

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08632

研究課題名（和文）ヒト化マウスによるドナー特異的抗体産生免疫プロファイリングの解明と個別化医療

研究課題名（英文）Immunoprofiling of donor-specific antibody production by humanized mice and personalized medicine

研究代表者

野田 貴幸（NODA, TAKAYUKI）

愛知医科大学・大学病院・薬剤師

研究者番号：50817088

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では慢性抗体型関連拒絶反応の制御を行うため、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を行っている。患者細胞の場合では血中と同様の抗体が検出されたため、メモリー細胞の存在が重要と考えられた。また、GVHDの発症抑制にはナイーブT細胞の除去が効果的であった。しかし、健康人細胞の場合、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）：In this study, we generated an HLA antibody-producing humanized mouse model and analyzed DSA-producing B cells for suppression of chronic antibody type-related rejection. The presence of memory cells was considered important because the same antibodies were detected in the patient cells as in the blood. Furthermore, removal of naive T cells was effective in suppressing the development of GVHD. However, antibody production in healthy human cells is not stable, and a mouse model has not yet been established.

研究分野：移植免疫

キーワード：HLA ヒト化マウス B細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎臓移植は移植手術の向上、免疫抑制薬の開発により、年代ごとにその生着率の成績は改善されている。日本移植学会の臓器移植ファクトブック 2022 では、生体腎移植、献腎移植のいずれにおいても、生存率・生着率は年代とともに改善しており、特に 2001 年以降は良好な成績です。生存率に関しては、生体腎では 1983～2000 年で 1 年生存率 97.1%、5 年生存率が 93.6%でしたが、2010～2020 年では 99.2%、96.7%に上昇している。献腎においても同様に 1983～2000 年の 92.6%、86.0%から 2010～2020 年では 97.8%、92.8%と上昇がみられている。生着率についてはさらに伸び幅が大きく、生体腎では 1983～2000 年で 1 年生着率 93.0%、5 年生着率が 81.9%でしたが、2010～2020 年では 98.7%、93.1%に上昇しており、献腎では 1983～2000 年の 81.6%、64.8%から 2010～2020 年では 95.9%、87.9%へと著明に上昇している。

生体腎移植、献腎移植ともに成績が向上した理由として、1980 年代以降に免疫抑制薬であるカルシニューリン阻害薬が臨床的に使用可能となったことが最大の要因である。最近では、ミコフェノール酸モフェチルやバシリキシマブ、エベロリムスやリツキシマブといった新しい免疫抑制薬も導入されたことにより成績がさらに向上している。

しかし、これらの新規の薬剤が投入されているにも関わらず、ここ数年の劇的な改善傾向に至っていない。

2. 研究の目的

免疫抑制剤の進歩により腎移植では 5 年生着率が 95%となった現在、ここ数年の長期生着については改善傾向にない。その要因として、抗体関連型拒絶反応 (ABMR) が考えられている。特に慢性抗体関連型拒絶反応は移植腎喪失の重大な一因となっている。原因であるドナー特異的抗 HLA 抗体 (Donor HLA Specific Antibody: DSA) の制御は、世界中で取り組まれている課題である。de novo DSA 産生後は CAMR の治療は困難であり、産生メカニズムの解明と産生 B 細胞の同定を行い、免疫応答の初期の段階での検出、制御法を開発する必要があった。

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。

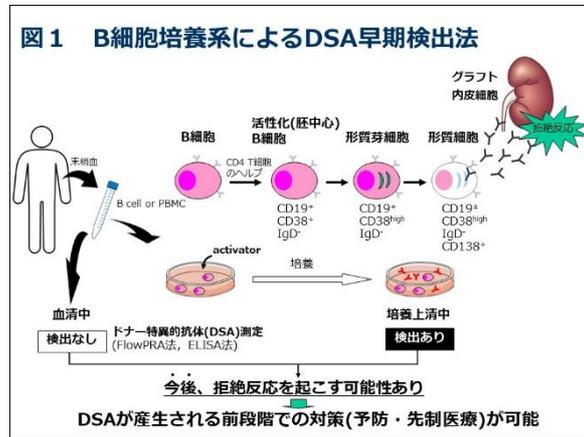
本研究では慢性拒絶反応の早期診断を可能とする移植後の DSA モニタリング法の確立と DSA 産生 B 細胞の同定・制御を目的として、i) 末梢血単核球からの DSA 早期検出 および ii) ヒト化マウスを用いて体内での DSA 産生 B 細胞の挙動解析 から新たな治療展開を提示する知見を得られる検証を行う。

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 (図 1)

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

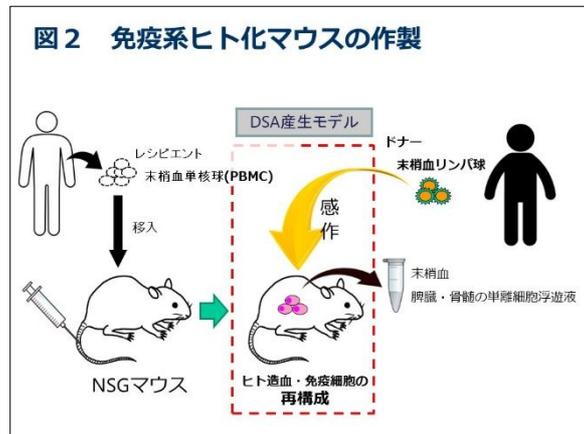
換を行い、最終的に 8 日間培養した。B 細胞の分化はフローサイトメトリーで確認し、培養上清中の IgM、IgG 濃度は ELISA 法で、HLA 抗体の特異性を FlowPRA と Luminex 法で測定した。



(2) HLA 抗体産生ヒト化マウスの作製 (図 2)

T, B, NK 細胞の欠失した重度免疫不全マウス(NSG)に、腹腔内にレシピエント 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 型の異なる健康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。さらに、このヒト化マウス血清を Luminex 法により HLA 抗体の定量を行った。



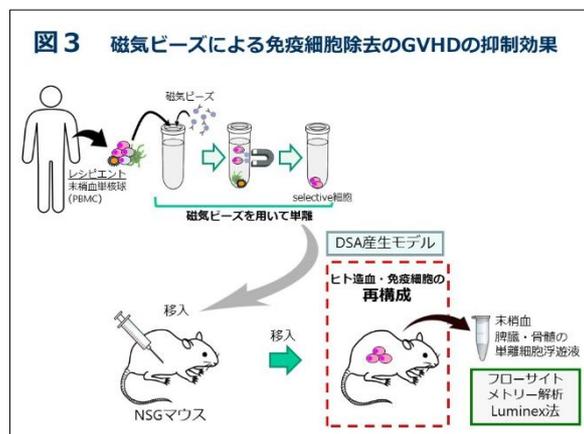
(3) G-CSF 投与の免疫細胞への影響

マウスの体重と脾臓の大きさの相関を知るために、犠死後、マウス個体の重量および脾臓の重量、面積、長径の測定を行った。また、健康人 PBMC 1×10^7 個を NSG マウスに移入した日を 0 日目として、4 日目までの 5 日間、G-CSF (顆粒球コロニー形成刺激因子) を $4\mu\text{g}$ を投与した。投与後、7 日目 (1w 群) および 14 日目 (2w 群) に犠死し、同様に測定を行った。

(4) 磁気ビーズによる免疫細胞除去の GVHD の抑制効果 (図 3)

移植片対宿主病 (GVHD) を早期に発症し、仮に HLA 抗体が産生される以前に死亡する可能性があったため、細胞移入後の生存期間の延長も課題となった。そこで、健康人 PBMC からナイーブ T 細胞あるいはメモリー T 細胞を除去した末梢血単核細胞を移植して生存期間を評価した。

移入する細胞数は、 1×10^7 個 (多数投与群) と 3×10^6 個 (少数投与群) として、比較検討した。



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

末梢血より PBMC を精製し、培養により形質細胞まで分化させるという方法により検討が行ってきた。B 細胞の分化に関しては、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 においても IgG が検出された。

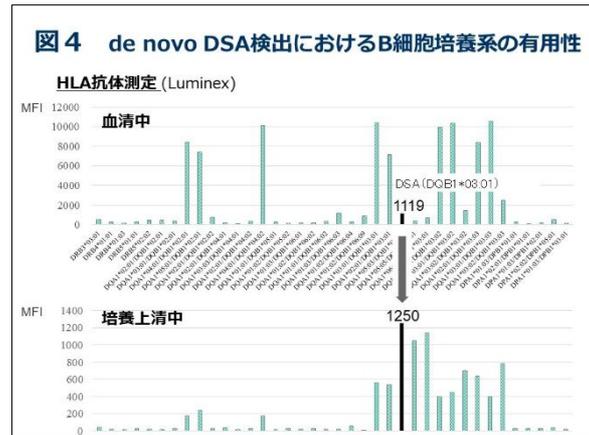
これらの結果を基に、HLA 陽性患者の検体で検討を行った。HLA 抗体の存在を確認するために、FlowPRA を行い、さらにより検出感度のよい Luminex 法にて詳細な確認を行った。

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

では 13 例中 7 例で、Class においては 21 例中 7 例で検出された。カットオフ値は血清で MFI 1000、培養上清の場合、MFI 100 とした。

しかし、繰り返しの培養系の改良により、培養上清中の HLA 抗体の検出量は増加したものの、検出率に著しい向上はみられな

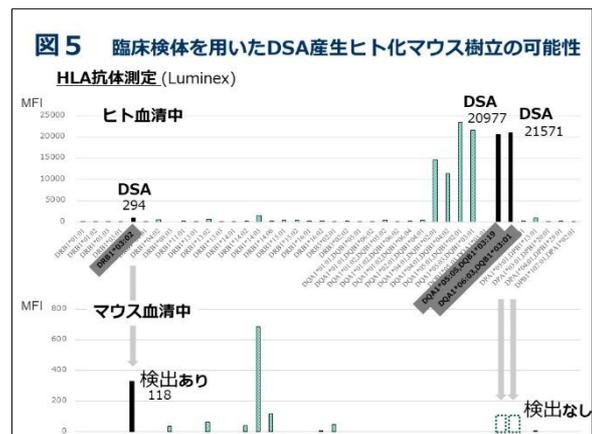
かった。すべてのメモリー細胞が末梢血中に存在するわけではなく、リンパ節等に入り込んでいることが示唆された (図 4)。



(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 型の異なる健常人 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。

ヒト PBMC を腹腔内投与し、ヒト細胞の生着は flow cytometry で確認した。マウス末梢血中のヒト CD3 陽性細胞が著増し、GVHD 発症との関連を認めた。移植患者 PBMC 移入によりヒト免疫細胞の再構築が確認されたマウスにおいて、血清中 DSA と同様のアレルが検出された (図 5)。その一方で、HLA 型の異なる健常人 PBMC で感作したところ、全例でヒト IgG 抗体が検出された。その一部は、DSA であったが、多くは nonDSA であった。また、複数回、検討を行ったが、再現性が乏しかった。



これらの結果から移植患者 PBMC 中のメモリー細胞の存在が重要であると考えられた。健常人の PBMC により DSA 産生ヒト化マウスの作製に当たっては、一部 HLA 抗体が検出されたものの、産生量も少なく作製方法の見直しが必要となった。

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。

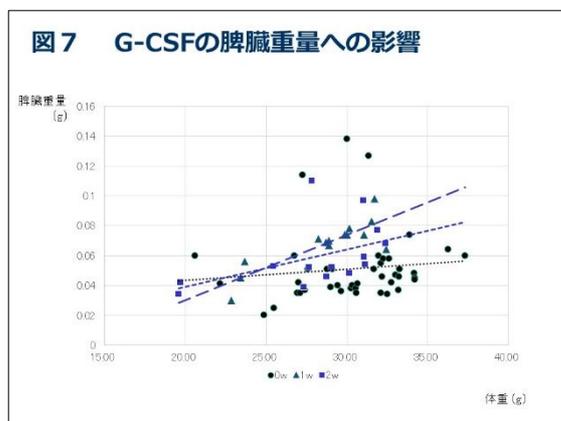
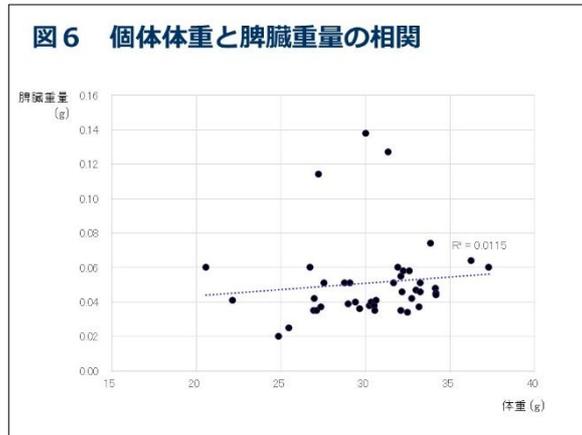
(3) G-CSF 投与の免疫細胞への影響

G-CSF は骨髄中で感染防御に重要な役割を担う好中球のもとになる細胞（前駆細胞）の増殖を促し、好中球が増えるのを助ける。また、骨髄の中にいる造血幹細胞を血液中に放出させる効果もある。

マウス体内でヒト免疫細胞の再構築が行われるためには、抗原提示に關与する多くの免疫細胞が必要となる。そこで、G-CSF による移入ヒト細胞への影響を多くの免疫細胞が滞留する脾臓を用いて検討した。

マウス個体体重と脾臓の重量は正の相関

を認めた（図 6）。また、G-CSF の投与により脾臓は肥大を認め、それに伴い T 細胞の著増が見られた。この肥大は時間の経過により、増大する傾向があったが、投与後、10 日前後で多くのマウスの死亡が観察された。T 細胞が著増していたことから、GVHD の關与が疑われた（図 7、8）。



(4) 磁気ビーズによる免疫細胞除去の GVHD の抑制効果

GVHD は PBMC 移植後の個体で多く発生し、合併症・死亡の主たる原因となっており、重症 GVHD への移植片中のナイーブ T 細胞の關与が示唆されている。仮に HLA 抗体が産生される以前に死亡する可能性があったため、細胞移入後の生存期間の延長も課題となった。そこで、移入細胞数を変えて生存期間の観察を行った。

PBMC の少数投与群では生存期間 41.2 ± 40.1 (n=6) であったのに対して、多数投与群では 20.0 ± 7.4 (n=5) であった。細胞数依存的に生存期間は短くなることを見出した。

次に、PBMC からナイーブ T 細胞を除去した場合は、少数投与群では 61.3 ± 30.6 (n=8) であったのに対して、多数投与群では 49.0 ± 23.0 (n=5) であった。ナイーブ T 細胞のみを、投与した群 (3×10^6 個) では 45.3 ± 15.3 (n=3) であった。

ナイーブ T 細胞を除去した場合、PBMC を移入した際に比べて、1.5 倍の生存期間が延長した。

また、PBMC からメモリー T 細胞を除去した場合は、少数投与群では 57.2 ± 24.9 (n=5) であったのに対して、多数投与群では 20.0 ± 7.4 (n=5) であった。

これらの結果はナイーブ T 細胞を除去し、メモリー T 細胞を残す移植片エンジニアリング手法により、GVHD の発生が非常に低く抑えられることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	小林 孝彰 (KOBAYASHI TAKAAKI) (70314010)	愛知医科大学・医学部・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