様式Ｆ－１９

科研費
KAKENHI

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　４月１７日現在

機関番号：３２２０３
研究種目：若手研究（Ｂ）
研究期間：２０１２～２０１３
課題番号：２３７９０２３５

研究課題名（和文）　抗 MHC-II 抗体を用いたドナー樹状細胞の移植前除去による新規免疫抑制法の開発

研究課題名（英文）　Novel immunosuppressive protocol in which depleting donor dendritic-cells by anti-MHC-II antibodies.

研究代表者
上田　祐司　（UETA HISASHI）
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号：１０３６４５５６

研究成果の概要（和文）：ラット肝に存在する免疫刺激性の樹状細胞の亜群２種類を同定し、これらを抗MHC-II抗体前処置によって選択的に除去することにより副作用の少ない新たな免疫抑制方法を開発した。

研究成果の概要（英文）：We identified 2 types of immunogeneic dendritic-cells in rat liver and developed a novel immunosuppressive protocol by depleting them using antibody against MHC-II.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）
キーワード：免疫組織学, 樹状細胞, cell trafficking, 移植免疫, 免疫抑制, 抗体, MHC-II, ラット

１．研究開始当初の背景

(1)申請者はこれまで移植免疫応答における免疫担当細胞の動態と機能を形態学的に解析してきた。ラット肝移植の系では、ドナー肝由来の樹状細胞（DC）が移植直後よりレシピエントの全身のリンパ臓器に遊走して CD8 陽性 T 細胞を活性化することが急性拒絶反応の主原因となることを見出した(Hepatology2008)

(2)この急性拒絶モデルに移植前ドナー末梢血輸血（DST）を行うと、レシピエント内でドナー特異的な IgM 抗体が産生され、この抗体が移植後のドナーDC 遊走を抑制するために上記の CD8T 細胞反応がほぼ完全に消失し、移植片が拒絶されない事を見いだした(今夏投稿予定)。この DST 効果は特異的な免疫抑制法として非常に効率的であるが、本抗体の抗原はドナーの I 型組織適合型抗原遺伝子複合体（MHC-I）であるために、ドナー遊走性細胞のみならず移植肝内のドナー血管内皮細胞や肝細胞にも反応して一過性の肝障害を示すため、臨床応用上の障壁となることが予想された。

２．研究の目的

(1)そこで本研究では DC に高発現するが血管内皮細胞や肝細胞には発現しない II 型 MHC（MHC-II）に着目し、まずドナーMHC-II に対する抗体を投与して肝障害を回避しながらドナーDC 遊走抑制を選択的に起こす方法を着想するに至った。 (2)更に臨床応用の可能性を高めるべく、摘出したドナー肝の灌流液中に抗体を加える系へと発展させて、その効果を解析する。これにより臨床臓器移植に適応しうる新規特異的免疫抑制法の開発へと発展させる。　(3) DC には多様性があり、機能的に異なる亜型が存在することが知られてきている。そこで肝 DC 亜集団の同定と肝移植に果たす役割についても

解析する。

３．研究の方法

(1) 抗ドナーMHC-II 抗体前投与 (in vivo depletion) によるドナーDC 選択的除去群の解析：まずドナーラットの MHC-II に特異的なマウス抗体 (clone OX76) を大量産生・精製する。これをレシピエントラットに腹腔投与し、翌日ドナー肝をレシピエント肝移植する。経時的に標本を作製し、本系における免疫応答の推移を免疫組織化学により解析する。並行して血清 AST やビリルビン等の肝障害マーカー値を基に抗体投与による移植肝障害の程度を解析する。これらのパラメーターとレシピエントの平均生存日数を基に、最小限の有効抗体量を見出す。

(2) 抗ドナーMHC-II 抗体浸透法 (ex vivo depletion) による移植前ドナーDC 除去群の解析：

(1)で見出した抗体量を参考に、摘出ドナー肝内で本抗体を反応させる。反応方法は、脱血した摘出ドナー肝に抗体を含む生理的溶液を門脈から加えたのち、すべての脈管を結紮する方法とする。臓器の viability と抗体の反応性の両方を保持しうる抗体反応条件 (温度、時間、導入経路) を絞り込んだ後、実際に移植して(1)と同様に解析しながら、条件の最適化を行う。

(3) 肝 DC 亜集団のフェノタイプ、放射線感受性、移植後動態の比較解析：正常ラット肝に in situ collagenase D 処理と遠心細胞分画法を施して肝 DC 分画を得る。これに DC マーカーや接着分子等の抗体で染色した後、フローサイトメトリー解析を行って肝 DC を亜集団に細分化する。放射線照射後の肝臓や、肝移植後の遊走先のレシピエント臓器および移植肝自体からも同様にドナーDC を精製して解析する。

(4) 抗 panMHC-II 抗体を用いた ex vivo depletion 法による移植前ドナーDC 除去群の解析：臨床臓器移植の現場においては抗ドナーMHC(HLA) 抗体を予め準備すること自体非常に難しく、これまでの方法を臨床で再現することは非現実的である。そこで汎用性を高める目的で、敢えて系統に特異性の無い抗 panMHC-II 抗体で、かつ細胞除去活性の高い抗体を見いだす。その後、本抗体の生物活性を確認した後、(2)同様に ex vivo でドナーDC に反応させた後、余剰抗体を洗い流して肝移植を行う。

４．研究成果

(1) 抗ドナーMHC-II 抗体前投与 (in vivo depletion) によるドナーDC 選択的除去群の解析：まず抗ドナーMHC-II 抗体;OX76 の標的細胞除去能 depleting effect についてドナー胸管リンパ球分画を標的に本抗体を反応させた後にレシピエント体内に移入すると、抗原である MHC-II を発現するドナーB 細胞のみを素早く消失させることができた。そこで本抗体を大量生産し、次にこれを前日にレシピエント腹腔内に投与した後に肝移植を行って経時的に解析した。これまでに見いだした①移植後 2d でのドナーDC のレシピエントリンパ組織への全身性の遊走と遊走先でのレシピエント T 細胞との細胞集塊 (cluster forming cell, CFC, 図 1) 形成と、②平均生存日数 (MST)、③血清中の肝障害マーカー値を基に、至適投与抗体量を求めたところ、3mg/200g 体重 BW では①の抑制を示しつつも有意な MST 延長は認められなかった。これは投与抗体が余剰であるためにドナーDC のみならず、ドナー肝内マクロファージであるクッパー細胞 (一部 MHC-II 弱陽性) にも反応して活性化させたために、TNFa 等の炎症性サイトカインが放出されてレシピエントの免疫監視機構を返って高めたためであると考えられた。最終的に 0.3mg /200gBW 投与では①を抑制しつつもクッパ―細胞の活性化を抑え、MST を対照群の 3 倍以上に延長させることができた。この投与条件では移植早期の肝障害値は対照群と全く同じであったことから、副作用の大幅な軽減も達成できたと考えられた (今夏投稿予定)

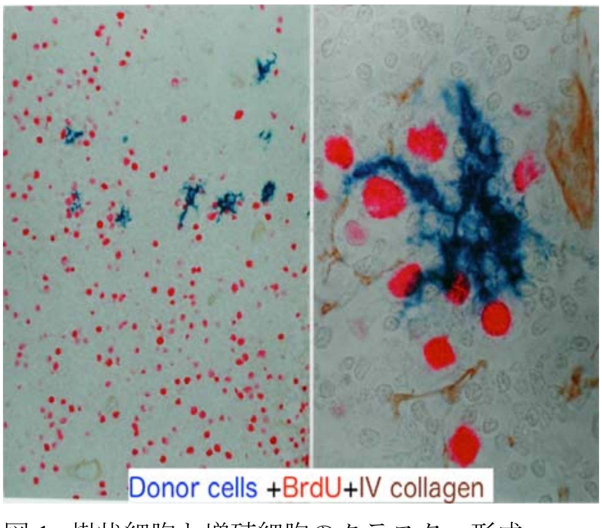

図 1. 樹状細胞と増殖細胞のクラスター形成

(2) 抗ドナーMHC-II 抗体浸透法 (ex vivo depletion) による移植前ドナーDC 除去群の解析：臨床肝移植に応用すべく(1)の抗体処置をドナー摘出肝内で達成するための条件の検討を行った。まず、(1)で見いだした OX76 0.3mg を摘出肝内で反応させた後、移植を行ったところ MST の延長は認められるものの(1)ほど移植片拒絶を遅延させることができなかった。経時的な免疫組織学的に解析したところ、[1]①における CFC 抑制が起こらないリンパ組織が存在すること、[2]肝内クッパ―細胞の活性化が認められた。[2]は投与

量を 0.1mg に減量することで抑制することができたが、[1]は仮に抗体量を増やしても改善できなかった。このことから肝 DC には局在や抗体反応性などの異なる亜群が存在すると仮定し、次の実験を行った。

(3) 肝 DC 亜集団のフェノタイプ、放射線感受性、移植後動態の比較解析：正常なドナーラットの肝臓および肝リンパにおける DC のフェノタイプ解析を FACS で行ったところ、肝 DC (MHC-II, CD103 共陽性) には CD11b, CD172a 分子により 3 つの亜群に細分化される。さらにこの 3 亜群は放射線感受性が異なり、CD172a+CD11b-, CD172a-CD11b+型は放射線により著しく消失するのに対し、CD172a+CD11b+型は他の 2 群に比して放射線抵抗性であった（図 2）。そのうち、CD172a+CD11b- 亜群は放射線感受性で、血行性遊走能をもつ肝 DC であることが明らかとなった。この放射線前照射により通常ドナー DC の遊走先でおこる全身性の CD8+T 細胞の増殖性応答が強く抑制された。また、CD172a+CD11b+ DC 亜群は放射線抵抗性で、一部肝臓に残って、一部リンパ行性遊走により傍胸腺リンパ節 (parathymic LN, PTN) に流れ込んで、両方とも最もはげしいレシピエント T 細胞増殖性応答を示した (図 3-5)。これに並行して制御性 T 細胞数および活性化状態について、放射線前処置の有無における影響を移植肝とホストの二次リンパ器官で比較したが両間に有意な変動は見られなかった。さらに、CD172a+CD11b+ DC 亜群は肝臓移植後の PTN で CD25 発現が大幅に上昇しており、In vitro T 細胞混合培養試験でも非常に強い同種感作性が示唆された (図 6, 7)。

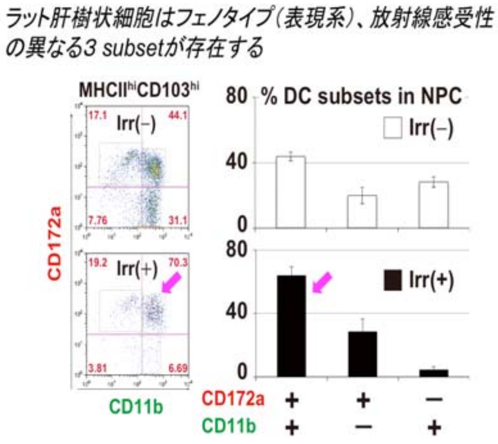

図 2. DC のフェノタイプ、放射線感受性

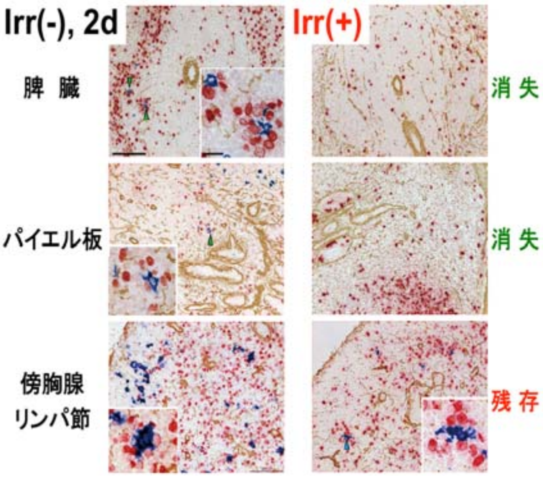

図 3. 放射線抵抗性肝 DC の PTN 遊走

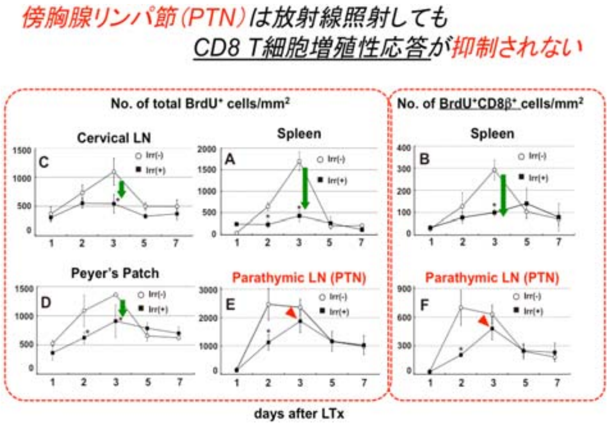

図 4. 放射線抵抗性肝 DC の PTN 遊走

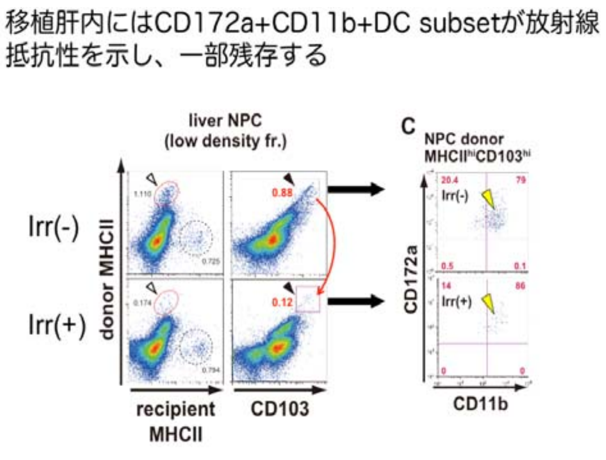

図 5. 放射線抵抗性肝 DC の PTN 遊走

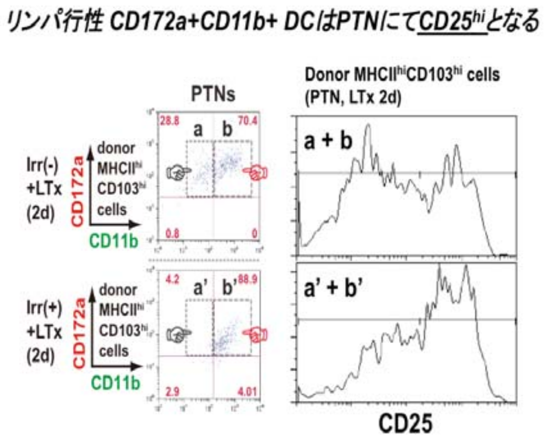

図 6. 放射線抵抗性肝 DC の PTN での CD25 発現

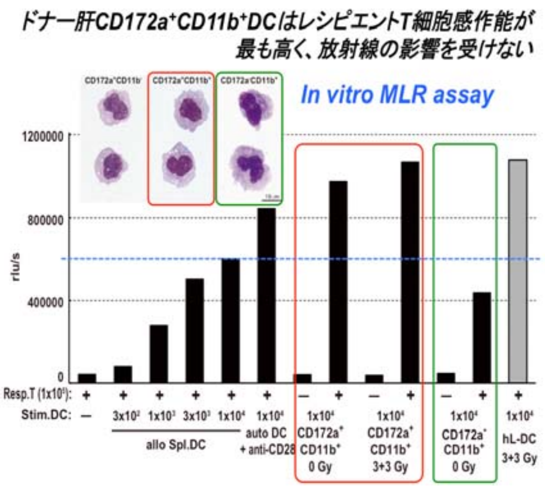

図 7. 放射線抵抗性肝 DC の PTN での CD25 発現

以上の結果､肝臓には少なくとも3つのDC 亜群が存在することが明らかになった。このうち放射線抵抗性の肝 DC 亜群は、ラット肝移植後の拒絶反応に中心的な役割を持つこと、肝移植後レシピエントリンパ臓器の拒絶応答は、肝所属リンパ節でなく、腹腔所属リンパ節で最も強く起こることが明らかになった (図 8)。実験動物のみならず臨床における腹腔内での移植手術では、肝臓以外でも移植片由来の DC や passenger leukocyte は腹腔から所属リンパ節へリンパ行性遊走し、そこが拒絶反応の中心となることが示唆された (Hepatology 2012)。本研究で明らかにした細胞遊走経路は腹腔内腫瘍の転移経路としても重要であると考えられる。また、この (2) においてドナーDC 遊走が残存する部位は正にこの PTN であったことから、ex vivo depletion 法単独では腹腔を経由したリンパ行性 DC 遊走を効率良く抑制できないことが示唆された。

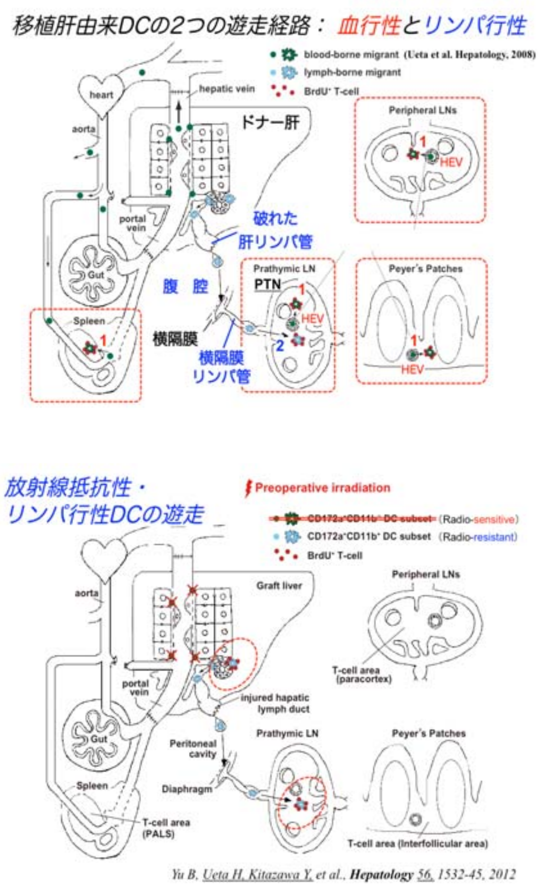

図 8.移植肝由来 DC 亜群の遊走経路､フェノタイプ、放射線感受性

(4) 抗 panMHC-II 抗体を用いた ex vivo depletion 法による移植前ドナーDC 除去群の解析：OX76 はドナーMHC-II 特異的抗体であり有用であるが、臨床において同様の抗体を予め準備することほぼ不可能である。臨床肝移植のようにあらゆる組み合わせに対応し得る抗体で(1),(2)同様の実験を行うべく、すべてのラット MHC-II に反応し、かつ、それらを除去し得る抗体の調査・検討を行った。これまでの研究成果より、遊走細胞を抗体で除去するには補体結合性の高い抗体が有用であることを見いだしており、この観点から抗体のサブタイプを IgM または IgG2a として絞り込んでスクリーニングを行ったところ、hybridoma clone 14-4-4s を得た。本抗体は MHC-II 陽性細胞に強く反応し、(1)と同様に胸管リンパ球を用いた予備実験においてＢリンパ球に特異的に反応し、これを除去することを確認した。現在、抗体の大量精製を実施中である。

(5) 今後の展望： 今後(4)の抗体を肝移植の系に用いてその効果を確認する。その際、ex vivo depletion 法では(3)のリンパ行性 DC 遊

走抑制が不十分になることが予想される。そこで現在 ex vivo depletion 法の改善策として、閉腹直前に少量の抗体を腹腔内に滴下することでリンパ行性遊走を抑制する方法を考案し、その条件の最適化も並行して行っている。　最終的は両者を組み合わせることで汎用性のあるドナーグラフト由来 DC の遊走性・反応性を制御することで移植免疫を調整する新規な臓器特異的免疫抑制法の樹立を目指す。

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）
Yu B*, Ueta H*, Matsuno K（11 人中１番目）：Two immunogenic passenger dendritic-cell subsets in the rat liver have distinct trafficking patterns and radiosensitivities. Hepatology. 56(4): 1532-45, 2012.
doi:10.1002/hep.25795
*Equal contribution

〔学会発表〕（計３件）
1. Ueta H, Kitazawa Y, Sawanobori Y, Matsuno K: Two distinct immunogenic passenger cDC subsets in rat liver graft rejection, 第 41 回日本免疫学会学術集会, Dec. 5-7, 神戸市, 2012.

2. Ueta H, Yu B, Kitazawa Y, Sawanobori Y, Matsuno K: Trafficking of two immunogenic conventional DC subsets in the liver, The 12th International Symposium on Dendritic Cells, Oct. 7-11, Daegu, Korea, 2012.

3. 上田祐司, 松野健二郎, 沢登祥史, 北沢祐介, 余斌: Two immunogenic passenger dendritic-cell subsets in the rat liver have distinct trafficking patterns and radiosensitivities, 第 117 回 日本解剖学会全国学術集会, 3/26-28, 甲府市, 2012.

〔図書〕（計０件）

〔その他〕
ホームページ等
http://macro.dokkyomed.ac.jp/index.html

６．研究組織
(1)研究代表者
上田　祐司　(UETA HISASHI)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号： 10364556