

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 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659614

研究課題名（和文） B 細胞の分化・増殖機構に即した抗体関連拒絶反応制御法の開発

研究課題名（英文） Establishment of strategies to regulate antibody-mediated rejection on the basis of B cell differentiation biology

研究代表者 大段 秀樹 (OH DAN HIDEKI)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：10363061

研究成果の概要（和文）：現在、臓器移植成績の向上を阻む最大の課題は、抗体関連拒絶反応である。抗体関連拒絶反応は、組織適合性抗原(HLA)ペプチドや血液型抗原及び異種糖鎖抗原が標的になる。それぞれの抗原に応答する B 細胞は、特徴的なフェノタイプや分化機構を示し、免疫抑制剤の感受性も大きく異なる。本研究では、効率的なヒト B 細胞の *in vitro* 活性化・分化モデルおよびヒューマナイズドマウスを確立し、これを用いて抗体関連拒絶反応に有用である可能性のある免疫抑制剤や我々が独自に開発した抗 CD1d 抗体（抗体拒絶反応抑制剤：特願 2009-110887）の特異性と感受性を解析し、B 細胞の分化・増殖機構に即した新規抗体関連拒絶反応制御法を考案した。

研究成果の概要（英文）：Antibodies produced through the activation of T cell-dependent B-2 cells and independent B-1 cells are now appreciated as important mediators of acute and chronic rejection. It is important to suppress sufficiently both type of B cell activation for improvement of allograft survival. However, the sensitivity of B-1/B-2 cell differentiation to various immunosuppressants still remained to be elucidated. To address this issue, in the present study, we have established *in vitro* and *in vivo* B cell activation models, in which the differentiation to B-1a, B-1b, and B-2 cells can be induced. By use of those models, we have evaluate the sensitivity and specificity of various immunosuppressive drugs and anti-CD1d antibody newly developed by us to B cell activation.

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	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：外科学一般、移植外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：臓器移植、抗体関連拒絶反応、B 細胞、CD1d、血液型不適合

1. 研究開始当初の背景

現在、臓器移植成績の向上を阻む最大の課題は、抗体関連拒絶反応である。臓器移植における抗体関連免疫応答において、HLA 由来のペプチド抗原に反応する B 細胞は、T 細胞と接触しながらサイトカインの刺激を受け、増殖を繰り返しリンパ節に濾胞を形成し、イムノグロブリンクラス変換を経て抗体産生細胞へと分化する。一方、血液型や異種抗

原などの糖鎖に反応する B 細胞では、連続する糖鎖抗原が B 細胞受容体を架橋すると、T 細胞非依存性に活発な抗体産生が誘導される。これらの移植関連抗原に反応する B 細胞は、それぞれ分化機構や組織局在および薬剤感受性の異なる B 細胞亜群に属することを我々は解明した。すなわち、HLA ペプチド反応 B 細胞は CD19⁺CD11b⁺CD5⁻ B-2 細胞、血液型抗原反応 B 細胞は CD19⁺CD11b⁺

CD5⁺ B-1a 細胞、異種糖鎖 Gal や NeuGc 反応 B 細胞は CD19⁺CD11b⁺CD5⁻ B-1b 細胞に分類された (マウスとヒト B 細胞で共通)。

2. 研究の目的

抗体関連拒絶反応は、組織適合性抗原 (HLA) ペプチドや血液型抗原及び異種糖鎖抗原が標的になる。我々は、それぞれの抗原に応答する B 細胞が特徴的なフェノタイプや分化機構を示し、免疫抑制剤の感受性も大きく異なることをマウスモデルで解明した。本研究では、効率的なヒト B 細胞活性化・分化モデルおよびヒューマニズドマウスを確立し、これを用いて抗体関連拒絶反応に有用であると期待されているプロテアソーム阻害剤や我々が独自に開発した抗 CD1d 抗体 (抗体拒絶反応抑制剤: 特願 2009-110887、発明者: 大段秀樹、伊禮俊充) の特異性と感受性を解析し、B 細胞の分化・増殖機構に即した新規抗体関連拒絶反応制御法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

1. ヒト B 細胞活性化・分化 *in vitro* モデルの確立

B 細胞は、そのフェノタイプによって B-1 細胞 (CD5 の表出の強度によって B-1a と B-1b に分けられる)、B-2 細胞とサブクラスが分かれ、各々認識する抗原も異なる。B-1a, B-1b, B2 細胞はそれぞれ血液型糖鎖抗原、ウイルスや細菌由来の糖脂質抗原、ペプチド抗原を認識する。これらは活性化するメカニズムも異なっており、B-1 細胞は T 細胞非依存性の活性化経路で、B-1a 細胞は、連続する糖鎖抗原が B 細胞レセプターを架橋することによって活性化を促す。B-1b 細胞は、この糖鎖の架橋とともに、細菌などの刺激によって Toll-like レセプター (TLR) を介したシグナルがさらに入ることによって分化し活性化する。B-2 細胞は T 細胞依存性に活性化し、同一の MHC によって認識された T 細胞から産生される IL-4 などのサイトカイン刺激に加え、CD40 ligand を介したシグナルが入ることによって活性化が促される。以上の事を踏まえ、ボランティア末梢血 CD19⁺細胞を用い、以下の *in vitro* 分化モデルによって各細胞への分化誘導が成り立つかを検討した。

A) B-1a 細胞 (CD19⁺CD11b⁺CD5⁺) 分化誘導

B 細胞受容体 (BCR) の架橋 (cross-linking) により B-1a 細胞に分化することから anti-Human IgM 抗体 F(ab)₂ と rhIL-4 を添加したメディアウムで培養した。

B) B-1b 細胞 (CD19⁺CD11b⁺CD5⁻) 分化誘導

BCR の架橋と共に Toll-like receptor (TLR) シグナルが供給されると、B-1b 細胞への分化が促進される可能性が示唆されている。抗 IgM 抗体 F(ab)₂、IL-4

と共に LPS (TLR4 を刺激) あるいは、CpG (TLR9 を刺激) を添加し、B2 への分化誘導を試みた。

C) B-2 細胞 (CD19⁺CD11b⁻CD5⁻) 分化誘導

MHC class II と CD40 を架橋すると B-2 細胞に分化することから、マウス線維芽細胞にヒト CD40LB と BAFF を同時表出したフィーダー細胞とともに、抗 IgM 抗体 F(ab)₂ および IL-2、IL-4 の添加し培養を実施した。なお、A~C いずれの系においても B 細胞の分裂増殖の確認するために、あらかじめ CFSE 色素で B 細胞を染色し、その後フローサイトメトリーを用いて、解析を行った。

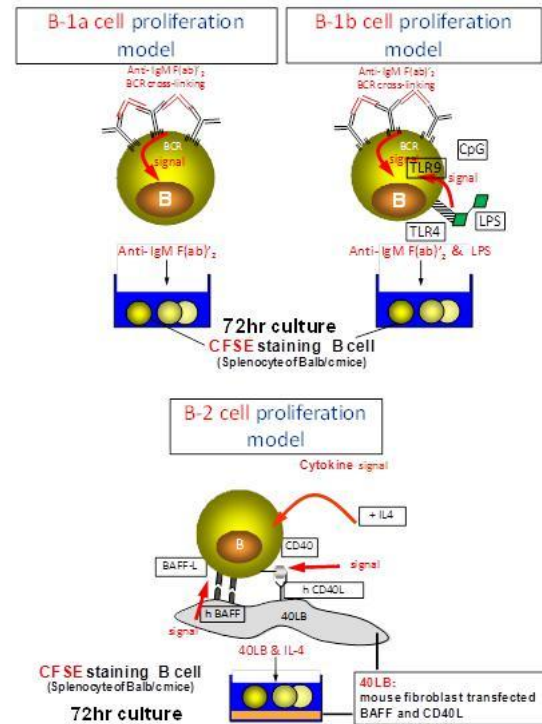


図 1. ヒト B 細胞活性化・分化 *in vitro* モデル
ヒト末梢血 B 細胞から CD19⁺リンパ球を単離し、上記の条件で分化を促した。

2. 抗 CD1d 抗体の各 B 細胞亜群への分化における感受性の解析

マウスをヒト血液型 A 赤血球で免疫すると血清抗 A 抗体 (IgM、IgG) の上昇を認めるが、抗マウス CD1d 抗体の投与により抗体価の上昇は完全に抑制可能であった。本研究では、ヒト B 細胞移入ヒューマニズドマウス *in vivo* モデルを用い、それぞれ抗ヒト CD1d 抗体を添加あるいは投与して、B 細胞分化・増殖あるいは抗体産生能を IgM および各 IgG サブクラス別に解析した。この場合、活発な抗体産生には NKT 細胞の存在を要する可能性があり、マウス内に CD3⁺CD56⁺ NKT 細胞フラクションを B 細胞と共に移入して解析した。

4. 研究成果

1. ヒト B 細胞活性化・分化 *in vitro* モデルの確立

B 細胞はそのフェノタイプによって B-1 細胞 (CD5 の表出の強度によって B-1a と B-1b に分けられる)、B-2 細胞とサブクラスが分かかれ、各々認識する抗原も異なる。今回の検討で、各誘導法いずれにおいても CD19⁺B 細胞の分裂増殖を認め、そのフェノタイプは、B-1a 細胞 (CD19CD5⁺)、B-1b 細胞 (CD19⁺CD5^{dim})、B-2 細胞 (CD19⁺CD5⁻) と特異的に誘導されていることがわかった (図 2)。

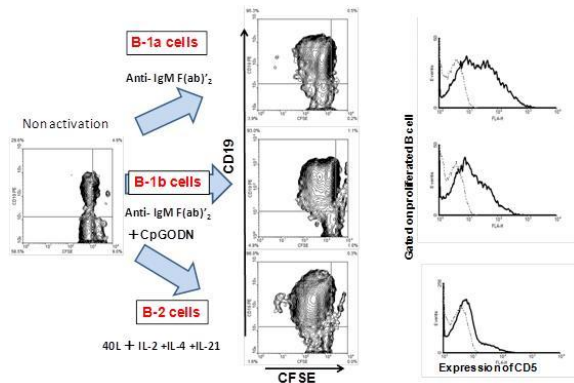


図 2. ヒト B 細胞活性化・分化 *in vitro* モデル
ヒト末梢血 B 細胞から CD19⁺リンパ球を単離し、各種分化条件で培養した後、フローサイトメーターでフェノタイプを解析した。

B-1a 細胞、B-1b 細胞、B-2 細胞それぞれの活性化系に各種免疫抑制剤を添加し、感受性を解析した結果、カルシニューリン抑制剤であるシクロスポリンとタクロリムスは、B-1a 細胞と B-1b 細胞への分化を臨床的濃度で抑制するが、B-2 細胞への分化には感受性がない事が判明した。また、エベロリムスはいずれの B 細胞亜群への分化も抑制し、特に B-2 細胞への分化を抑制することが確認された (図 3)。

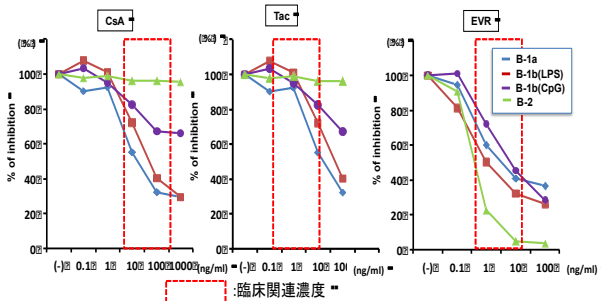


図 3. 各種免疫抑制剤の B 細胞亜群分化・増殖に対する感受性試験の結果。CSA:シクロスポリン、TAC:タクロリムス、EVR:エベロリムス

本結果から、血液型抗体の産生抑制予防にはカルシニューリン抑制剤が、HLA 抗体の産生予防にはエベロリムスの投与が有効であると考えられた。

2. 抗 CD1d 抗体の各 B 細胞亜群への分化における感受性の解析

1Gy の放射線照射を施した Non-obese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID)/ γ cnull1 マウスにヒト末梢血リンパ球 (20×10^6 個/mouse) を移入し、ヒューマナイズドマウスモデルを作製した。このマウスに抗ヒト CD1d 抗体 (CD1d42) またはコントロール抗体を投与した。その後、ヒト A 型赤血球で免疫し、抗 A 抗体価を測定した。抗ヒト CD1d 抗体は、A 抗原認識 B-1a 細胞の増勢を抑制し、抗 A 抗体の上昇を完全に抑制した。以上の結果は、抗 CD1d 抗体が血液型不適合移植における新規の免疫抑制薬となり得る可能性を示すものである。

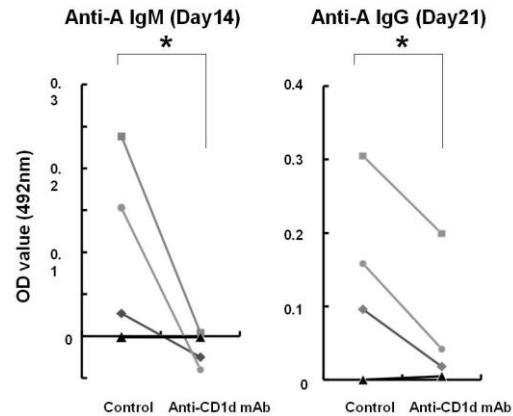


図 4. NOD/SCID)/ γ cnull1 マウスにヒト末梢血リンパ球 (20×10^6 個/mouse) を移入したヒューマナイズドマウスモデルを用いて、抗ヒト CD1d 抗体の抗体産生抑制効果を確認した。抗 CD1d 抗体は $500 \mu\text{g}/\text{mouse}$ をリンパ球移入後 7, 10 日目に投与した。

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 7 件)

1. 田澤宏文, 伊禮俊充, 大段秀樹. 糖鎖抗原に対する抗体産生を抑制する新薬の開発. 化学工業. 査読無. 63. 2012. 27-31.
2. 山下正博, 田澤宏文, 田中友加, 伊禮俊充, 五十嵐友香, 安部智之, 橋本慎二, 平田文宏, 森本博司, 寺岡義布史, 堀田龍一, 井手健太郎, 石山宏平, 尾上隆司,

- 田代裕尊, 大段秀樹. マウスB細胞 in vitro 活性化モデルにおける各種免疫抑制剤感受性. 今日移植. 査読無. 25. 2012. 236-238.
3. 田中友加, 大段秀樹. mTOR 阻害薬のT細胞・B細胞サブクラス別感受性解析. 今日移植. 査読無. 25. 2012. 504-509.
 4. 田澤宏文, 伊禮俊充, 五十嵐友香, 田中友加, 尾上隆司, 井手健太郎, 田原裕之, 番匠谷将孝, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 田代裕尊, 大段秀樹. 広島大学における ABO 不適合肝移植の現況と iNKT 細胞制御による特異的減感作療法の可能性. ABO 血液型不適合移植の新戦略-2011. 査読無. 2011. 48-56.
 5. 大段秀樹. ドナー特異的 B 細胞免疫応答の解析法. SURGERY FRONTIER. 査読無. 18. 2011. 79-83.
 6. Tanimine N, Ide K, Yamashita M, Tanaka Y, Igarashi Y, Banshodani M, Tazawa H, Basnet NB, Daskali M, Onoe T, Tashiro H, Ohdan H. Kinetics of cellular and humoral immunity in a successful case of positive crossmatch kidney transplantation: a case report. Transplant Proc. 査読有. 43. 2011. 2411-2414.
 7. Ide K, Tanaka Y, Onoe T, Banshodani M, Tazawa H, Igarashi Y, Basnet NB, Daskali M, Tashiro H, Ohdan H. Evidence for the immunosuppressive potential of calcineurin inhibitor-sparing regimens in liver transplant recipients with impaired renal function. J Transplant. 査読有. 2011. Epub 2011 Jun 6.
- [学会発表] (計 16 件)
1. 山下正博, 大段秀樹. 血液型免疫応答の解明を目的とした B 細胞解析. 第 48 回日本移植学会総会. 2012 年 9 月 20-22 日. 愛知.
 2. Ohdan H. ABO-Incompatible Transplantation Models. 24th International congress of the transplantation society. 15-19 July 2012. Berlin Germany.
 3. 山下正博, 大段秀樹. 血液型によって異なる B 細胞応答の解析. 第 30 回日本移植研究会. 2012 年 6 月 14-15 日. 福岡.
 4. Yamashita M, Ohdan H. Assesment of the Sensitivity of B-1/B-2 Cell Differentiation to Various Immunosuppressants Using the In Vitro B Cell Activation Model. 2-6 June 2012. Boston U.S.A.
 5. 田澤宏文, 山下正博, 田中友加, 五十嵐友香, 安部智之, 橋本慎二, 平田文宏, 森本博司, 寺岡義布史, 堀田龍一, 井手健太郎, 石山宏平, 尾上隆司, 田代裕尊, 大段秀樹. 各種免疫抑制剤の B 細胞に対する抑制効果について. 第 45 回日本臨床腎移植学会. 2012 年 2 月 1-3 日. 長野.
 6. 山下正博, 田澤宏文, 田中友加, 伊禮俊充, 五十嵐友香, 大段秀樹. 血液型 B 抗原と A 抗原に対する B 細胞免疫応答は相違する. 第 47 回日本移植学会総会. 2011 年 10 月 4-6 日. 仙台.
 7. 山下正博, 田澤宏文, 田中友加, 伊禮俊充, 五十嵐友香, 大段秀樹. 血液型 B 抗原と A 抗原に対する B 細胞免疫応答は相違する. 第 47 回日本移植学会総会. 2011 年 10 月 4-6 日. 仙台.
 8. 田澤宏文, 井手健太郎, 伊禮俊充, 五十嵐友香, 田中友加, 尾上隆司, 石山宏平, 田代裕尊, 大段秀樹. プロテアソーム阻害剤 (ボルテゾミブ) の B 細胞に対する免疫抑制効果の検討と既存抗体陽性腎移植における臨床応用の経験. 第 47 回日本移植学会総会. 2011 年 10 月 4-6 日. 仙台.
 9. 田澤宏文, 伊禮俊充, 田中友加, 五十嵐友香, 尾上隆司, 井手健太郎, 田原裕之, 番匠谷将孝, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 田代裕尊, 大段秀樹. 血液型抗原に対する特異的減感作療法の可能性. 第 18 回 ABO 血液型不適合移植研究会. 2011 年 7 月 30 日. 名古屋.
 10. 山下正博, 田澤宏文, 田中友加, 伊禮俊充, 五十嵐友香, 平田文宏, 安部智之, 橋本慎二, 森本博司, 寺岡義布史, 堀田龍一, 井手健太郎, 石山宏平, 尾上隆司, 大段秀樹. 血液型抗原に対する B 細胞免疫応答～A 型抗原と B 型抗原への応答は異なる～. 第 18 回 ABO 血液型不適合移植研究会. 2011 年 7 月 30 日. 名

古屋.

11. 山下正博, 田澤宏文, 田中友加, 伊禮俊充, 五十嵐友香, 平田文宏, 安部智之, 橋本慎二, 森本博司, 寺岡義布史, 堀田龍一, 井手健太郎, 石山宏平, 尾上隆司, 大段秀樹. 血液型 B 型に応答する B 細胞は血液型 A 型に応答する B 細胞と異なる. 第 29 回日本肝移植研究会. 2011 年 7 月 22-23 日. 仙台.
12. 田澤宏文, 伊禮俊充, 田中友加, 五十嵐友香, 尾上隆司, 井手健太郎, 番匠谷将孝, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 田代裕尊, 大段秀樹. iNKT 細胞制御による新たな血液型不適合移植に対する減感作法. 第 29 回日本肝移植研究会. 2011 年 7 月 22-23 日. 仙台.
13. 田澤宏文, 伊禮俊充, 田中友加, 五十嵐友香, 尾上隆司, 井手健太郎, 番匠谷将孝, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 田代裕尊, 大段秀樹. 血液型不適合移植後の長期経過における抗血液型反応寛容化の証明. 第 66 回日本消化器外科学会総会. 2011 年 7 月 13-15 日. 名古屋.
14. Yamashita M, Tazawa H, Irei T, Tanaka Y, Ohdan H. B-1b cells responding to blood group B carbohydrates are functionally distinct from B-1a cells responding to blood type group A carbohydrates. 30 Apr-4 May 2011. Philadelphia U.S.A.
15. Tazawa H, Irei T, Igarashi Y, Tanaka Y, Ohdan H. Differential susceptibility of B-cell subsets to proteasome inhibition: Bortezomib targets both IgM-producing B-1 like cells and IgG-producing plasma cells. 30 Apr-4 May 2011. Philadelphia U.S.A.
16. Tazawa H, Irei T, Igarashi Y, Tanaka Y, Ohdan H. Blockade of invariant TCR-CD1d interaction specifically inhibits antibody production against blood group carbohydrates . 30 Apr-4 May 2011. Philadelphia U.S.A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大段 秀樹 (OHDAN HIDEKI)
広島大学・医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号：10363061

(2) 研究分担者

田中 友加 (TANAKA YUKA)
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：90432666

尾上 隆司 (ONOE TAKASHI)
独立行政法人国立病院機構 (呉医療センター臨床研究部)・臨床研究部・室長
研究者番号：90549809

(3) 連携研究者

()

研究者番号：