

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 24 日現在

機関番号：32519

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012 年度

課題番号：23790094

研究課題名（和文）抗-ヒストン H1 ミモトープ抗体は免疫寛容を誘導する医薬品になるか？

研究課題名（英文）Evaluation of a novel anti-histone H1 monoclonal antibody generated from a peptide mimotope as an immunosuppressant for organ transplantation.

研究代表者

島田 弥生（SHIMADA YAYOI）

城西国際大学・かずさ創薬研究センター・研究員

研究者番号：70439024

研究成果の概要（和文）：

本研究では、抗-ヒストン H1 ミモトープモノクローナル抗体（SSV mAb）が免疫寛容を誘導する医薬品になりうるかどうか実験動物を用いて評価し、その免疫抑制メカニズムを解明することを目的とした。SSV mAb は IL-2 産生を抑制することなくラット混合リンパ球反応を抑制した。SSV mAb は 3 つのラット脾細胞表面抗原を認識した。ラット異所性心移植モデルへの SSV mAb の投与は急性拒絶反応を抑制しなかった。この結果から、SSV mAb は *in vivo* において免疫抑制剤として機能しないと結論する。

研究成果の概要（英文）：

The purposes of this study were to evaluate a novel anti-histone H1 monoclonal antibody (SSV mAb) generated from a peptide mimotope as an immunosuppressant for organ transplantation using experimental animals and to elucidate the mechanism of immunosuppression by SSV mAb. SSV mAb suppressed mixed lymphocyte reaction using rat splenocytes in a way that is independent of IL-2. SSV mAb recognized three Cell surface antigens on rat splenocytes. Treatment with SSV mAb did not prevent acute rejection in heterotopic heart transplanted rats. From this result, I conclude that SSV mAb does not work as an immunosuppressant *in vivo*.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：免疫抑制剤、抗体医薬

1. 研究開始当初の背景

肝移植は他の臓器移植と比べて免疫寛容

が誘導されやすい。その理由の1つとして、肝移植によってレシピエントの体内で免疫

抑制物質が産生されることが挙げられる。この免疫抑制物質の1つとして、抗-ヒストンH1抗体が同定された。ヒストンH1は核内にあるヒストンタンパク質の一種で、クロマチン構造の形成および維持に関与する。ヒストンタンパク質に対する自己抗体は、自己免疫疾患における病態マーカーとして広く認識されていることから、抗-ヒストンH1抗体が免疫抑制物質であるという報告は、一般的な認識と矛盾しているように思われた。そこで、実際に抗-ヒストンH1モノクローナル抗体を作製し、*in vitro*における臓器移植拒絶反応モデルである混合リンパ球反応(MLR)およびラット異所性心移植(HHT)モデルにおいて、抗-ヒストンH1モノクローナル抗体が免疫抑制活性を有することを確認した。

これらの結果から、臓器移植手術前にレシピエントの抗-ヒストンH1抗体価を意図的に高めておくことで、手術後、免疫寛容を誘導できると考えた。しかし、ヒストンH1はレシピエントの自己成分であるため、ヒストンH1自体をワクチンとして投与しても抗体価は上がりにくい。そこで、ヒストンH1ミモトープをワクチンとしてレシピエントに投与して、抗-ヒストンH1ミモトープ抗体(すなわち抗-ヒストンH1抗体)価を上昇させ、HHTを実施した。その結果、拒絶反応を抑制することに成功した。このことはつまり、抗-ヒストンH1ミモトープ抗体が免疫寛容を誘導したということである。

2. 研究の目的

ヒストンH1ミモトープに対するモノクローナル抗体(SSV mAb)を作製した。SSV mAbはラット脾細胞を用いたMLRに対する抑制活性を示した。本研究では、SSV mAbが免疫寛容を誘導する医薬品になりうるかどうか実験動物を用いて評価し、その免疫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) SSV mAbが作用する免疫細胞の調査

MLRでは、T細胞がアロ抗原を直接認識または樹状細胞(DC)を介して間接認識することで活性化し、増殖する。SSV mAbはT細胞またはDCの活性化を抑制することでMLRを抑制すると推測された。SSV mAbがT細胞とDCの活性化を抑制するかどうか調査した。

①T細胞の活性化に対する作用

Lewisラット脾細胞中のT細胞を磁気標識し、磁気カラムを用いて分離した。0.25 μg/mLの抗-CD3抗体を固定化したウェルにT

細胞(2×10^5 cells/ウェル)を加えてT細胞受容体(TCR)を刺激し、SSV mAb存在下で48時間培養した。培養終了の16時間前に5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)を終濃度10 μMとなるよう添加し、増殖中のT細胞をBrdUで標識した。培養終了後、T細胞に取り込まれたBrdUをenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法を用いて検出することで、T細胞の増殖を測定した。

②DCの活性化に対する作用

Lewisラット脾細胞中のDCを磁気標識し、磁気カラムを用いて分離した。培地に終濃度1 μg/mLのリポ多糖(LPS)とDC(2×10^5 cells/ウェル)を加え、SSV mAb存在下でオーバーナイト培養した。DCの活性化に伴い発現量が増加する成熟マーカーCD40、CD86、MHC-class II(RT1b)について、フローサイトメーターを用いて発現量およびポジティブ細胞の割合を測定した。

2) SSV mAbがMLRにおけるサイトカイン産生に与える影響の解析

Lewisラット脾細胞を反応細胞(1×10^5 cells/ウェル)、マイトマイシンC処理したDAラット脾細胞を刺激細胞(8×10^5 cells/ウェル)として丸底ウェルに加えて混合し、SSV mAb存在下で96時間培養した。培養終了の16時間前にBrdUを添加し、SSV mAbがMLRを抑制することを確認した。培養終了後、培養上清を採取し、活性化したT細胞によって産生されるinterleukin-2(IL-2)、制御性の免疫細胞によって産生される抑制性サイトカインinterleukin-10(IL-10)の濃度をELISA法で測定した。

3) SSV mAb抗原の調査

SSV mAbの作用細胞が特定されなかったため、MLRで反応細胞に用いたLewisラット脾細胞を細胞膜タンパク質のソースとして使用した。Lewisラット脾細胞の細胞膜タンパク質を調製し、二次元電気泳動でタンパク質スポットに分離した。SSV mAbをプローブとしたウェスタンブロッティング解析を行い、SSV mAbの認識する脾細胞表面抗原を調査した。

4) 臓器移植モデル動物を用いたSSV mAbの免疫寛容誘導能力の評価

DAラットの心臓をLewisラットの首元に移植したHHTモデルを作製し、手術後0、2、4、6日に200 μgのSSV mAbを投与した。触診によって移植心の拍動を調べ、生着しているかどうかを判断した。生理食塩水を投与した群

をコントロールとした。

4. 研究成果

1) SSV mAb が作用する免疫細胞の調査

①T細胞の活性化に対する作用

SSV mAb は、TCR 刺激による T 細胞の増殖を抑制しなかった。実験に使用した 0.25 µg/mL の固定化抗-CD3 抗体による TCR 刺激は比較的弱い刺激であることから、TCR 刺激が強すぎるために SSV mAb の抑制効果が認められなかった可能性は低い。この結果から、SSV mAb は MLR におけるアロ反応性 T 細胞や樹状細胞を介した T 細胞の活性化を抑制しないことが明らかになった。

②DC の活性化に対する作用

SSV mAb は、LPS 刺激した DC における成熟マーカー CD40、CD86、MHC-class II (RT1b) の発現量増加およびポジティブ細胞の割合増加を抑制しなかった。この結果から、SSV mAb は DC の活性化を抑制しないことが明らかになった。

上記 1-1 および 1-2 の結果から、SSV mAb は T 細胞と DC 以外の免疫細胞に作用することで MLR を抑制する可能性が示唆された。

2) SSV mAb が MLR におけるサイトカイン産生に与える影響の解析

MLR は活性化した T 細胞によって産生される IL-2 依存的な反応である。それにもかかわらず SSV mAb は IL-2 の産生を抑制することなく MLR を抑制した。この結果から、SSV mAb は IL-2 非依存的に MLR を抑制することが示唆された。また、SSV mAb は MLR において IL-10 の産生を促進しなかった。この結果から、SSV mAb は MLR において IL-10 を産生する制御性の免疫細胞を誘導しないことが明らかになった。

3) SSV mAb 抗原の調査

SSV mAb は約 160 kDa (pI 5)、約 120 kDa (pI 6)、約 45 kDa (pI 4) の脾細胞表面抗原を認識した。これら 3 つの抗原の分子量と pI は、分子量 21 kDa (pI 約 11) のヒストン H1 とは大きく異なることから、ヒストン H1 とは別のタンパク質であることが明らかになった。3 つの抗原はヒストン H1 や SSV ペプチドと類似した立体構造または配列を有する可能性がある。3 つの抗原はどれもマイナーな微量タンパク質だった。このような微量タンパク質を質量分析で同定できる可能性は極めて低い。今後、作用細胞を特定し、そ

の細胞をソースに細胞膜タンパク質を調製することでサンプル中の当該抗原の量を増やし、質量分析によるタンパク質種の同定を行う。3 つのタンパク質が微量であるにもかかわらず、SSV mAb の結合が強いことから、SSV mAb はこれらのタンパク質に強いアフィニティを有することが示唆された。

4) 臓器移植モデル動物を用いた SSV mAb の免疫寛容誘導能力の評価

HHT モデルへの SSV mAb の投与は急性拒絶反応を抑制せず、移植心の生着日数の延長をもたらさなかった。*in vitro* 実験の MLR と比べて、HHT モデルを用いた *in vivo* 実験は関与する細胞や物質がはるかに多く実験系が複雑である。このことが SSV mAb が *in vivo* で免疫抑制活性を示さなかった原因の 1 つであると推測された。この結果から、SSV mAb を臓器移植において免疫寛容を誘導する医薬品に応用することは難しいと結論した。

本件とは別の研究において、全身性の炎症反応である敗血症のモデルマウスへの SSV mAb の投与は致死率を劇的に改善した。敗血症には免疫反応が深く関与しており、SSV mAb が免疫反応に作用した結果、敗血症の致死率を改善した可能性が高い。今後は、本研究で得られた成果を礎に、SSV mAb の敗血症治療薬への応用を目指す。SSV mAb の作用細胞および抗原を引き続き調査し、抗炎症作用メカニズムの解明に取り組む。

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 1 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. Unexpected T cell regulatory activity of anti-histone H1 autoantibody: its mode of action in regulatory T cell-dependent and -independent manners. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013; 432(2):246-252. (査読有り)
DOI:10.1016/j.bbrc.2012.12.125.

[学会発表] (計 7 件)

- ① Chiang K. C., A peptide mimotope as a

potential diagnostic and therapeutic therapy in organ transplantation. BIT' s 4th annual congress and exposition of molecular diagnostics. Sep. 22, 2011, Beijing International Convention Center, Beijing, China.

- ② 島田 弥生、免疫抑制活性を有する抗-ヒストン H1 モノクローナル IgM 抗体における精製方法の検討、第 47 回日本移植学会総会、2011 年 10 月 6 日、宮城県仙台市仙台国際センター。
- ③ 大森直哉、新規免疫抑制性抗体による免疫抑制メカニズムの解析、日本薬学会第 132 回年会、2012 年 3 月 29 日、北海道札幌市北海道大学。
- ④ 島田弥生、抗-ヒストン H1 ミモトープモノクローナル抗体の免疫抑制メカニズムの解析、第 48 回日本移植学会総会、2012 年 9 月 22 日、愛知県名古屋市愛知県産業労働センター。
- ⑤ 草野徹、抗ヒストン抗体を用いた敗血症性臓器障害に対する新しい分子標的法の開発、第 3 回癌と炎症と α リポ酸研究会、2012 年 11 月 10 日、大分県由布市ゆふいん山水館。
- ⑥ Chen K. C., The therapeutic potential of a novel monoclonal antibody generated from peptide mimotope. 3rd Cancer, Inflammation and Alpha-Liporic Acid. Nov. 10, 2012, Yufuin Sansuikan, Yufu, Oita.
- ⑦ 島田弥生、ヒストン H1 が T 細胞に与える影響。第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡県福岡市福岡国際会議場。

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：免疫抑制活性を有するモノクローナル抗体またはその結合断片

発明者：佐藤秀次、後藤武、後藤茂、中野敏明、大森直哉、江貴真、島田弥生、森健二、宮城孝満

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2011/068793

出願年月日：平成 23 年 8 月 19 日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 弥生 (SHIMADA YAYOI)

城西国際大学・かずさ創薬研究センター・
研究員

研究者番号：70439024