

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号： 15401

研究種目： 挑戦的萌芽研究

研究期間： 2011～1012

課題番号： 23658093

研究課題名（和文） 永続投与のいない「夢の21世紀型免疫抑制剤」創製への挑戦

研究課題名（英文） Challenges towards the generation of the dream immunosuppressant for the 21st century without permanent medication

研究代表者

河本 正次 (KAWAMOTO SEIJI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号： 90294537

研究成果の概要（和文）：

臓器移植において免疫抑制剤は必須であるが現行薬には永続投与の必要性や副作用の問題がある。本研究にて研究代表者は寛容肝移植モデルにおいて誘導される免疫抑制抗体（anti-H1抗体）の作用機序解明と *in vivo* 薬理作用の実証を試みた。その結果、本抗体が直接 T 細胞に作用して免疫抑制作用を示すこと、また、その作用が制御性 T 細胞依存性および非依存性の機序にて発揮されることを発見した。更に研究代表者は、本抗体がラット心移植モデルのグラフト生着を延長させることも示した。

研究成果の概要（英文）：

Immunosuppressant is essential for transplantation, but current drug has problems such as the need of permanent medication or the risk of fatal side effects. In the present study, I sought to elucidate the mode of action of immunosuppressive antibody (anti-H1 antibody) induced in a rat model of tolerogenic liver transplantation, and demonstrate its therapeutic efficacy *in vivo*. Here I found that the immunosuppressive anti-H1 antibody acted directly on T cells to exert its immunosuppressive activity, and that the anti-H1 antibody suppressed T cell activation in regulatory T cell dependent- and -independent mechanisms. I also showed that the anti-H1 antibody prolonged allograft survival in a rat model of heterotopic heart transplantation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：拒絶反応、制御性 T 細胞、免疫抑制抗体

1. 研究開始当初の背景

移植医療において免疫抑制剤は必要不可欠であるが、社会復帰後も一生永続投与せねばならない点が患者への大きな負担である。現在、国内外でも拒絶反応を担う白血球上の副刺激分子の働きを阻害する抗体医薬などの創薬研究が進んでいるが、これらは効果が一過性で通常の免疫応答も抑えてしまうため、現行薬剤と同様に永続投与と副作用の課

題が大いに懸念される。また iPS 細胞の発見は拒絶反応のない移植医療への夢を切り拓いたが、本細胞から自己臓器を作るには長い研究年月が必要である。つまり、現行医療に革新と福音をもたらすのは、単回投与で安全に臓器生着を誘導しうる新型免疫抑制剤の登場である。

ある種のラット同所性肝移植モデルでは、臓器の自然生着と血中への免疫抑制因子の発現誘導が起こりうること、更に同免疫抑制

因子を含むラット血清を一回術前投与しただけで、副作用なく臓器移植が可能であるとの知見 (*Nature* 292, 840, 1981 他) が得られていた。これらの証拠は、同モデルの血中に副作用なしに拒絶反応を回避させる液性因子が発現誘導されていることを強く示唆するものであるが、その仕組みや当該免疫抑制因子の実体は長らく不明であった。

研究代表者はこの拒絶反応抑制因子の単離・同定に成功し、ヒストン H1 に対する特異抗体であることを発見した (*Transplantation* 77, 1595, 2004)。更に研究代表者は、著明な免疫抑制活性を有する抗ヒストン H1 抗体を作製することにも既に成功しており (*J. Immunol.* 182, 4282, 2009 他)、同抗体を基調とした創薬応用研究の展開に向けた基盤も整備されつつある。

2. 研究の目的

本研究では、生体に元来備わっている拒絶反応を回避する仕組みを応用し、一度きりの投与で安全かつ効果的な臓器移植を実現させる「夢の 21 世紀型免疫抑制剤」の創製に挑戦すべく、上記免疫抑制抗体 (anti-H1 抗体) の薬効試験を実施すると共に、その拒絶反応抑制メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) anti-H1 抗体の薬理作用を規定する標的細胞の検索および免疫抑制作用機序の解析

anti-H1 抗体の精製標品は、同抗体産生ハイブリドーマの無血清培養上清より抗体画分を 50% 硫酸沈殿により分画後、これをヒストン H1 固定化カラムによるイムノアフィニティークロマトグラフィーに供することによって作製された。

本抗体の免疫抑制活性は BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウス由来の脾細胞 (または BALB/c マウス脾臓由来 CD11c⁺ 精製樹状細胞と C57BL/6 マウス脾臓由来の精製 T 細胞) を用いたアロ混合リンパ球反応系に供することによって検証された。本抗体の活性化 T 細胞に対する免疫抑制活性の検討には C57BL/6 マウス脾臓由来精製 T 細胞を固層化 anti-CD3 抗体および anti-CD28 抗体にて架橋刺激する培養系が用いられた。

精製 T 細胞からの制御性 T 細胞サブセットの精製および除去は anti-CD4 抗体および anti-CD25 抗体固定化磁気ビーズを用いたマグネティックセルソーティングにより行われた。制御性 T 細胞数の測定は anti-CD4 抗体および anti-Foxp3 抗体の 2 重染色によるフローサイトメトリーにより行われた。制御

性 T 細胞サブセットの免疫抑制活性は、C57BL/6 マウス由来 fresh 脾細胞の anti-CD3 抗体刺激による T 細胞活性化系に同サブセットを添加することにより評価された。

(2) anti-H1 抗体の *in vivo* 移植モデルにおける薬効試験

LEW ラットに anti-H1 抗体を予め投与したあと、本個体に DA ラット由来の心臓を異所性に移植した。グラフトの生着は心臓の拍動の有無により確認し、心停止が起こった時点で臓器が拒絶されたものと判断した。

(3) 肝移植患者における anti-H1 抗体価の動態追跡

生体肝移植患者の術後短期および長期における anti-H1 特異的 IgG 抗体価を酵素抗体法 (ELISA) により追跡した。検体・時間軸ごとにおける同抗体価は当該血中における総 IgG 量 (サンドイッチ ELISA により定量) によって標準化された値を採用することとした。

4. 研究成果

(1) anti-H1 抗体の拒絶反応抑制活性を規定する標的細胞の同定

本抗体が T 細胞に作用して免疫抑制作用を発揮しうるとの先行知見に鑑み、その活性化 T 細胞に対する効果を検証した。その結果、本抗体は T 細胞と樹状細胞のみからなるアロ混合リンパ球反応ならびに T 細胞抗原受容体架橋刺激に伴う精製 T 細胞の活性化をいずれも著明に抑制することがわかった。興味深いことに anti-H1 抗体による T 細胞活性化抑制機序にはその抗体濃度により二相性が観察され、sub-optimal dose における抑制作用の発揮には制御性 T 細胞が必要であること、一方、high dose においては本抗体が Treg 以外の conventional T 細胞に直接作用して T 細胞抗原受容体シグナル伝達経路を負に調節することにより、その活性化ならびに IL-2 産生を抑制していることが判明した。

また、前者の制御性 T 細胞依存的な免疫抑制作用の発揮にも conventional T 細胞の存在が必要であることがわかった。すなわち、本抗体の制御性 T 細胞依存性ならびに非依存性の免疫抑制作用を担う主要な標的細胞はいずれも conventional T 細胞であることが明らかとなった。

(2) anti-H1 抗体の制御性 T 細胞依存性免疫抑制作用機序の解析

anti-H1 抗体の作用濃度に応じた制御性 T 細胞依存性ならびに非依存性の免疫抑制経路のうち、制御性 T 細胞依存性の免疫抑制作用につき更なる詳細なメカニズムの解明を

試みた。その結果、anti-H1 抗体は conventional T 細胞を介して制御性 T 細胞の免疫抑制機能を増強させていること、その際に制御性 T 細胞の細胞数増加は認められないこと、また、当該制御性 T 細胞の機能亢進発揮には本抗体による conventional T 細胞への共刺激に加えて、同細胞上の T 細胞抗原受容体からの架橋シグナルも必要であることが判明した。

以上の結果から、anti-H1 抗体の制御性 T 細胞依存的な免疫抑制メカニズムとして、1) conventional T 細胞への抗原特異的免疫応答シグナルに付随した anti-H1 抗体からの共刺激シグナルの供給、2) anti-H1 抗体の共刺激を受けた活性化 conventional T 細胞から制御性 T 細胞への何らかの bystander シグナルの伝達 (例: サイトカイン等の液性因子や両細胞間の cell to cell contact など)、3) conventional T 細胞からの正の刺激による制御性 T 細胞の免疫抑制機能亢進、という一連の negative feedback loop の存在が推察された。

上記のモデルは抗原特異的 T 細胞応答の負の制御あるいは抗原特異的な T 細胞トレランスの誘導における全く新たなメカニズムを提案するばかりでなく、制御性 T 細胞応答の上方制御に液性自己免疫応答のクロストークが関与しているという点を示した上でも斬新である。更に本モデルは、現行薬とは薬理学的作用点が異なる次世代型免疫抑制剤の創製に繋がりうる創薬ターゲットを提供している点でも極めて有用である。

(3) anti-H1 抗体の *in vivo* 移植モデルにおける薬効試験

anti-H1 抗体をラットの異所性心移植モデル (短期に急性拒絶が必ず起こるモデル) に予防的に投与したところ、有意な心グラフトの生着延長効果が認められた。この結果から本抗体が *in vivo* においても実際に薬理作用を発揮することが示された。

今後の展望として本抗体がラットの同所性肝移植モデルにおいてもグラフトの生着延長をもたらすか否かを検証することが重要である。特に同モデルの術後急性拒絶期における anti-H1 抗体の集中投与により、ラット寛容肝移植モデルにおいて認められる所見、つまり、「anti-H1 抗体価の一過性上昇に伴う急性拒絶の回避ならびにグラフトの自然生着」を誘導しうる可能性については興味のもたれるところであり、これは本抗体の創薬展開を標榜する上でも検討すべき課題である。

(4) 肝移植患者における anti-H1 抗体価の動態変化

anti-H1 抗体の臨床展開に向けた端緒とし

て、生体肝移植施行患者における本抗体価の動態追跡を試みた。その結果、術後短期 (1-4 週) の症例においてラットの自然生着肝移植モデルにおいて見られる本抗体の誘導様式と同様の表現型、すなわち、術後急性拒絶期において anti-H1 抗体価の一過性誘導を示す症例が認められた。当該症例において将来的にラット自然生着モデルと同様、免疫抑制剤なしにグラフトが生着するような長期的安定が認められる否かを継続追跡することは、anti-H1 抗体価の予後を判断する新規バイオマーカーとしての有用性を見極める上で大変意義深い。

一方、術後長期を経過した患者においては anti-H1 抗体価が有意に上昇している症例、あるいは逆に術前より抗体価が低下している症例、の 2 つのパターンに大別できることが明らかとなった。研究代表者は以前の研究で免疫抑制剤を中止したあと、そのまま drug free となった生体肝移植症例における anti-H1 抗体価の上昇を観察しており (*Transplantation* 83, 1122, 2007)、この結果は本抗体価が免疫抑制剤中止の新規バイオマーカーとしても有用である可能性を示唆するものである。上記前者の anti-H1 抗体価の上昇が見られた症例群においても免疫抑制剤を中止できるような永続的免疫寛容状態が導入されているか否かを検討することも興味深い今後の課題である。

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 3 件)

1. Takaoka Y., Kawamoto S., Katayama A., Nakano T., Yamanaka Y., Takahashi M., Shimada Y., Chiang K. C., Ohmori N., Aki T., Goto T., Sato S., Goto S., Chen C. L., Ono K. (2013) Unexpected T cell regulatory activity of anti-histone H1 autoantibody: its mode of action in regulatory T cell-dependent and -independent manners. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431: 246-252. (査読有り)
2. Nakano T., Lai C. Y., Goto S., Hsu L. W., Kawamoto S., Ono K., Chen K. D., Lin C. C., Chiu K. W., Wang C. C., Cheng Y. F., Chen C. L. (2012) Immunological and regenerative aspects of hepatic mast cells in liver allograft rejection and tolerance. *PLoS ONE* 7: e37202. (査読有り)
3. Goto S., Nakano T., Hsu L. W., Chiang K. C., Lai C. Y., Kawamoto S., Ono K., Chen K. D., Ohmori N., Goto T., Sato

S., Wang C. C., Jawan B., Cheng F. Y.,
Chen C. L. (2011) Autoimmunity and
liver transplantation immunology.
Curr. Trends Immunol. 12: 1-11. (査
読有り)

[学会発表] (計 1 件)

1. Takaoka Y., Kawamoto S., Katayama A.,
Nakano T., Takahashi M., Odawara S.,
Shimada Y., Chiang K. C., Ohmori N.,
Aki T., Goto T., Sato S., Goto S., Chen
C. L., Ono K. (2013) A unique T cell
regulatory role of anti-histone H1
autoantibody: its mode of action
through regulatory T cell-dependent
and -independent mechanisms. *The 13th
Federation of Clinical Immunology
Societies (FOCIS 2013)*, 27-30
June 2013, Boston, Massachusetts, USA,
accepted for presentation)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河本 正次 (KAWAMOTO SEIJI)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・
准教授
研究者番号：90294537

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：