

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09064

研究課題名(和文) ヒト化マウスによる難治性胆汁うっ滞性疾患と移植後HLA抗体の病態解明と治療法開発

研究課題名(英文) The development of treatment and analysis for the mechanism on cholestatic liver disease by using humanized mouse model

研究代表者

後藤 了一 (Goto, Ryoichi)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：10645287

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)：当院原発性胆汁性胆管炎(PBC)は、初診の9.7%で、73%が移植希望し、38%に生体肝移植を実施、46.4%が脳死待機した。待機中51.2%が死亡、20.5%が脳死肝移植に至り、移植後成績は良好だった。また、ヒト化マウス皮膚移植モデルをNOD/SCID/IL-2Rg-/- (NSG)またはBALB/c Rag2-/- IL-2rg-/- (BRG)マウスで試み、NSGはGr-1抗体無しで拒絶する一方、BRGは皮膚移植片を生着させ、これにヒト末梢血白血球(PBMC)を投与すると拒絶した。更にPBC肝移植例のPBMCをヒト化マウスに投与すると、肝障害がみられた。PBCの病態に免疫の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性胆汁性胆管炎(PBC)に代表される胆汁うっ滞性疾患は未だに原因不明の病態であり、その病態解明が待たれている。本研究では直近のPBCに対する肝移植の頻度、脳死肝移植による救命、社会復帰の成績を明らかにした。本邦では世界に比べて脳死ドナー不足が顕著であり、脳死ドナー待機中死亡が高率であることが示され、この対策が喫緊の課題であることが浮き彫りとなった。加えてその病態についてヒト化マウスによる免疫関与の可能性を示した。本研究が病態解明の足がかりとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We identified that the prevalence of primary biliary cholangitis (PBC) among the visiting patients in our transplant unit was 9.7%. Of them, 27.8% received living donor liver transplantation (LT), and 33.9% was listed in the waiting list for deceased donor LT. The waiting list mortality was 51.2%. Deceased donor LT was performed in 20.5%. The favorable post-LT outcome was achieved.

To establish humanized mouse model, human skin grafts were transplanted to NOD/SCID/IL-2Rg-/- (NSG) and BALB/c Rag2-/- IL-2Rg-/- (BRG) mice. Although the skin grafts could not be accepted without anti-Gr-1 antibodies in NSG, BRG accepted skin grafts. In addition, BRG mice could reject the accepted skin grafts by reconstitution with human peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

To observe the role of immunity in PBC, PBMC isolated from the patient suffering from severe PBC, were reconstituted in humanized mouse. We identified the liver injuries in the mouse suggesting the immunity affects disease onset.

研究分野：移植免疫

キーワード：原発性胆汁性胆管炎 肝移植 ヒト化マウス 皮膚移植

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝移植を必要とする末期肝不全の原因疾患は近年、疾患分布が変化している。これまで末期肝不全の主原因であった C 型肝硬変が、新規抗ウイルス薬により根治可能となり、非アルコール性脂肪肝炎、原発性胆汁性胆管炎 (PBC)、原発性硬化性胆管炎 (PSC) が末期肝不全の原因疾患として年々増加している。特に難治性疾患である PBC、PSC の原因は不明で、肝移植後の再発も問題である。PBC には、治療抵抗性の予後不良症例があり、一旦増悪すると肝移植なしでの長期予後は望めない。当科では MELD スコア 18 以上の進行症例は極めて予後不良であり、早期肝移植の必要性を報告してきた。また抗ミトコンドリア抗体の診断への有用性や、自己免疫性肝炎との Overlap、移植後再発もみられることから、PBC の病態に免疫の関与が疑われている。更に臓器移植後の長期成績に関わる慢性拒絶反応も抗体を中心とした免疫の関与が疑われている。近年、感度・特異度の高い Luminex 法による抗 HLA 抗体の臨床検査が可能になり、保険収載もされたことからドナー HLA に特異的に結合する抗ドナー HLA 抗体と慢性拒絶反応との関連が注目されている。研究代表者の後藤らは移植肝グラフトに線維化の進行がみられる症例に血清中の高力価抗ドナー HLA 抗体の発現を認めることを報告した (Fukasaku Y, Goto R, アメリカ移植学会 2015)。加えてヒト化マウスの研究手法を用いて、抗 HLA 抗体と冷阻血時間との関連についても明らかにした (Goto R, Transplantation 2013)。

上記に示したように難治性肝疾患、移植後慢性拒絶反応は原因究明、新規治療法の開発が急務だが、ヒト免疫に特有な病態であり、十分な基礎的な研究が進んでいない。ヒト化マウスはヒト免疫細胞を免疫不全マウスに移入し、ヒト免疫反応をマウス体内を借りて観察する新しい免疫学的実験ツールである (Issa F, Goto R, Transplantation 2010)。このヒト化マウスにヒト組織を移植する研究モデルは Oxford 大学の移植免疫グループを中心に発展してきた。研究代表者の後藤、分担者の財津は Oxford 大学でヒト化マウスを用いた研究に従事した経験がある (Zaitsumi M, JCI insight 2017)。またヒト化マウスでは骨髄、脾臓内にヒト B リンパ球が生着、ヒト抗体を産生することから、抗体関連の免疫機序の解明が可能である。

2. 研究の目的

難治性胆汁うっ滞性疾患の病因と、移植後の慢性拒絶反応やグラフト線維化症例における抗体を中心とした免疫の関与を明らかにし、機序と治療法を探索する。

3. 研究の方法

(1) 1997 年 9 月～2019 年 10 月の期間に当院移植外科を肝移植目的に紹介された症例 1186 例、また同期間に肝移植を実施した症例を対象に胆汁うっ滞性疾患である PBC の頻度、移植成績、移植別の対象疾患の違いなど比較検討した。

(2) 抗 HLA 抗体の発現がみられた肝移植後の症例から血清を採取し保存した。抗 HLA 抗体の発現時期を検討するため移植前の保存血清の抗 HLA 抗体を測定した。HLA 抗体測定は Labscreen single antigen beads 法 (One Lambda Inc.) を用いた。

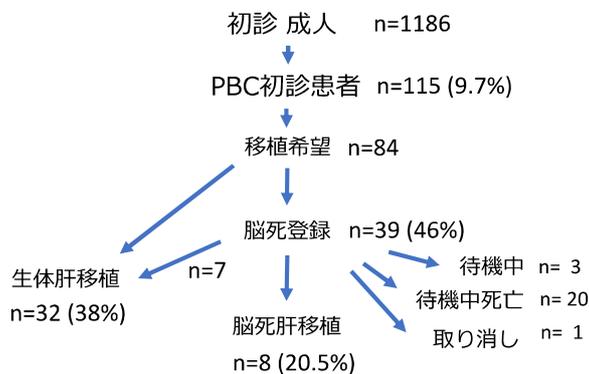
(3) 免疫不全マウスに NOD/SCID/IL-2Rg^{-/-} (NSG) マウス、BALB/c Rag2^{-/-} IL-2rg^{-/-} (BRG) マウスを用いてヒト化マウスの作成を検討した。ヒト皮膚は十分な informed consent にて同意が得られた皮膚移植を必要とする症例の大腿から採取された皮膚グラフトのうち、臨床で使用しなかった余剰皮膚を提供頂いた。ヒト皮膚は約 1cm² をマウスの胸背部に移植し、7-0 Maxon (Covidien, Japan) にて連続縫合した。移植後バンデージにて 1 週間皮膚グラフトを保護した。皮膚グラフトは拒絶反応により 90% 以上壊死した時点を graft loss と判断した。

(4) 本研究に同意を頂いた PBC 症例の PBMC を末梢血から採取し、フィコールにてリンパ球を分離した後、2.5x10⁶ のヒトリンパ球を NSG マウスに i.p. 投与した。

4. 研究成果

(1) 対象となる胆汁うっ滞性疾患のうち、原発性胆汁性胆管炎 (PBC) の当院での受診状況と肝移植の実施、その予後について調査した。1997 年 2019 年の当院に初診した成人症例 1186 例のうち 115 例 (9.7%) が当院を紹介受診し、うち 84 例が移植を希望、32 例が生体肝移植に至り、39 例の脳死待機リストへの登録がなされた。脳死待機リストへの登録症例は、20 例が待機中死亡となり脳死肝移植に至ったのは 8 例のみであった (図 1)。肝移植に至った生体、脳死肝移植を比較すると、移植前の因子は血清総ビリルビン値、MELD はいずれも脳

図1. 当院のPBC初診患者(18歳以上)



死肝移植症例が有意に高値であった(図2)。術後成績は有意差はないものの脳死肝移植が生体肝移植に比べ良い傾向であった(図3)。この解析結果を2019年10月に開催された日本移植学会にて報告した。

(2) 肝移植後にドナーに対する抗 HLA class II 抗体の発現が確認された症例14例から血清を採取し保存した(研究計画について IRB の承認 #017-0104、本人承諾済み)。また研究に際し、移植後 de novo 発生であることを明らかにするために移植前 HLA 抗体を測定したが、その結果を用いて移植前抗ドナー抗体のリスク因子を解析し、グラフトサイズが重要であること、グラフト不全となった移植前抗ドナー抗体陽性症例は Labscreen の測定で DSA-MFI が有意に高いことを明らかにした(図4)。この結果を2019年に開催された日本肝胆膵外科学会で報告し、論文に報告した(1)。また de novo で発生する HLA 抗体についても、血清採取に伴う検査データを利用して解析し、de novo ドナー抗体のうち MFI 値が 9000 以上と高値である症例に線維化進行がみられることを見出し(図5) 特に線維化進行を伴う抗ドナー抗体陽性(MFI9000 以上)はグラフト年齢が高齢であることを明らかにした(図6)。この研究成果は2019年日本消化器外科学会、2021年肝移植学会、2021年日本移植学会で報告した。

(3) ヒト化マウス皮膚移植モデルをヒトの免疫構築に優れた免疫不全マウスである NOD/SCID/IL-2Rg^{-/-}(NSG)マウスを用いて検討した。その結果 NSG マウスにヒト皮膚を移植すると獲得免疫を持ち合わせていないにもかかわらず拒絶反応が生じた(n=4、図7A no treatment 群)。これは以前の報告(Kenney L., Am J Transplant 2017)でも示されているように Gr-1 陽性の自然免疫が関与している可能性があった。そこで抗 Gr-1 抗体を投与したところ、マウスの反応によるヒト皮膚移植片の拒絶は制御された(図7 抗 Gr-1 抗体 4-5 日毎または 7-8 日毎)。また他の種類の免疫不全マウスである BALB/c Rag2^{-/-} IL-2rg^{-/-}(BRG)マウスではヒト皮膚移植片は拒絶されず(図7B no treatment 群) このマウスに皮膚グラフトと異なるヒト由来の PBMC を構築した場合、中央値 27 日で拒絶反応が生じることが確認された。

(4) ヒト PBMC を NSG マウスに i.p. するとマウス内に免疫が構築されることを確認した。また肝移植後の症例から採取した PBMC も NSG マウスに構築可能であることを明らかに

図2. PBCに対する肝移植 脳死、生体の比較 - 術前、手術因子 -

成人肝移植	生体 (n=32)	脳死 (n=8)	P
性別 (女性)	26 (81.2%)	6 (75%)	n/a
年齢 (歳)	51.3 (40.3-70.0)	47.8 (36.1-58.5)	0.27
BMI	22.4 ± 2.7	22.6 ± 5.8	0.84
血小板 (/ μ l)	12.1 ± 6.8	11.3 ± 7.1	0.54
T-bil (mg/dl)	19.4 ± 11.4	35.9 ± 14.3	*0.0068
PT (s)	16.2 ± 2.8	18.6 ± 4.1	0.22
sCre (mg/dl)	0.7 ± 0.4	2.7 ± 3.0	0.092
AMON (mg/dl)	96.4 ± 51.9	55.1 ± 46.1	0.057
ALP (U/L)	529.2 ± 242.8	618 ± 227.8	0.47
Child pugh	10.6 ± 1.4	11.9 ± 1.6	0.071
MELD	17.5 ± 6.7	32.4 ± 6.7	***0.0004
脾臓径 (cm)	13.5 ± 2.7	15.6 ± 3.2	0.068
手術時間 (分)	956.7 ± 272.9	710.7 ± 139.1	**0.0031
出血量	6560 ± 5391	8268 ± 4632	0.23
摘出肝重量	1337.4 ± 468.5	1493.0 ± 490.6	0.64
CIT	62.8 ± 46.4	538.3 ± 190.4	***0.0001
WIT	46.2 ± 13.4	41.8 ± 11.1	0.47

図3. PBCに対する肝移植後患者生存率

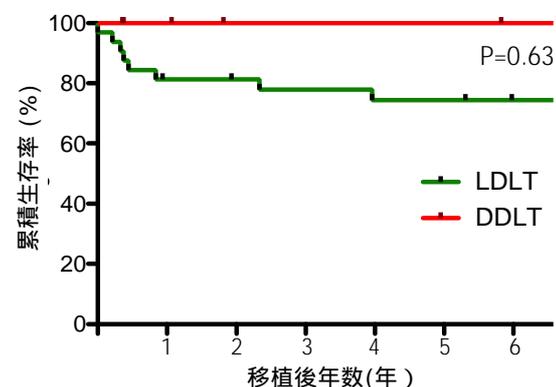


図4

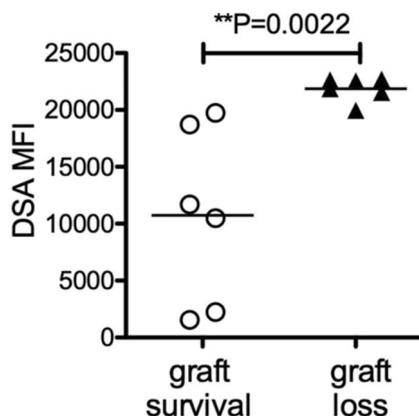
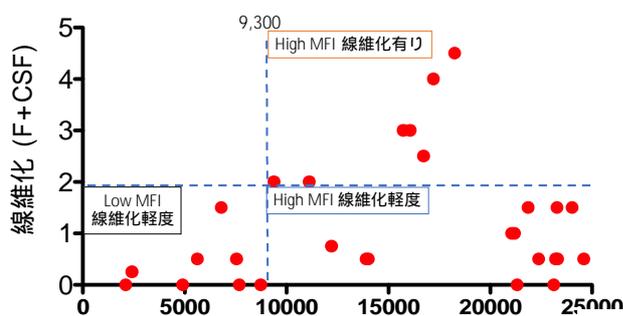


図5. DSA-MFIと肝グラフト線維化



した。この構築された PBMC を用いて免疫モニタリングを行うことで、臨床の免疫抑制剤内服状態では確認できない、患者本来の免疫状態が観察できる可能性を示し、これを論文報告した(2)。続いて、PBC に対し肝移植を実施し術後再発が疑われる症例の PBMC をヒト化マウスに投与し、肝病変の有無を観察した。PBC のヒト免疫がヒト化マウスに構築されたことを、マウス末梢血のヒト CD45 陽性細胞の存在(1%以上)で確認した。このマウスの肝組織病理像で、胆管周囲に浸潤する芽球化したリンパ球が存在することを確認した(図8)。

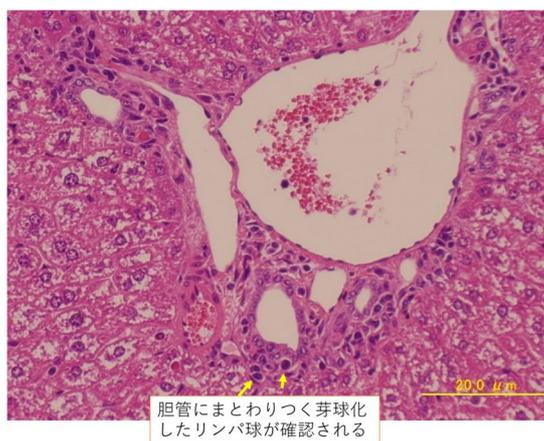
図6. DSA-MFIと肝グRAFT 線維化

	Lo MFI 線維化程度 N=8	High MFI 線維化程度 N=14	High MFI 線維化(+) N=7	P
男性	5 (62.5%)	5 (35.7%)	4 (57.1%)	0.51
移植時年齢	2.1 (0.6-14.2)	1.2 (0.5-16.2)	2.2 (1-5.5)	0.67
ドナー年齢	32.5 (28-55)	32 (26-67)	44 (28-63)	0.10
グRAFT年齢	45.6 (39-70)	39.9 (33-69)	*57.3 (47-78)	*0.0022 vs. Hi MFI
ドナー 母/父/祖母	3(38%) / 4(50%) / 1(13%)	7 (50%)/6 (43%)/ 1 (7%)	2(29%)/3(43%)/2 (29%)	0.38
BA/劇症/その他	7(88%) / 0 / 1(13%)	10 (71%) / 0 / 4 (29%)	4(57%) / 3 (43%) / 0	0.08
GvSv (%)	56.4± 16.2	*92.0± 22.6	77.9± 19.1	*0.0051 vs. Lo MFI
JSA CIT (min)	89.0± 86.2	94.5± 53.4	43.2± 27.2	0.24
DQ+DR/DQ/DR	4(50%) / 4(50%) / 0	3(23%)/9(64%)/2(15%)	6 (86%) / 1(14%)/0	*0.038
Sum	13,082± 7,989	*52,745± 26,905	*59,640± 30,349	*<0.003 vs. Lo MFI

図7. ヒト化マウス皮膚移植モデル

A	Human skin to NSG mice	Graft survival (days)
	No treatment	18, 20, 23, 27
	αGr-1 Ab i.p. every 4-5 days	45, >100
	αGr-1 Ab i.p every 8-10 days	11, >100
	Death with functioning graft	
B	Human skin to BRG mice	Graft survival (days)
	No treatment	>100, >100, >100

図8. PBC症例のPBMCを用いたヒト化マウス



胆管にまわりつく芽球化したリンパ球が確認される

- Goto R, Ito M, Kawamura N, Watanabe M, Ganchiku Y, Kamiyama T, et al. The impact of preformed donor-specific antibodies in living donor liver transplantation according to graft volume. Immun Inflamm Dis. 2022.
- Fukasaku Y, Goto R, Ganchiku Y, Emoto S, Zaitzu M, Watanabe M, et al. Novel immunological approach to assess donor reactivity of transplant recipients using a humanized mouse model. Hum Immunol. 2020;81(7):342-53.

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukasaku Yasutomo, Goto Ryoichi, Ganchiku Yoshikazu, Emoto Shin, Zaitzu Masaaki, Watanabe Masaaki, Kawamura Norio, Fukai Moto, Shimamura Tsuyoshi, Taketomi Akinobu	4. 巻 81
2. 論文標題 Novel immunological approach to asses donor reactivity of transplamt recipients using a humanized mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Immunology	6. 最初と最後の頁 342 ~ 353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.humimm.2020.04.007	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 該当する

1. 著者名 Goto Ryoichi, Ito Makoto, Kawamura Norio, Watanabe Masaaki, Ganchiku Yoshikazu, Kamiyama Toshiya, Shimamura Tsuyoshi, Taketomi Akinobu	4. 巻 10
2. 論文標題 The impact of preformed donor specific antibodies in living donor liver transplantation according to graft volume	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Immunity, Inflammation and Disease	6. 最初と最後の頁 e586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iid3.586	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤 了一
2. 発表標題 肝移植における抗HLA抗体の役割
3. 学会等名 第38回 肝移植学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤了一、伊藤 誠、財津雅昭、川村典生、渡辺正明、神山俊哉、嶋村 剛、武富紹信。
2. 発表標題 The role of preformed donor-specific antibodies in living donor liver transplantation
3. 学会等名 第31回 日本肝胆膵外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤了一、巖築慶一、川村典生、渡辺正明、神山俊哉、嶋村 剛、武富紹信
2. 発表標題 当院における原発性胆汁性胆管炎に対する生体・脳死肝移植症例の特徴
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 後藤了一、財津雅昭、川村典生、渡辺正明、神山俊哉、嶋村剛、武富紹信
2. 発表標題 生体肝移植におけるde novoドナー特異的HLA抗体高力価症例のグラフト線維化の危険因子
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤了一、巖築慶一、川村典生、渡辺正明、嶋村 剛、武富紹信
2. 発表標題 小児生体肝移植後de novo 抗ドナー抗体陽性の線維化進行リスク因子の検討
3. 学会等名 第57回 日本移植学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学教室I 研究グループのご紹介 移植グループ
<http://www.surg1-hokudai.jp/research/>

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	財津 雅昭 (Zaitsu Masaaki) (20768981)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	
研究 分 担 者	渡辺 正明 (Watanabe Masaaki) (40789848)	北海道大学・医学研究院・特任講師 (10101)	

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