

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890004

研究課題名(和文) ヒト化マウスによる生体肝移植術後患者の免疫モニタリング法の確立

研究課題名(英文) The establishment of in vivo immunological monitoring by using humanized mouse model in living related liver transplant recipients.

研究代表者

青柳 武史 (Aoyagi, Takeshi)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：90374347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：免疫欠損マウスにヒトリンパ球を投与するとヒト免疫が構築される。本研究では構築に必要で、かつGVHD反応が生じにくい至適リンパ球数を明らかにした。また構築には新鮮血からの分離が重要であった。さらにin vivoモニタリングで細胞増殖反応を観察する手技として蛍光色素による基礎実験に成功した。一方でin vitro免疫モニタリングとして肝移植レシピエントのリンパ球による実験を行った。移植後20回の拒絶反応に関連し、前後の免疫モニタリングでは有意な上昇が観察されたが、個々の症例ではin vitroモニタリング法には限界があった。ヒト化マウスin vivoモニタリングの確立が今後期待される結果であった。

研究成果の概要(英文)：In the current study, the exact numbers of human lymphocyte to generate the humanized mouse model but prevent the graft versus host disease were identified. It is important that the human lymphocytes were isolated from fresh blood not stored them in deep freezer. Also the applicable lymphocyte s proliferation assays by using fluorescent dye were established. Meanwhile, to examine the efficacy of in vitro monitoring assays, immune-assays possible to obtain results in a short period of time were applied in living related liver transplant patients. A single immunological monitoring test has limitations in terms of reliability suggesting that humanized in vivo monitoring assay is attractive tool to diagnose the exact immune status.

研究分野：医歯薬学

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：ヒト化マウス 免疫モニタリング 生体肝移植 拒絶反応

1. 研究開始当初の背景

臓器移植後の免疫抑制療法は近年大きく発展し、抗体治療などの新薬や治療法の開発が進んでいる (Aoyagi T. *Am J Transplant*, 2009)。それらの目標はグラフト拒絶を抑制し、終生にわたる免疫抑制剤使用に伴う副作用を抑え、究極的には免疫抑制剤の使用無しで拒絶反応が生じない状態、いわゆる免疫寛容を誘導することである。免疫状態をモニタリングする方法は、免疫抑制剤の減量や中止などの調整、免疫寛容か否かの確認などに必要であるが、その方法は確立されていない。従って、一般血液検査やグラフト生検にて免疫状態を推測し免疫抑制剤の調整を行っているのが現状である。しかし、その方法ではグラフト機能が評価できない臓器や生検が困難な場合には対応できない。免疫状態がモニターされていない状態下の免疫抑制剤減量は、急性/慢性拒絶反応の原因となり、最終的にグラフトの機能不全を引き起こす (Yoshitomi M. *Transplantation*, 2009)。こうした背景から、臓器移植後の免疫状態を正確に把握するための‘免疫モニタリング’の必要性は新薬、治療法の発展とともに必要不可欠なものと認識されている。近年、我々の研究室も含め、海外のいくつかの施設では *in vitro* での免疫解析法を検討しているが、培地の条件により限られた細胞集団の免疫反応しか観察できないこと、免疫細胞の遊走・浸潤能については評価できないこと、アロリンパ球同士の細胞間接着が十分な状態での免疫反応は生体の条件とは大きく異なることなど、本質的に *in vitro* と *in vivo* ではその反応が必ずしも等しいとは言えず、この手法では生体内の免疫評価に限界がある。

ヒトの免疫担当細胞を免疫不全マウスに構築するいわゆるヒト化マウスは *in vivo* における免疫反応を観察する新しい手法としてその有用性が報告され (Shultz LD. *Nat Rev Immunol*, 2007)、ヒト化マウスを用いた移植後の患者の免疫状態を観察する試みが

始まっている (Haynes LD. *Am J Transplant*, 2012)。免疫不全マウスの改良も進み、以前ヒト化マウスに多く用いられていた SCID Beige マウスに比べ、最近の Rag^{-/-} IL-2R γ ^{-/-} マウスはリンパ球の再構築を妨げる Natural Killer 細胞が存在しないため、ヒト免疫を効率よく構築することが可能となった。さらに改良が進められた NSG マウス (Ito R. *Cell Mol Immunol*, 2012) は現時点で最も信頼しうるヒト化マウス作成が可能と考えられるが、これらのマウスを用いた免疫モニタリングの報告は無く、より正確にヒトの免疫状態を反映することができるものと期待される。

2. 研究の目的

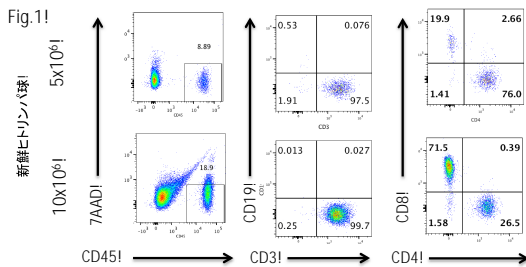
臓器移植後には、拒絶反応を予防するため免疫抑制療法を施すことが治療上必須であるが、現状では免疫状態を的確に診断し免疫抑制剤投与量を適正化し得る有効な指標はない。本研究では、生体肝移植レシピエントのリンパ球をヒト化マウスに移入してレシピエント免疫系を再構築し、ドナーや 3rd party ならびに非特異的な抗原に対する免疫反応を *in vivo* で検討し、ヒト化マウスを用いた *in vivo* における免疫状態評価法を確立する。

3. 研究の方法

本研究にはマウス免疫細胞の欠損した NOD/scid IL-2R gamma null (通称 NSG) マウスを用いる。まず、このマウスを購入し、我々の施設において繁殖させた後、健康人のヒトリンパ球を腹腔内投与する。投与 2-3 週間後にマウス末梢血中のヒト CD45 陽性細胞を観察する。これまでの研究報告よりマウス末梢血で 1% 以上のヒト CD45 陽性細胞が確認できればヒト化が成功したと判断する (Nadig S. *Nat Med*, 2010)。またアロ免疫反応の観察として、CFSE ラベルしたリンパ球の増殖反応を観察する。さらに生体肝移植レシピエントのリンパ球を用いて、*in vitro* の免疫モニタリングの有用性について検討し、*in vivo* と比較検討を行う。

4. 研究成果

まず本研究に必要な免疫細胞欠損マウスである NOD/scid IL-2R gamma null (通称 NSG) マウスを購入、我々の施設で繁殖することに成功した。続いてヒト免疫細胞のマウスへの構築を行うのに至適投与リンパ球数を決定した。論文等で報告されている (Issa F. *Transplantation* 2010) 必要リンパ球数を参考に 5×10^6 個または 10^7 個の健常人リンパ球 (採血直後に分離した新鮮リンパ球またはセルバンカーを用いて凍結保存 (-80) し、解凍したリンパ球) をマウスに腹腔内投与した。投与3週間後のマウス末梢血には Fig. 1 の如く、新鮮血から分離したヒトリンパ球の 5×10^6 個と 10^7 個投与群においてヒト CD45 陽性細胞が 1% 以上存在することが確認された。(ヒト化マウスの作成に成功)



10^7 個のリンパ球投与群の方がヒト化の効率は良かったが、ヒトリンパ球 vs マウスの GVHD 反応が高率に生じることが分かったため、 5×10^6 個のリンパ球がヒト化マウスの作成に望ましいと判断した。一方で、-80 の凍結保存後リンパ球によるヒト化の構築は得られ無かった。続いて in vivo でのリンパ球反応を観察する上で必要な手技である CFSE ラベルによるリンパ球反応の基礎実験を施行した。ヒトリンパ球を CFSE ラベル後、アロ抗原、または CD3、CD28 抗体にて刺激し、リンパ球の分裂増殖を FACS にて観察した。また CFSE 以外の蛍光色素である CellTrace Violet を用いてもリンパ球増殖の観察が可能であることも確認した。一方で、肝移植レシピエントのリンパ球を用いたモニタリングアッセイとしてドナー抗原刺激

後の 3H-Thymidine の取り込み (MLR)、IFN-gamma ELISPOT、CD4 陽性 T 細胞中の CD154 の発現を観察した。また、免疫反応の強弱の測定として Immuknow® も施行した。結果として生体肝移植後急性期に経験された 20 回の急性拒絶反応に関連して、拒絶反応前後の免疫モニタリングアッセイは有意差のある上昇を認めた (ドナー抗原刺激後の IFN-g ELISPOT ($p=0.0364$), ドナー抗原刺激後の CD4T 細胞中の CD154 の発現 ($p=0.0431$), immuknow 値 ($p=0.0251$))。しかし、拒絶反応によって、必ずしもこれらの免疫モニタリングが陽性になるとは限らず、実際 IFNg-ELISPOT、CD154 の発現、immuknow のいずれも上昇がみられたのは 3 つのアッセイを同時に施行し得た 17 回の拒絶反応のうち 5 例 (29%) に過ぎず、臨床のデータを含めた総合的な判断が求められる結果であった (第 49 回日本移植学会総会において報告)。このことから in vitro による免疫モニタリング法には限界がありと考えられた。今後、ヒト体内で生じている免疫反応により近い条件であるヒト化マウス in vivo モニタリング法が新規免疫学的アッセイとして期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Goto R, Zaito M, Oura T, Wakayama K, Tsunetoshi Y, Shibasaki S, Nagatsu A, Emoto S, Igarashi R, Aoyagi T, Suzuki T, Shimamura T, Todo S, Yamashita K, A Real-time Immunological Monitoring in Living Related Liver Transplant Recipients, 2014.7.26-2014.7.31, Moscone West Convention Center (San Francisco, USA)

後藤 了一、山下 健一郎、長津明久、五十嵐瑠美、太田 稔、青柳武史、鈴木 友己、嶋村 剛、武富 紹信、藤堂 省、生体肝移植症例における免疫モニタリングの

有用性の検討、第 49 回日本移植学会総会、
2013 年 9 月 5 日-2013 年 9 月 7 日、国立
京都国際会館（京都市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

青柳 武史 (AOYAGI TAKESHI)
北海道大学・北海道大学病院・医員
研究者番号：90374347

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし