

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591650

研究課題名（和文）

臓器移植における B 細胞制御による免疫寛容の誘導

研究課題名（英文）

Induction of tolerance by B cell regulation in the organ transplantation

研究代表者

瀧本 康史 (FUCHIMOTO YASUSHI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：40219077

研究成果の概要（和文）：急性拒絶反応、慢性拒絶反応に T 細胞のみではなく、B 細胞が重要な役割を演じていることが近年、知られている。血液型不適合肝移植ならびに骨髄移植における患者末梢血の B 細胞を humanized-NOG マウスを用いて ex-vivo でドナー抗原にて感作し、坑ドナー抗体産生能を評価した。その結果、未熟な B 細胞が成熟していく段階で臓器内の抗原に反応性の B 細胞クローンが消去され免疫寛容にいたることが示された。B 細胞除去により慢性拒絶の抑制、更には T 細胞免疫にも寛容が得られる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：It was known that B cells played an important role as well as T cells for acute and chronic rejection. We sensitized B cells in the patients of blood type incompatibility liver transplantation and the bone marrow transplantation, with a donor antigen using humanized-NOG mouse in ex-vivo and evaluated donor antibody production ability. As a result, it was shown that reactive B-cell clones were removed at the stage when immature B cells matured by the antigens in the organ and induced the tolerance. The suppression of the chronic rejection, the possibility that, besides, tolerance was obtained for T-cell immunity were demonstrated by B-cell removal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般・移植

キーワード：移植、B 細胞、ドナー特異的免疫寛容、Rituximab、血液型不適合、MHC

## 1. 研究開始当初の背景

21 世紀の臓器移植医療に課せられた課題は、①急性抗体関連性拒絶反応と慢性拒絶反応の制御と②免疫抑制の至適化、究極的にはドナー特異的免疫寛容の誘導であると考えられる。抗体関連性拒絶反応には既存抗体および既存の抗体産生細胞の関与する急性抗体関連性拒絶反応と移植後に新たに出現した抗体産生 B 細胞の関与する慢性拒絶反応とに大きく分類される。一方、MHC を介したアロ

抗原の認識、特にレシピエントの抗原提示細胞による CD4 陽性 T 細胞を介した Indirect pathway が晩期の抗体関連性拒絶反応に大きく寄与しているものと考えられている。近年、自己免疫疾患に対する抗体療法による B 細胞の除去治療での効果が報告されるようになり、自己抗体の減少や臨床症状の改善が報告されている。自己に対する寛容のメカニズムはアロ抗原に対する寛容の解明のヒントとなる。B 細胞の免疫寛容の過程として、骨髄

での成熟過程において自己抗原へ暴露されることによる消失(Deletion)、再編成(editting)、無反応(anergy)という3つのメカニズムが提唱されている(Lang. et al., Eur J Immunol, 2000.)。

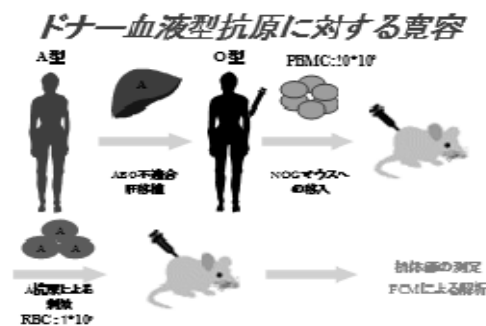
## 2. 研究の目的

我々はこれまでに血液型不適合の肝移植レシピエントがドナー血液型抗原に対して寛容状態を獲得している事実をドナー血液型抗体が移植後に特異的に抑制されているという現症とこのレシピエントの単核球細胞を用いた trans-vivo のモデルを用いて証明してきた。Preliminary な結果として、乳幼児における未熟な B 細胞あるいは抗 CD20 抗体 (Rituximab) によって成熟 B 細胞を除去された成人においては、B 細胞の成熟の過程で臓器移植を行うことにより、その臓器特異的抗原に対して反応性を持つ B 細胞の特異的 elimination が誘導され、寛容が導かれると推察された。また一方で、除去治療を受けていない成熟 B 細胞が多量の膜結合型抗原に暴露されるとわが施設で開発した Intraportal infusion (PGE とステロイドを門脈から注入する局所療法) を併用することによって移植後の急性期を乗り切り、その結果成熟 B 細胞が無反応となることが推察された。そして興味深いことに B 細胞除去療法を施行した血液型不適合移植患者は適合患者と比較しても成績は同等あるいは T 細胞が関与するといわれる急性拒絶反応においてはむしろその発生率は低い事実を経験しており、B 細胞除去療法が血液型糖鎖抗原だけでなく、MHC に対しても寛容を導く可能性があることを示唆している。近年、急性液性拒絶反応ならびに慢性拒絶反応はドナー特異的抗体 (DSA) が関与していることが報告されており、B 細胞免疫寛容の機序を知ることを目的とする。

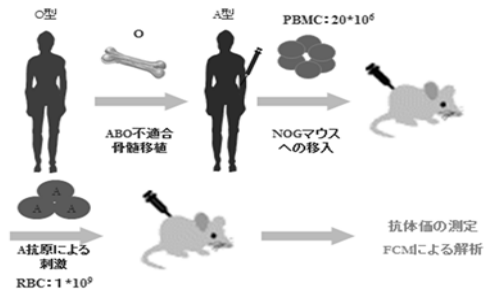
## 3. 研究の方法

(1) humanized-NOG を使用したモデルで血液型糖鎖抗原に対する B 細胞に免疫寛容の機序の検討

① 上記の仮説の確認のため血液型不適合肝移植症例での追試を行った (下図)



② 血液型不適合骨髄移植 (O→A) 症例においては O 型ドナーの骨髄は抗 A 抗体を産生しうるが上記の仮説ではレシピエント臓器内で A 抗原に反応する特異的 elimination が誘導される可能性があり、それを検証するため humanized-NOG を使用したモデルでドナー骨髄由来の B 細胞をレシピエント血液型 A で感作して抗体産生の有無を ELISA にて評価した。



(2) 血液型不適合肝移植においてドナー血液型反応 B 細胞の消去を確認するため以下の in vitro のモデルを実施した。

① B 細胞を Fluosphere bead を用いて分離したあとにフローサイトメトリーにより、ドナー血液型抗原特異的に反応する抗体を用いて、その消失を移植前・後レシピエントの B 細胞とレシピエントタイプ血液型の検者の B 細胞を検出比較した。

② ELISPOT assay を用いたドナー血液型特異的抗体産生細胞の検出を行った。

(3) 血液型不適合肝移植におけるドナー MHC 抗原特異的抗体産生 B 細胞の寛容の検討。血液型糖鎖抗原に対する寛容の現症を MHC にも拡大する目的で、MHC に対する抗体測定を行う。

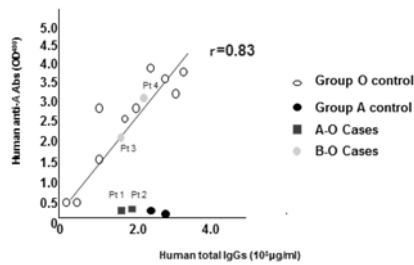
ABO 不適合肝移植にて抗 CD20 抗体

(Rituximab)、血漿交換等にて肝機能の非常に落ちているレシピエントの血液から単核球を分離して図 1 右の如 humanized-NOG を使用したモデルでドナー MHC (HLA-A, HLA-B, DR) で感作した場合のドナー MHC 抗原特異的抗体の測定 (ELISA および Flow PRA を用いた測定) を行う。

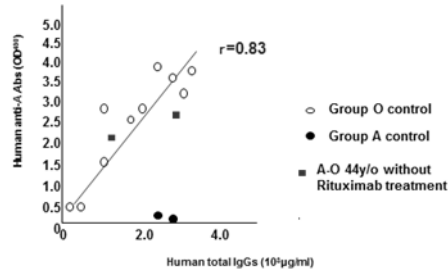
## 4. 研究成果

(1) ① 血液型不適合肝移植

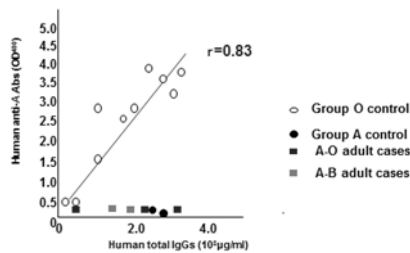
a) 乳児：感作による抗ドナー抗体産生なし。



b) 成人 (B 細胞除去療法なし。Intraportal infusio のみ): 感作により抗ドナー抗体産生



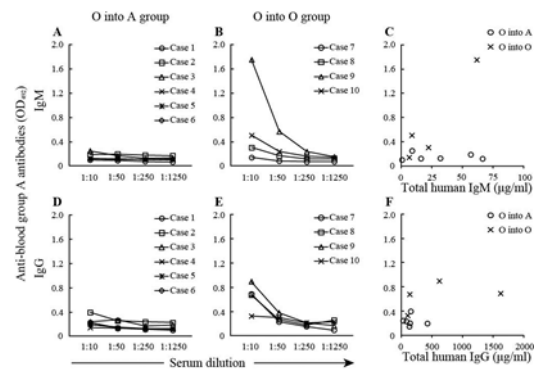
c) 成人 (Rituximab による B 細胞除去療法): 感作による抗ドナー抗体産生なし。



a), b), c) の追試の結果から乳幼児における未熟な B 細胞あるいは抗 CD20 抗体 (Rituximab) によって成熟 B 細胞を除去された成人においては、B 細胞の成熟の過程で臓器移植を行うことにより、その臓器特異的抗原に対して反応性を持つ B 細胞の特異的 elimination が誘導され、寛容が導かれることが更に強く推察された。また一方で、除去治療を受けていない成熟 B 細胞が多量の膜結合型抗原に暴露されると Intraportal infusion によって移植後の急性期を乗り切り、その結果成熟 B 細胞が無反応 (anergy) となることが強く推察された。

#### (1) ②血液型不適合骨髄移植

A, D は血液型不適合骨髄移植由来 B 細胞、B, E は血液型適合骨髄移植由来 B 細胞 (コントロール) を NOG マウスに注入して感作 B, E のコントロールは抗 A 抗体を産生するのに対して、A, D は抗 A 抗体を産生しない。



血液型不適合骨髄移植 (O→A) 症例においては O 型ドナーの骨髄はレシピエント臓器内で A 抗原に反応する B 細胞の elimination が起こり、レシピエント血液型 A に B 細胞の免疫寛容が誘導された可能性が強く示唆された。

(2) 血液型不適合肝移植においてドナー血液型反応 B 細胞の消去の確認。

① B 細胞の分離は Fluosphere bead を用いて 90%以上の分離が得られた。しかし O 型正常人の末梢血 B 細胞にも抗ドナー血液 (A) 型特異的抗体の存在が flow cytometry に detect できず、抗体の結合不良が考えられた。これは複数回の解析でいずれも detect できなかった。そのため移植後の抗ドナー血液 (A) 型反応性 B 細胞の消失を直接確認することはできなかった。

② ELISPOT assay を用いたドナー血液型特異的抗体産生細胞の検出。これも複数回の解析にて positive control の O 型正常人 B 細胞が抗 A 型抗体の産生を ELISPOT assay にて得られず、ドナー血液型特異的抗体産生 B 細胞の消失を証明することができなかった。

(3) 血液型不適合肝移植におけるドナー MHC 抗原特異的抗体産生 B 細胞の寛容の検討。

Rituximab による B 細胞除去療法を併用した ABO 不適合肝移植にてレシピエントの末梢単核球を分離して humanized-NOG を作成し、ドナー MHC (HLA-A, HLA-B, DR) で ex-vivo の感作を行う。現在のドナー MHC (HLA-A, HLA-B, DR) 特異的抗体を ELISA 法で測定を行う条件設定を行っているところである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1~6, 9, 11 は査読あり。

(1). Shinoda M, Tanabe M, Kawachi S, Ono Y, Hayakawa T, Iketani O, Kojima M, Itano O, Obara H, Kitago M, Hibi T, Matsubara K, Shimojima N, Fuchimoto Y, Hoshino K, Wakabayashi G, Shimazu M, Tanigawara Y, Kuroda T, Morikawa Y, Kitajima M, Kitagawa Y. Transplant Proc. 2012 Jun;44(5):1329-35.

(2). Fuchimoto Y, Morikawa N, Kuroda T, Hirobe S, Kamagata S, Kumagai M, Matsuoka K, Morikawa Y.

Vincristine, actinomycinD, cyclophosphamide chemotherapy resolves Kasabach-Merritt Syndrome resistant to conventional therapies.

Pediatr Int. 2012 Apr;54(2):285-7. doi: 10.1111/j.1442-200X.2011.03414.

(3). Hibi T, Tanabe M, Hoshino K, Fuchimoto Y, Kawachi S, Itano O, Obara H, Shinoda M, Shimojima N, Matsubara K, Morikawa Y, Kitagawa Y.

Cyclosporine A-based immunotherapy in adult living donor liver transplantation: accurate and improved therapeutic drug monitoring by 4-hr intravenous infusion. Transplantation. 15;92(1):100-5, 2011.

(4). Fuchimoto Y, Mori M, Takasato F, Tomita H, Yamamoto Y, Shimojima N, Hoshino K, Koinuma G, Morikawa Y.

A long-term survival case of tracheal agenesis: management for tracheoesophageal fistula and esophageal reconstruction.

Pediatr Surg Int. 2011 Jan;27(1):103-6.

(5). Fuchimoto Y, Tomita H, Takasato F, Yamamoto Y, Mori M, Shimojima N, Hoshino K, Hokuto I, Ikeda K, Morikawa Y.

Survival of a congenital ileal atresia infant weighing 359 g at birth after laparotomy.

Pediatr Int. 2011 Feb;53(1):127-8

(6). 富田紘史, 下島直樹, 有末篤弘, 高里文香, 森昌玄, 山本裕輝, 瀧本康史, 星野健, 津崎晃一, 森川康英: 総排泄腔奇形根治術後遠隔期に発症し、診断に苦慮した慢性腹痛・腹壁痛: ACNES (abdominal cutaneous nerve entrapment syndrome) の 1 例. 日本小児外

科学会雑誌 47(6) 948-952. 2011. 10.

(7). 富田紘史, 星野健, 有末篤弘, 高里文香, 森昌玄, 山本裕輝, 下島直樹, 瀧本康史, 田波穰, 森川康英: 【小児における消化管機能障害の診断と治療】小児慢性便秘における evoked-HAPC 測定の有用性. 小児外科 (0385-6313) 43(6) 606-611. 2011. 06.

(8). 上野滋, 森川康英, 岩井潤, 奥山直樹, 越永従道, 鈴木則夫, 高松英夫, 田口智章, 瀧本康史, 松藤凡, 八木誠, 直腸肛門奇形研

究科 JASGAP 委員会: 患者の QOL に与える影響を考慮した新たな排便機能評価試案の検討(第 1 報). 日本小児外科学会雑誌 47(1) 35-46. 2011. 02.

(9). Yamada Y, Hoshino K, Shimojima N, Shinoda M, Obara H, Kawachi S, Fuchimoto Y, Tanabe M, Kitagawa Y, Morikawa Y.

Idiopathic hypereosinophilic syndrome in a case with ABO-incompatible liver transplantation for biliary atresia complicated by portal vein thrombosis.

Pediatr Transplant ;14(5):e49-53, 2010.

(10). 上野滋, 森川康英, 岩井潤, 奥山直樹, 越永従道, 鈴木則夫, 高松英夫, 田口智章, 瀧本康史, 松藤凡, 八木誠: 【高位鎖肛 基礎から臨床の最前線まで】 新たな排便機能評価試案について. 小児外科 42(11)1145-1150. 2010. 11

(11). 山本裕輝, 星野健, 高里文香, 富田紘史, 森昌玄, 下島直樹, 瀧本康史, 中原理紀, 茂松直之, 栗林幸夫, 森川康英: 高アンモニア血症と門脈異常

小児科 51(3) : 341-347, 2010

[学会発表] (計 10 件)

(1). Fuchimoto Y, Tanabe M, Hoshino K, Yamada Y, Kawachi S, Itano O, Obara H, Kitagawa M, Shinoda M, Shimojima N, Matsubara K, Kitagawa Y, Ohdan O, Kuroda T: Recurrence of Primary Sclerosing Cholangitis after Living Donor Liver Transplantation and Roles of B-Cell Depletion. American Transplant Congress, 2012. 6. 4 Boston, MA, USA.

(2). 瀧本康史: 小児臓器移植の未来—ドナー特異的免疫寛容の誘導—. 第 49 回日本小児外科学会総会 2012. 5. 16. 横浜.

(3). 瀧本康史: ドナー特異的免疫寛容の誘導—operational tolerance から mixed chimerism まで—. 第 47 回日本移植学会総会 2011. 11. 6. 仙台

(4). Fuchimoto Y, Yamada Y, Hoshino K, Tanabe M, Kawachi S, Kitagawa Y, Ohdan H, Morikawa Y.

Mechanism of donor-specific B-cell tolerance after ABO-incompatible infant liver transplantation: International Surgical Week, 2011. 8. 30 Yokohama, JA.

(5). Fuchimoto Y, Hoshino K, Tanabe

M, Yamada Y, Hibi T, Shimojima N, Shinoda M, Hideaki O, Kawachi S, Ohdan H, Kitagawa Y, Morikawa Y.

Living- Related partial liver transplant for primary sclerosing cholangitis (PSC): post-transplant recurrence and preventative measures. 23th International Congress of the Transplantation Society. 2010, 8. 17 Vancouver, CA.

(6). 瀧本康史、田邊 稔、星野 健、山田洋平、松原健太郎、下島直樹、篠田昌宏、北郷実、尾原秀明、板野 理、河地茂行、北川雄光、黒田達夫. 原発性胆管炎に対する生体部分肝移植後の再発とB細胞除去の役割. 第29回肝移植研究会 2011. 7. 22. 仙台

(7). Fuchimoto Y, Yamada Y, Tanabe M, Hoshino K, Matsubara K, Shimojima N, Shinoda M, Obara H, Itano O, Kawachi S, Kitagawa Y, Ohdan H, Morikawa Y: Mechanism of donor-specific B-cell tolerance after ABO-incompatible infant liver transplantation. : 6<sup>th</sup> Congress of the International Pediatric Transplant Association 2011. 6. 26, Montreal, CA.

(8). 瀧本康史, 星野健, 今留謙一, 大隅朋夫, 嶋田博之, 富田紘史, 高里文香, 山本裕輝, 森昌玄, 下島直樹, 日比泰三, 篠田昌弘, 尾原秀明, 河地茂行, 田辺稔, 北川雄光, 向井万起夫, 森川康英: 小児移植医療 小児肝移植後リンパ増殖症(PTLD)に対する FACS を用いた迅速な診断とリツキシマブの治療適応の検討. 第47回日本小児外科学会学術集会 2010. 6. 19, 名古屋

(9). 瀧本康史, 絵野澤伸, 梅澤明弘, 林奂, 森川康英: 骨髄-臓器 composite graft によるドナー特異的免疫寛容誘導 骨髄-臓器 composite graft の作製. 第47回日本小児外科学会学術集会 2010. 6. 19, 名古屋

(10). 瀧本康史, 星野健, 田邊稔, 山田洋平, 日比泰造, 下島直樹, 篠田昌宏, 尾原秀明, 河地茂行, 北川雄光, 森川康英. 原発性硬化性胆管炎(PSC)に対する生体肝移植後の再発とその対策法—HLA 相同性ならびにB細胞除去の役割—. 第110回日本外科学会定期学術集会, 2010. 4. 10, 名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀧本 康史(FUCHIMOTO YASUSHI)  
慶應義塾大学・医学部・共同研究員  
研究者番号: 40219077

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし