功した。In silico アルゴリズムによる評価、ヒト化マウスモデルによる移植前T細胞受容体レパトアの予測など研究をすすめ、ドナーHLA抗体産生の早期診断と有効な予防、治療法の開発をめざす。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国では慢性腎臓病の患者数は1300万人以上と推定され、年間4万人以上が末期腎不全となり、血液透析、腹膜透析、腎移植の腎代替療法を受けている。腎移植は末期腎不全に対する最良の治療とされているが、腎代替療法の中でわずか2-3%程度であり、ドナー不足問題とともに長期成績のさらなる改善が課題となっている。本研究では、次世代シーケンシングなどの最新技術を用い、免疫応答の第一歩であるT細胞受容体に着目し、1兆種類以上ある多様性から関連のある受容体を特定することができた。慢性拒絶反応に関わるドナーHLAに対する抗体産生を予防し、効率的に回避するための研究アプローチの妥当性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：HLA mismatches cannot be avoided in kidney transplantation. To control chronic antibody-mediated rejection (ABMR) caused by donor specific HLA antibody (DSA) after kidney transplantation, our attention has been directed towards T cell receptor (TCR) and B cell receptor (BCR). Analysis of PBMC mRNA from recipients with de novo DSA showed the specific trend in TCR beta, but not in TCR alpha or BCR. Candidates for TCR beta which might be involved in de novo DSA production have been identified. In vitro assay which can analyze indirect recognition pathway of CD4+ T cells was developed. We detected human CD45+ cells and IgG (IgM) in blood circulation using humanized (NSG) mice model. In silico analysis of T cell epitopes for over 700 renal transplant recipients revealed usefulness in de novo DSA risk prediction. To develop early diagnosis and effective avoidance of chronic ABMR, theoretical rationale and feasibility of TCR-targeted research have been demonstrated.

研究分野：移植外科、移植免疫

キーワード：移植・再生医療 抗体関連型拒絶反応 T細胞受容体 ドナー特異的HLA抗体 レパトア解析 個別化医療

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) HLA は自己、非自己を認識する重要な分子であり、移植領域 (腎臓など) においては、ドナー、レシピエントの HLA-A, B, DR (DQ) ミスマッチがゼロであることは、良好な予後を約束する。しかし、ミスマッチが存在すれば、ドナー由来の HLA (ミスマッチ抗原) に対するレシピエントの免疫応答は避けられず、ドナー特異的 HLA 抗体 (Donor Specific Antibody: DSA) が引き起こす慢性抗体関連型拒絶反応 (Chronic Antibody-Mediated Rejection: chronic ABMR) は、長期成績を妨げる重大な因子となっている。

(2) chronic ABMR の早期診断、治療を目指して、様々な研究に取り組んできた。至適免疫抑制導入のための Pharmacokinetics/ Pharmacodynamics 解析、早期診断のための Biomarker 探索・末梢血 B 細胞培養による抗体検出、抗体接着による臓器保護 (Graft Accommodation)、診断後の治療法の検討結果から、DSA 産生後には治療は困難であり、DSA 産生、CAMR に向かう免疫応答を抑制するためには、従来にはない革新的制御法の開発が望まれる。

(3) TCR (T 細胞受容体) は、抗原提示細胞の HLA に結合した非自己のタンパク断片を認識し、BCR (B 細胞受容体) は、膜に結合した抗体分子でありドナー抗原 (決定基) を認識する。これらは、複数の遺伝子断片から再構成 (V(D)J recombination) され、無数 (10(12)以上) の抗原に対応できるようになっている。次世代シーケンスなど最近の技術革新はこれらの解析を可能とした。

### 2. 研究の目的

(1) 免疫抑制療法の進歩により、臓器移植は HLA ミスマッチが存在しても短期の移植成績は向上した。しかし、ドナー HLA に対する抗体が引き起こす慢性抗体関連型拒絶反応は、長期成績を妨げる重大な因子となっている。T 細胞受容体 (TCR) は抗原提示細胞の HLA に結合した非自己タンパク断片を認識する。B 細胞受容体 (BCR) は膜に結合した抗体分子であり、形質細胞に分化する B 細胞を特定できる。TCR・BCR は遺伝子の再構成により 10(12)以上の多様性が存在するが、最近の技術革新 (レパトア解析・シングルセル PCR・HLA class II 結合ペプチド解析) は、ドナー HLA に反応する TCR・BCR の特定、さらにヒト化マウスを用いた in vivo 確認実験を可能にする。ドナー反応性 TCR・BCR を特定し、T/B 細胞の拒絶反応に向かう最初のレスポンスを末梢血 mRNA モニタリングで検出し、Class II 結合ドナー由来ペプチドによる TCR の RNA 干渉などでドナー特異的アロ抗原応答の無力化を実現することも可能になるであろう。実現すれば、HLA のゼロミスマッチ化 (iPS 細胞を含む移植医療の普遍化) にも貢献する。

(2) 本研究は挑戦的萌芽研究であり、その目的は、ドナー HLA の免疫応答に関わる TCR、BCR の解析により、de novo DSA 産生の早期診断と有効な予防、治療法の開発が可能であるか、本研究の実行可能性、将来の方向性を検討することである。

### 3. 研究の方法

(1) ドナー HLA に反応する TCR と BCR を特定し、有効な末梢血モニタリングが可能かどうか検討する。De novo DSA 産生患者検体を用いて、移植前、de novo DSA 産生時、1 年後において末梢血より mRNA を抽出し、次世代シーケンスによりレパトア解析を行う。当初は、TCR  $\alpha$ 、 $\beta$ 、BCR (IgM, IgG) 全ての解析を予定したが、再現性があり特定の傾向の見られた TCR  $\beta$  のみに着目して解析を行った。ドナー、レシピエントのリンパ球混合培養 (MLR) の前と後でレパトア解析を行い、リード数上位を比較検討を試みた。さらに MLR 後、初期に活性化する CD4、CD8T リンパ球 (OX40+) をシングルセルで 96 well plate に回収し、TCR  $\alpha$  鎖  $\beta$  鎖を PCR 増幅、direct sequence 法で配列決定を行い、レパトア解析の結果と照合する。同一の傾向が得られたら、recombinant TCR を発現する T 細胞を用い、ドナー HLA 特異的アロ抗原認識を検証する。

(2) ドナーミスマッチ HLA 情報 (PIRCHE アルゴリズム) からレシピエント Class II binding ペプチドを合成し、peptide pulse 樹状細胞による CD4+T 細胞の反応性を、ドナー細胞貪食樹状細胞の系と比較する。そして、シングルセル PCR を用いて  $\alpha$  鎖  $\beta$  鎖の遺伝子情報を入手し、上位 3-5 の頻度の遺伝子情報に基づき、recombinant TCR を発現する細胞を作成し反応性を検証する子と計画する。移植後早期に反応する TCR mRNA の末梢血モニタリング (real time PCR) の有効性を検討する流れである。今回は、Indirect recognition pathway による T 細胞応答アッセイの確立をめざす。

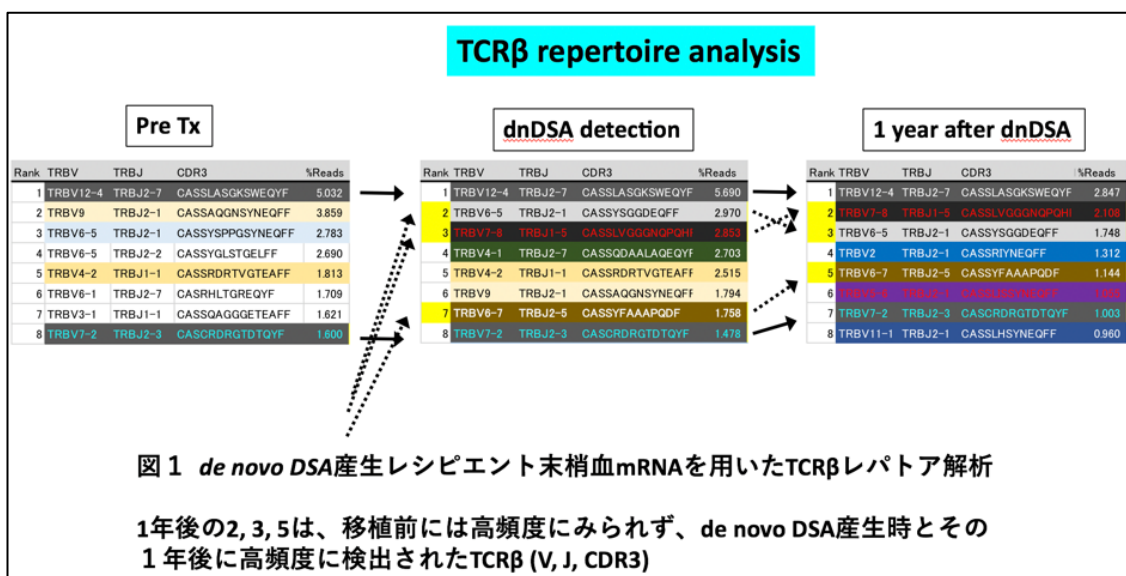
(3) ヒト化マウスの作成を試みる。T 細胞 B 細胞 NK 細胞の欠損した免疫不全マウス (NSG マウス) に異なる HLA を持つ 2 名の末梢血単核球を用いてヒト化マウスを作成し、ヒト CD45 陽性細胞数で生着を確認する。至適移入細胞数を調整し、GVHD までの期間を観察し、末梢血、脾臓、骨髄における T 細胞、B 細胞の検出を経時的に行う。細胞移入方法として静脈内、腹腔内、脾臓内を比較する。感作モデルとして、stimulator 細胞の種類、細胞数、移入時期の検討を行う。移入前の stimulator, responder 混合培養を追加することも検討する。

(4) 700 例の腎移植例の B cell epitope および T cell epitope 解析を in silico アルゴリズム

を用いて行う。臨床的に、de novo DSA 産生に関わる因子の検討を行い、TCR, BCR 研究の有効性、妥当性について評価する。de novo DSA は、移植前および移植後（年1回）HLA 抗体スクリーニングと特異性検査により判定する。

#### 4. 研究成果

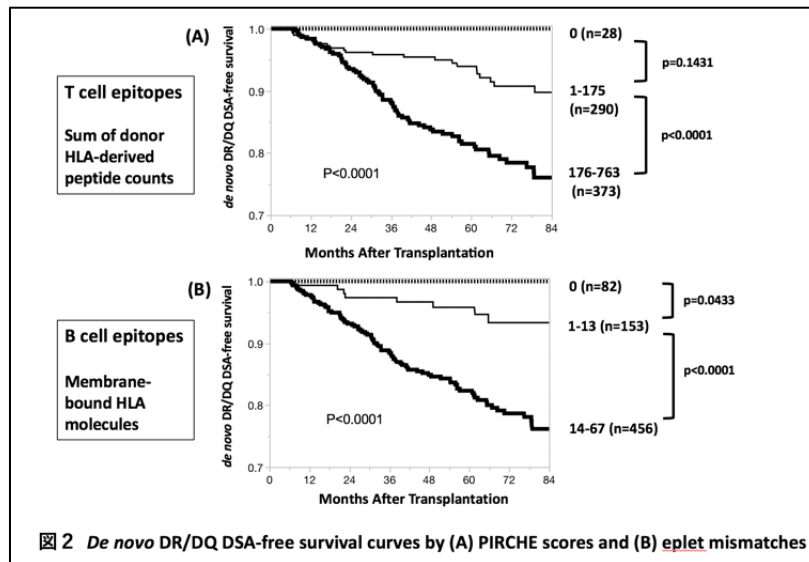
(1) 次世代シーケンス (NGS) を用いたレパトア解析では、de novo DSA 出現後に新たに検出される TCR  $\beta$  レパトアを見出したが、TCR  $\alpha$ 、BCR (IgM, IgG) については、特定の傾向を認めなかった。次に TCR  $\beta$  に焦点を絞りレパトア解析を行った。腎移植後 de novo DSA 産生を認めた3名（すべて DQB1\*03:01 に対する抗体）を対象とした。移植前、de novo DSA 産生時、その1年後の3ポイントで末梢血単核球の mRNA を用いて TCR レパトア解析を行った。3例において、移植前には高頻度として存在せず、de novo 産生時およびその1年後において持続して高頻度（出現率1%以上）を示す TCR  $\beta$  レパトアを特定することができた（図1）。また、同じ DQB1\*03:01 抗体でありながら、レシピエント HLA クラス2（抗原提示）が異なれば、それぞれ TCR  $\beta$  レパトアも異なっていることが判明した。さらに、CD4, CD8 分離後の解析においては、それぞれ特有のレパトアが含まれていた。以上より、同じ HLA 抗体であっても、抗体産生に関わる TCR（抗原提示細胞との反応）は、レシピエント、ドナーHLA の組み合わせにより決定されることが推察された。Single cell PCR によるドナー、レシピエント混合培養後の解析は進行中であり、今後の評価を待つ。今後は、これらの TCR レパトアが実際に特定の HLA 抗体産生に関与するかどうか、早期診断としての有用性、In vitro assay を用い移植前に抗体産生に関わる TCR レパトアを同定することが可能か、次なる検討課題を明確にした。



(2) 抗体産生に関わるとされる Indirect Recognition Pathway の系を確立すべく、活性化 Dendritic cell を利用して Stimulator 細胞を貪食することを視覚的に、反応 CD4 陽性 T 細胞は増殖で確認した。従来の MLR では、T 細胞の Direct recognition pathway による反応が主であるとされているため、CD4 T 細胞による Indirect Recognition Pathway の系を開発する必要がある。未熟樹状細胞の活性化、成熟化により、ドナー由来ペプチドまたは、ドナー細胞の貪食後に、CD4 T 細胞の反応性を解析する ELISPOT アッセイの確立に成功した。未熟樹状細胞でのドナー細胞貪食後に、IL-4, GM-CSF による活性化、IL-1 $\beta$ 、TNF  $\alpha$  による成熟化後の CD4+T 細胞への抗原提示が効果的であることを明らかにした。

(3) In vivo モデルとして不可欠な、重症免疫不全 (NSG) マウスを用いたヒト化マウスの系の確立を試みた。細胞数  $5 \times 10^6$  個の移入により、3 週間には末梢血でのヒト T 細胞、4 週にはヒト IgM, IgG 抗体の検出、さらに 8 週間には、GVHD を確認した。B 細胞の検出が困難であり、検討課題である。効率的な移入細胞の投与方法（末梢血、腹腔内、脾臓）、時期を検討後、ドナー細胞移入、感作モデルを作成し、HLA 抗体産生の確認をする予定である。そして、今後、de novo DSA 産生患者の移植前保存検体（ドナー、レシピエントの PBMC）を用いて TCR の経時的変化を解析することで、移植前に DSA 産生に関わる TCR レパトア予測研究の妥当性を明らかにした。

(4) ドナー、レシピエントHLA組み合わせによる In silico 解析から導かれた PIRCHE モデルの有用性、妥当性について腎移植700例を用いて検討した。DSA 産生に關与する因子として、従来から報告されている B cell receptor が認識するエピトープ (Eplet) ミスマッチと同様に、PIRCHE スコア (TCR が認識するエピトープ: レシピエント樹状細胞に提示可能なドナー由来ペプチド数) も独立した DSA 産生因子であることを明らかにした (図2)。以上より、移植領域における TCR をターゲットとした抗体関連型拒絶反応の早期診断の理論的根拠を明確にし、新規治療法の開発の可能性を示すことができた。



以上より、移植領域における TCR をターゲットとした抗体関連型拒絶反応の早期診断の理論的根拠を明確にし、新規治療法の開発の可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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, Miwa Yuko, Uchida Kazuharu, Matsuoka Yutaka, Horimi Kosei, Kobayashi Takaaki	4. 巻 41
2. 論文標題 Suppressive Effect of Everolimus on IL-2, IL-10, IL-21, and IFN Levels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Therapeutic Drug Monitoring	6. 最初と最後の頁 371～375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1097/FTD.0000000000000630	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 -

1. 著者名 Maenaka Akihiro, Kenta Iwasaki, Ota Akinobu, Miwa Yuko, Ohashi Wataru, Horimi Kosei, Matsuoka Yutaka, Ohnishi Masafumi, Uchida Kazuharu, Kobayashi Takaaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Interferon- $\gamma$ -induced HLA Class II expression on endothelial cells is decreased by inhibition of mTOR and HMG-CoA reductase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 927-936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1002/2211-5463.12854	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19件（うち招待講演 1件／うち国際学会 6件）

1. 発表者名 T. Kobayashi, K. Iwasaki, M. Okada, K. Horimi, Y. Matsuoka, A. Takeda, N. Goto, S. Narumi, Y. Watarai
2. 発表標題 ABO Incompatibility in Kidney Transplantation Can Increase a Safety Margin of Epitope Mismatch Levels against De Novo DSA Production.
3. 学会等名 American Transplant Congress (ATC) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Niemann, K. Geneugelijck, E. Spierings, T. Tomosugi, T. Kobayashi
2. 発表標題 The number of donor-HLA-derived peptides presented by recipient DRB3/4/5 and DQA1-DQB1 in kidney-transplanted recipients are independent from the number of DRB1-presented peptides.
3. 学会等名 33rd European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI meeting) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Tomosugi, K. Iwasaki, K. Futamura, M. Okada, T. Hiramitsu, M. Tsujita, N. Goto, S. Narumi, Y. Watarai, T. Kobayashi, M. Niemann, E. Spierings
2. 発表標題 Identification of immunogenic recipient HLA class II and donor-HLA-derived peptide complexes: clinical relevance to de novo donor-specific HLA antibody formation in kidney transplantation.
3. 学会等名 19th ESOT (European Society of Organ Transplantation) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Kobayashi
2. 発表標題 Preventive and preemptive therapy for antibody-mediated rejection
3. 学会等名 International Symposium of Transplantation 2019 (招待講演) (国際学会)
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
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 友杉俊英、岩崎研太、坂本慎太郎、神田亜希子、二村健太、岡田学、平光高久、後藤憲彦、鳴海俊治、渡井至彦、小林孝彰、Niemann Matthias、Spierings Eric
2. 発表標題 de novo DSA産生に影響を及ぼす、レシピエントHLA class II・ドナーpeptideの複合体の検討
3. 学会等名 第28回日本組織適合性学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎研太、三輪祐子、打田和治、堀見孔星、松岡裕、小林孝彰
2. 発表標題 内皮細胞HLA-class II DRとアロ応答するPD-1+CD25+foxp3+CD4 T細胞の機能解析
3. 学会等名 第28回日本組織適合性学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎研太、三輪祐子、平光高久、岡田学、鳴海俊治、渡井至彦、武田朝美、堀見孔星、松岡裕、友杉俊英、奥村真衣、野田貴幸、前仲亮宏、打田和治、小林孝彰
2. 発表標題 抗体関連型拒絶反応抵抗性獲得メカニズムに関する研究
3. 学会等名 第55回日本移植学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 友杉俊英、岩崎研太、坂本慎太郎、縄野貴明、神田亜希子、福原宏樹、二村健太、岡田学、平光高久、後藤憲彦、鳴海俊治、渡井至彦、小林孝彰
2. 発表標題 PIRCHE によるドナーHLA 応答性T 細胞の術前診断
3. 学会等名 第55回日本移植学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前仲亮宏、岩崎研太、三輪祐子、堀見孔星、松岡裕、打田和治、大西正文、小林孝彰
2. 発表標題 de novo DSA によるABMR 抑制のためのグラフトHLA 発現制御
3. 学会等名 第55回日本移植学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀見孔星、岩崎研太、小林孝彰
2. 発表標題 愛知医科大学における抗HLA抗体モニタリングとその対応
3. 学会等名 第53回日本臨床腎移植学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 友杉俊英、岩崎研太、坂本慎一郎、神田亜希子、二村健太、岡田学、平光高久、後藤紀彦、鳴海俊治、渡井至彦、小林孝彰
2. 発表標題 術前ドナーHLA応答性T細胞診断の重要性
3. 学会等名 第53回日本臨床腎移植学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Tomosugi, K. Iwasaki, M. Okumura, Y. Matsuoka, K. Horimi, M. Okada, Y. Watarai, T. Kobayashi.
2. 発表標題 Searching for Recipient-HLA Class II and Donor-HLA-Derived Peptide Complexes Inducing Protective Effect against De Novo Donor-Specific HLA Antibodies Formation in Kidney Transplantation.
3. 学会等名 American Transplant Congress (ATC) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takaaki Kobayashi, Manabu Okada, Kenta Iwasaki, Kosei Horimi, Yutaka Matsuoka, Yuko Miwa, Kazuharu Uchida, Asami Takeda, Norihiko Goto, Shunji Narumi, Yoshihiko Watarai.
2. 発表標題 Beneficial effect of ABO incompatibility on de novo DSA production after kidney transplantation
3. 学会等名 TTS (The Transplantation Society) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 友杉俊英、岩崎研太、二村健太、岡田学、平光高久、辻田誠、後藤憲彦、鳴海俊治、渡井至彦、小林孝彰
2. 発表標題 De novo DSA産生を抑制に導く、レシピエント・ドナーHLAの組み合わせの検討
3. 学会等名 第27回日本組織適合性学会
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回日本組織適合性学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 友杉俊英、岩崎研太、二村健太、岡田学、辻田誠、平光高久、後藤憲彦、一森敏弘、鳴海俊治、渡井至彦、小林孝彰
2. 発表標題 De novo DSA 抗体産生抑制に関与し得るHLAアリルの検討
3. 学会等名 第54回日本移植学会
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回日本移植学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩崎研太、三輪祐子、相原祐子、河野あゆみ、堀見孔星、松岡裕、友杉俊英、奥村真衣、打田和治、小林孝彰
2. 発表標題 TCRを標的としたドナー特異的応答性T細胞のETCの構築
3. 学会等名 第54回日本移植学会
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	岩崎 研太  (Iwasaki Kenta)  (10508881)	愛知医科大学・医学部・准教授   (33920)	
研究分担者	三輪 祐子  (Miwa Yuko)  (90572941)	愛知医科大学・医学部・助教   (33920)	
連携研究者	野田 貴幸  (Noda Takayuki)  (50817088)	愛知医科大学・その他部局等・薬剤師   (33920)	