

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：24601
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2013～2016
 課題番号：25461957
 研究課題名(和文) HLA-Gの発現とその遺伝子型の移植片生着への影響について—急増する報告の検証—

研究課題名(英文) Effects of HLA-G expression and the genetic variation on graft survival - a reexamination of prior conclusions -

研究代表者
 石谷 昭子 (Ishitani, Akiko)
 奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40112544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：HLA-Gは母児の接点である胎盤トロホプラストに発現して母体に、胎児に対する免疫寛容を付与していると考えられている。近年、移植片の生着にHLA-Gの発現が寄与していると推測され、これを支持する結果や、将来HLA-Gが治療に応用できるという報告が急増している。本研究ではこれらの報告を検証するため、移植前後の末梢血単核球および血漿中のHLA-G発現解析を行った。我々は血漿中のHLA-Gを正確に測定できる方法を開発し、これにより腎移植167、肝移植111・造血幹細胞移植52例の試料につき検討したところ、血漿中にHLA-G抗原は検出しなかった。HLA-Gと移植片生着の関連については、再検が必要である。

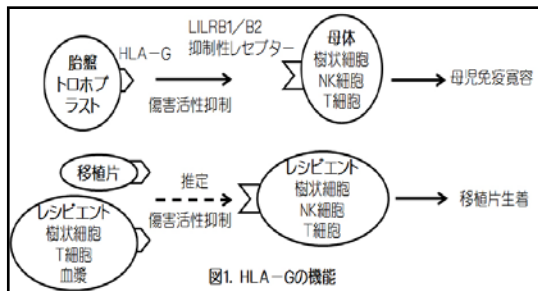
研究成果の概要(英文)：HLA-G is expressed on placental trophoblasts, the border of mother and fetus, and known to protect fetus from the maternal immune system. It was hypothesized that the immune suppressive function of HLA-G may help engraftment outcome at transplantation. This hypothesis was supported by several papers reporting that HLA-G protein in patient plasma or on the graft were associated with the graft survival. In this study, HLA-G expression on the peripheral mononuclear cells and in the plasma of patients before and after transplantation were tested. We developed an ELISA to detect very low concentration of HLA-G protein in plasma. Using the method, 167 samples from kidney transplantation, 111 from liver transplantation and 52 from hematopoietic stem cell transplantation were tested the HLA-G expression. No detectable levels of HLA-G were found in any samples. From this data, we conclude that the association of HLA-G expression and graft survival in those reports should be reexamined.

研究分野：免疫遺伝学

キーワード：HLA-G 移植片生着 腎移植 肝移植 造血幹細胞移植

1. 研究開始当初の背景

HLA-G は、本研究の海外共同研究者である Geraghty ら 1 により発見された非古典的 HLA クラス I 遺伝子の一つで、多型性が著しく乏しく、母児の接点である胎盤トロフオブラストに発現し、母体に免疫寛容を誘導する。また、特異的な alternative splicing により膜結合性と可溶性のアイソフォームを産生することにより、多様な機能をもつと考えられている。



HLA-G には、図 1 に示すような免疫寛容を誘導すると考えられる機能から、移植においてもこの分子が関わっているという報告が急増しており、特に移植片生着が関連しているという報告が多数存在する。例えば、

- 1) 肝移植片生着患者の樹状細胞には強 HLA-G が発現し、Foxp3+Treg も増加していた。(Castellaneta et al. *Transplantation*. 2011)
- 2) 腎移植生着患者血清中には有意に高い濃度の可溶性 HLA-G (sHLA-G)が存在し、急性拒絶反応を示した患者の sHLA-G は低い。(Jin HL et al., *Transplant Proc*. 2012)

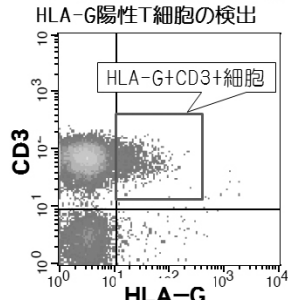
ところが一方、心移植において、生着できなかった患者において血漿中 sHLA-G 濃度が高いという報告もある(Almasood et al, *Hum Immunol*.2011)。さらに HLA-G の遺伝子多型が mRNA の安定性に関わり、これが HLA-G 抗原の産生量に関与しているとのことから、移植片の生着に関与しているとの報告が多くみられる (Twito et al., *J Heart Lung Transplant*. 2011)。

以上の報告が、もし、全て真実であれば、HLA-G は免疫抑制分子として、これからの移植医療に非常に有用なツールとなりうるが、未だに HLA-G が新規ツールとして利用されてはいない。

2. 研究の目的

我々は HLA-G が移植医療の有用な新規ツールとして利用されていない原因を探るべく、

図2. 腎臓移植患者における HLA-G陽性T細胞の検出



これまで研究を行ってきた。その中で移植片の生着・拒絶反応・GVHD の有無に関らず、腎臓・肝臓・造血幹細胞移植患者の末梢血単核球中に HLA-G 陽性細胞が出現することが明らかとなった (図 2)。これらの結果から、拒絶反応・GVHD と HLA-G 発現との相関を解析したところ、拒絶反応・GVHD の発生した症例では HLA-G 陽性細胞率が低い傾向がみられたが有意ではなかった (表 1)。

表1. 移植後患者におけるHLA-G陽性細胞率

拒絶反応 GVHD	HLA-G陽性細胞率		
	肝臓移植	造血幹細胞移植	腎臓移植
有り	3.55±5.33(n=45)	0.77±2.08(n=91)	症例なし
無し	5.28±6.75(n=39)	1.35±4.04(n=87)	4.17±3.24(n=124)
p値	0.319	0.160	

P値: Mann-Whitney's U test. n=延べ測定回数

また、

- a) HLA-G 濃度、陽性率は、移植後の時期により大きく変動している。
- b) 可溶性 HLA-G の変動は、細胞表面の発現よりは少し「ずれ」ていた。
- c) HLA-G の発現量が個人により大きく異なっていた。

以上のような結果を得たことから、これらの変動の原因を解明することが、HLA-G を新規免疫寛容誘導法として開発するためには、必須であると考え、本研究を計画した。

3. 研究の方法

腎移植、肝移植、造血幹細胞移植を受けた患者末梢血を用いて、継時的に解析を行った。

血液採取

腎移植: 移植前日、移植後 1、7、14、21、28 日目、2か月、3か月、6か月、1年、2年、3年目。169 例。

肝移植: 移植前日、移植後 1、7、14、28、42、56 日目。111 例。

造血幹細胞移植: 前処理前日、移植前日、移植後 1、7、14、21、28 日目、2か月、3か月目。52 例。

各血液は、採取後冷蔵庫保存し、全血でフローサイトメリー、血漿で ELISA による HLA-G 抗原解析に使用した。

移植患者試料を用いた in vivo 解析

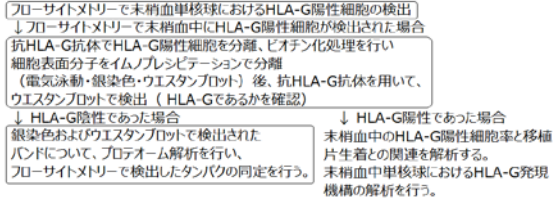
- 方法: 患者血漿中および末梢血中単核球上に発現する HLA-G 抗原をそれぞれ ELISA およびフローサイトメリーで解析する。
- 採血時期: 移植前日、移植後 1 日目、以降 1 週間～2 週間おきに、1～3 カ月。以降 1 カ月おきに 6 カ月～3 年間、経時的に解析する。また、拒絶反応の兆候が見られたときについても解析を行う。

検討項目:

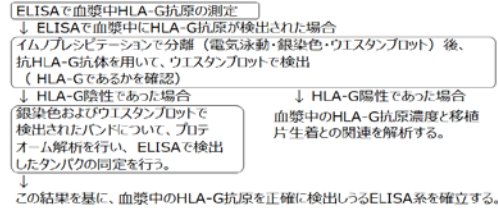
- ① 術前・術後の血漿中 HLA-G 抗原濃度と移植片生着との関連

- ② 術前・術後の末梢血単核球上の HLA-G の発現 (HLA-G 陽性細胞率およびそのポピュレーション) と移植片生着との関連
- ③ 臨床データ (CRP, 白血球数等) と、血漿中 HLA-G 抗原濃度および HLA-G 陽性細胞率の関連
- ④ 血漿中の HLA-G 抗原および末梢血単核球に発現する HLA-G 抗原の検出 (精製・分離)

末梢血中 HLA-G 陽性細胞の分離



血漿中の HLA-G 抗原の分離

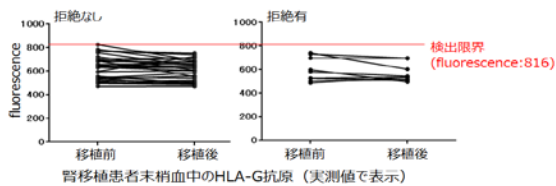


4. 研究成果

術前・術後の血漿中 HLA-G 抗原濃度と移植片生着との関連

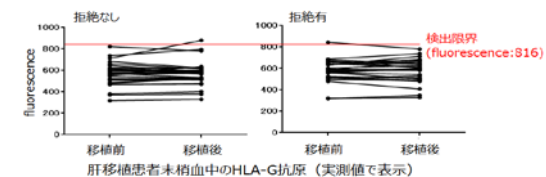
① 腎移植

腎移植を受けた患者の、移植前日、移植後 1、7、14、21、28 日目、2 か月、3 か月、6 か月、1 年、2 年、3 年目の末梢血血漿中の HLA-G 抗原について解析した。その結果、血漿中の HLA-G 濃度は拒絶有無に関わらず、検出限界以下であり、移植片生着と関連は見られなかった (下図)。

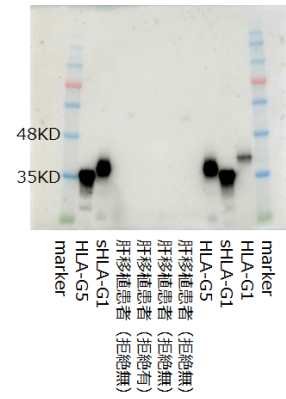


② 肝移植

肝移植を受けた患者の、移植前日、移植後 1、7、14、21、28、42、56 日目の末梢血血漿中の HLA-G 抗原について解析した。その結果、血漿中の HLA-G 濃度は拒絶有無に関わらず、検出限界以下であり、移植片生着と関連は見られなかった (下図)。



肝移植患者末梢血血漿中の HLA-G 抗原は、全て検出限界以下であったが、これらのうち、高い fluorescence を示した 4 検体について、イムノプレシピテーション及びウエスタンブロッティングにより確認したが、HLA-G 抗原は検出されなかった (左図)。

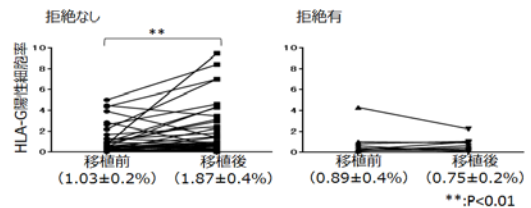


以上のことから、移植後患者血漿中に検出されるという HLA-G 抗原については、その存在から再検されるべきである。

術前・術後の末梢血単核球上の HLA-G の発現 (HLA-G 陽性細胞率およびそのポピュレーション) と移植片生着との関連

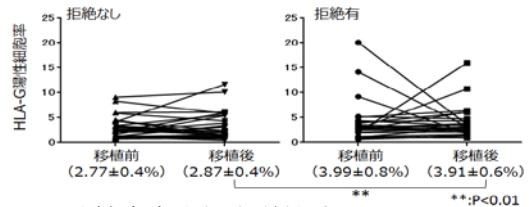
① 腎移植

3 種類の抗 HLA-G 抗体を用いて、腎移植後患者末梢血単核球上の HLA-G 抗原を解析したところ、拒絶無群において、移植後に有意に HLA-G 陽性細胞率が增加した (下図) が、拒絶の有無で HLA-G 陽性細胞率に有意な差は認められなかった。

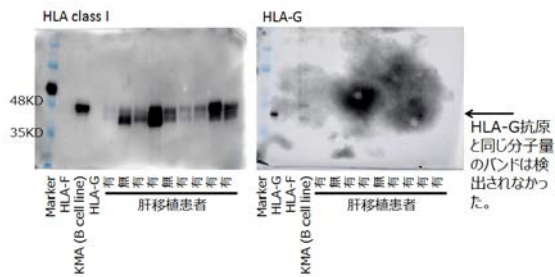


② 肝移植

3 種類の抗 HLA-G 抗体を用いて、肝移植後患者末梢血単核球上の HLA-G 抗原を解析したところ、拒絶有群の HLA-G 陽性細胞率が移植無群よりも、移植後に有意に増加した (下図)。拒絶有無群間での移植前、あるいは各群間内における移植前後での HLA-G 陽性細胞率に有意な差は認められなかった。



肝移植患者末梢血単核球のうち、HLA-G 陽性細胞率が高いものについて、イムノプレシピテーション、ウエスタンブロッティングを行ったところ、HLA クラス I 分子は検出されたが、HLA-G 分子は検出されなかった (次ページ図)。



腎移植、肝移植において、HLA-G 陽性細胞が示す傾向が異なること、フローサイトメトリーでの結果がウエスタンブロットで検証できないことなどから、移植前後で検出される HLA-G 陽性細胞については再検する必要があると考える。

③造血幹細胞移植

造血幹細胞移植においては、異なる 3 つの移植方法（末梢血幹細胞移植、骨髄移植、臍帯血移植）の症例計 52 例しか得ることができず、十分な解析を行うことができなかった。

以上の結果から、HLA-G と移植片生着の関連については、再検が必要である。

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 2 件）

1. Ouji-Sageshima N, Geraghty DE, Ishitani A, Hatake K, Ito T. Establishment of optimized ELISA system specific for HLA-G in body fluids. *HLA*. 2016;88(6):293-299.
2. Ouji-Sageshima N, Yuui K, Nakanishi M, Takeda N, Odawara Y, Yamashita M, Iwayama H, Awai K, Hashimoto H, Geraghty DE, Ishitani A, Hatake K, Ito T. sHLA-G and sHLA-I levels in follicular fluid are not associated with successful implantation. *J Reprod Immunol*. 2016;113:16-21.

〔学会発表〕（計 10 件）

1. Sageshima N., Lee N., Ishitani A., Geraghty DE., The alternative expression patterns and conformational forms of HLA-F. 第42回日本免疫学会総会、2013. 2013年12月11日～12月13日、幕張メッセ
2. 下嶋典子、Ni Lee、勇井克也、中西真理、貝森淳哉、矢澤浩治、吉澤淳、長谷川淳、米田龍生、森井武志、吉田克法、一戸辰夫、高原史郎、上本伸二、

喜多英二、羽竹勝彦、Geraghty DE、石谷昭子、免疫細胞上のHLA-Fの多様な発現様式 第22回日本組織適合性学会、2013. 2013年9月14日～16日、コラッセふくしま

3. 王寺（下嶋）典子、中西真理、貝森淳哉、市丸直嗣、吉澤淳、長谷川淳、米田龍生、森井武志、吉田克法、一戸辰夫、高原史郎、上本伸二、赤崎正佳、Geraghty DE、伊藤利洋、石谷昭子、喜多英二、羽竹勝彦、体液中の可溶性 HLA-G 抗原検出法の確立、第23回日本組織適合性学会大会、2014. 9/13-15、長崎大学熱帯医学研究所、長崎県長崎市
4. Noriko OUJI-SAGESHIMA , Akiko ISHITANI, Daniel E GERAGHTY, Toshihiro ITO, Establishment of the detection system of soluble HLA-G in body fluids第43回日本免疫学会学術集会、2014. 12/10-12、国立京都国際会館、京都府京都市
5. 王寺（下嶋）典子、赤崎正佳、Geraghty DE、喜多英二、石谷昭子、羽竹勝彦、伊藤利洋、可溶性 HLA-G 抗原検出法の確立 第29回日本生殖免疫学会総会、2014. 12/12-13、伊藤国際学術研究センター、東京都文京区
6. 王寺（下嶋）典子、貝森淳哉、市丸直嗣、吉澤淳、一戸辰夫、長谷川淳、森井武志、米田龍生、高原史郎、上本伸二、吉田克法、羽竹勝彦、伊藤利洋、Geraghty DE、石谷昭子、移植片患者末梢血における HLA-F、HLA-G の発現解析—移植片生着との関連性について— 第24回日本組織適合性学会大会、2015. 9/10-12、ホテルレイクビュー水戸、水戸市
7. Noriko OUJI-SAGESHIMA , Akiko ISHITANI, Daniel E GERAGHTY, Toshihiro ITO, The relation between the expression of both HLA-F and HLLA-g on PBMC from pretransplant and posttransplant patients and the graft survival. 第44回日本免疫学会学術集会、2015. 11/18-20、札幌コンベンションセンター、札幌市
8. 下嶋典子、Daniel E Geraghty、石谷昭子、伊藤利洋、改良ELISA法による体外受精卵培養上清および妊婦血漿等体液中の HLA-G の測定とその意義 第25回日本組織適合性学会大会、2016. 10/22～24、北海道大学学術交流会館、札幌市
9. Noriko OUJI-SAGESHIMA , Akiko ISHITANI, Daniel E GERAGHTY,

Toshihiro ITO, Does HLA-G in plasma from pregnant woman inhibit the rejection of fetus? 第45回日本免疫学会学術集会、2016.12/5-7、沖縄コンベンションセンター、宜野湾市

10. 下嶋典子、Daniel E Geraghty、石谷昭子、伊藤利洋、HLA-Gは体外受精卵培養上清および妊婦血漿等体液中に存在するのか? 第31回日本生殖免疫学会総会学術集会、2016.12/2~3、神戸国際会議場、神戸市

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石谷 昭子 (ISHITANI AKIKO)
奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：40112544

(2) 研究分担者

王寺 (下嶋) 典子 (OUJI SAGESHIMA NORIKO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：30398432

(3) 連携研究者

一戸辰夫 (ICHINOHE TATSUO)
広島大学・医学系研究科・教授
研究者番号：80314219

上本伸二 (UEMOTO SHINJI)
京都大学・医学系研究科・教授
研究者番号：40252449

高原史郎 (TAKAHARA SHIRO)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：70179547

森井武志 (MORII TAKESHI)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：70264851

吉田克法 (YOSHIDA KATSUNORI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：50192422