

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462466

研究課題名(和文)免疫グロブリン大量療法の効率化を目標としたアロ活性化マクロファージ抑制法の開発

研究課題名(英文) Development of allo-activated macrophage suppression method aiming at efficiency of Intravenous Immunoglobulin therapy

研究代表者

能見 勇人 (Nomi, Hayahito)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80418938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス腹腔に同種異型(アロ)であるMeth A繊維肉腫細胞を移植し、Meth Aが拒絶される。次に二次移植を行い抗体関連型急性拒絶反応をおこし、腹腔に浸潤する免疫担当細胞(PEC)の細胞障害活性を調査。抗体関連型拒絶反応では補体経路も存在するが、今回は補体による影響を避けるため添加牛血清に含まれる補体を非動化して使用。PECのうちアロ活性化マクロファージ(AIM)が作用することをPECの各細胞分画セルソーターで分離し評価。AIMの細胞障害活性は非特異的IgG抗体により有意に減弱することが判明した。今後、補体を非動化しない状態でIVIgのAIMに対する抑制効果も含め評価する必要性もある。

研究成果の概要(英文)：Meth A fibro-sarcoma cells transplanted into allogeneic C57Bl/6 mice peritoneal cavities proliferate initially, and then Meth A are rejected out from the mice. The secondary transplantations of Meth A were caused antibody related acute rejections in C57Bl/6 mice. We collected the peritoneal exudate cells (PEC) from these secondary transplantations (S-PEC). And we investigated cytotoxic activity of S-PEC in complement immobilized conditions with 51Cr releasing assays. We isolated each fractions of S-PEC with FACS cell-sorter, and confirmed the highest allogeneic cytotoxicity was seen in allograft induced macrophages (AIM) fractions. And, we found the activities of AIM were attenuated by massive nonspecific IgG antibodies, in vitro. The removal of AIM in S-PEC also attenuates the cytotoxic activity of S-PEC. It is presumed IVIG acts on cytotoxic activity of AIM. There is a necessity to evaluate the inhibitory effect of IVIG on AIM without compromising complement.

研究分野：泌尿器科学、腎移植

キーワード：アロ活性化マクロファージ 免疫グロブリン大量療法 同種異型移植 免疫抑制剤

1. 研究開始当初の背景

イムノグロブリン大量投与 (IVIG) による同種異型 (アロ) 拒絶反応の治療は有効な免疫抑制療法であるが費用が非常に高く臨床では保険未収載である。抗体をより選択的したりするなどの効率化が望まれる。

今日に至るまで移植免疫学の研究は、T細胞 B細胞といったリンパ系細胞の抑制について広く行われ、よい成果をあげ免疫抑制方法は飛躍的に進化した。過去には不可能であった ABO 不適合移植や HLA に対する既存抗体陽性例の一部に対しても既存抗体を除去し、抗 CD20 抗体で B 細胞系を抑制するなどして脾臓摘出をせずに腎移植をすることも可能となった。しかし免疫抑制剤の進化にもかかわらず抗体関連の急性拒絶反応により移植された貴重な臓器が廃絶されてしまう事例は皆無にはできていない。最近、多発性骨髄腫の治療薬としても認可されたボルテゾミブ (Bortezomib) はプロテアソームを阻害し、腫瘍細胞に対してアポトーシス誘導、細胞増殖抑制、血管新生抑制により抗腫瘍作用を示すとされるが、形質細胞にも作用することも報告されている。ボルテゾミブで抗体産生を抑え抗体関連型拒絶反応をあらかじめ予防する方法も考案され今後が期待されている。既存の免疫抑制剤として用いられるカルシニューリン阻害剤やステロイド剤による長期合併症の問題もあり、より選択的で安全な免疫抑制法の開発が今後も必要である。

我々はリンパ系とは異なる経路で、実は重要な役割を果たしている単球/マクロファージ (M) 系についてマウス・アロ移植モデルを用いて検証し報告してきた。我々の知見ではアロ移植拒絶における自己非自己の認識から標的の攻撃まで、単球/M 系の活性化は拒絶の機序に必要である。最終的には単球/M 系の活性機構の解明を通し、攻撃細胞としての AIM; allograft-induced macrophages を制御する方法開発したい。

一般的にアロ移植片拒絶反応における細胞性免疫の攻撃細胞の主体は従来 CD8 陽性の細胞障害性 T 細胞 (CTL) であるとする向きもある。しかし、CTL が攻撃細胞であるという説は部分的に否定されている。すなわち、従来移植免疫学の実験によく使用されてきたアロのリンパ系の細胞は CTL により直接傷害されるが、心臓、腎臓、小腸やある種の非リンパ系癌細胞では、そのエフェクター細胞として中心的な役割を演じるのは、CD8 陽性の CTL ではないことが、CD8 ノックアウトマウス等を用いて示唆されている (Krieger, N. R. 1996. J. Exp. Med. 184: 2013-2018. 他)。また、臨床報告でも急性拒絶反応時の移植腎生検病理組織には CD3 陽性 T 細胞と CD68 陽性細胞の単球/M 系の細胞がそれぞれ多数浸潤していることも報告されている (Nicolas K; 2009 Nephrol Dial Transplant (24)1979-1986)。さらに腎移植における臨床治験では phase まで進みなが

ら副作用のため開発中止となったとされる Fingolimoid (FTY720) (中止の理由は、黄斑浮腫や死亡にいたる重篤な副作用) であるが、これはリンパ球をリンパ節やパイエル盤にホーミングさせ、血中とリンパ管内のリンパ球を減少させリンパ系細胞の作用を抑制する薬剤である。高用量 FTY720 を低用量シクロスポリンとプレドニゾロンと併用の腎移植後の急性拒絶反応が抑えられなかったという Banu Sis らの症例報告 (2008. Am J Kidney Dis. Jan; 51(1):127-30) もある。この報告によると CD68 陽性細胞つまり活性化 M

が拒絶部位に多数浸潤していたとされている。これらは、我々が主張してきた免疫の経路、すなわち、単球/M 系 (樹状細胞を含む) による抗原の認識と提示、次にヘルパー T (CD4+) 細胞によるサイトカイン供給がおこり、この下におこる <<【a.】単球・M 系の活性化によるアロ移植細胞への直接攻撃 (直接貪食作用もしくは細胞障害性物質による)>> と、従来から言われている <<【b.】細胞障害性 T 細胞 (CTL) による細胞障害分子によるアロ細胞への攻撃>> の 2 経路があるという説 (後述) に矛盾しない。我々はマウス・アロ細胞腹腔内移植モデルにおいて、【a.】の経路は上皮や内皮など一般的に移植されるアロ組織の拒絶に働き、【b.】の経路は白血球とくにリンパ球などの CTL 感受性アロ細胞の拒絶に働く。そして、さらに【b.】の経路が働かないときは【a.】の経路が代わりに CTL 感受性アロ細胞に対しても AIM が拒絶に働くといったことを示してきた (Nomi H, 他; 2007 J Immunol. Aug 15; 179(4):2180-6.)。また、Toll-like レセプターの研究から、M における細胞内伝達シグナル伝達の研究解明が急速に進んだことに加え、M 上に MHC を認識するレセプターも発見された (Transplantation. 2013 Aug 15; 96(3):251-7. Tashiro-Yamaji J, Yoshida R. 他) により M が免疫における必須的な制御者であるとの認識も最近認められつつある。しかし、アロ拒絶時の細胞性免疫においては、【b.】の経路が既知となっていることから、上記【a.】の経路は、まだ広く認知されていない。実際のアロ臓器移植の組織はリンパ系ではなく上皮系の細胞であることから、むしろ移植片拒絶における細胞性免疫は上記【a.】のマクロファージ (M) を介した経路が主体であり、T 細胞はサイトカインを供給する指揮者的な役割をなすと我々は考えている。経路【a.】[アロに抗原付着した抗体の Fc 部分を認識した M がサイトカインで活性化 AIM となる。AIM は、噛み切りや NO や TNF を放出標的となるアロ細胞を障害する]。経路【b.】[HLAcass1 上の抗原を T (CD8+) 細胞が認識しサイトカインで活性化され CTL となる。CTL は、パーフォリンや Fas リガンドなどにより標的細胞を攻撃する]と考えられている。

さらに、【a.】の経路においては、我々はア

口細胞により活性化された M である AIM がアロ移植細胞を直接認識し付着し、その後、アロ移植細胞を“嘔みちぎる”ように攻撃し溶解させる直接的攻撃を経時的微鏡像を用いて示し、AIM によるアロ細胞の直接認識とアロ細胞に対する直接的な攻撃性を示した (Nomi H, 他, 2007. Microbiol Immunol. 2007;51(3):297-306.)。M や AIM がアロ拒絶時に働いていることは確かであると思われるが、いまだ重要視されていない。

実際臨床ではアロ移植組織拒絶において、超急性拒絶反応、急性拒絶反応のみならず慢性拒絶反応のいずれにおいても、抗体が関連する拒絶反応は重要なものである。これらに抗体が関与していることは、臨床の移植腎などの生検組織の C4d 染色陽性が否かでも判断されている。しかし、これは補体が関与したという証拠があるのみである。ABO 不適合腎移植では全例 C4d 陽性となるが実際には拒絶反応が起こっていない症例が大多数である。実際に標的組織が障害されるためには、補体カスケードにより、補体が活性化され最終的に膜侵襲複合体 (MAC) による細胞膜破壊から障害される場合と、補体によるオプソニン効果から AIM の補体レセプター (CD11b など) を介して活性化された AIM が標的細胞を障害したのかによる差異を検証する必要があると我々は考えている。つまり、抗体関連型拒絶反応において攻撃細胞 (エフェクター) のとして AIM の占める役割は現状で認知されているより大きいということが我々の考えである。

2. 研究の目的

抗体関連型急性拒絶反応発症時に大量の免疫グロブリン (2-4g/kg) の連日投与 (IVIG) が著効するとの報告されている。しかし、何百万円以上という負担金が必要となり、効果があることがわかっていても容易に投与できないのが現状である。IVIG は多量の IgG 抗体を投与することによりその抗体の Fc 部分が AIM の Fc 受容体に結合することにより、M の細胞障害活性を競合的に阻害するという機序で作用し、これが IVIG の主な作用機序ではないかと推定されている。したがって、AIM と IVIG の関係を明瞭にすることで、抗体関連型拒絶反応における AIM の役割を示すことができるのみでなく、AIM の働きをより直接的に抑えるためのグロブリン投与の方法として Fc 部分を多数投与すれば効果が出るのか否かの検索も行い、さらに抗 AIM 抗体となるグロブリンが選別もしくは作成できれば、現在の IVIG より効率的なグロブリンの投与方法となる可能性も考えられ、後述の実験で、AIM と IVIG の関連を調査し、IVIG の機序はまた明確にしたい。我々は、IVIG による作用が AIM 抑制であると考えており、この機序の解明を行い、IVIG を効率化すべく選択的に投与すべきグロブリンを検索したい。

3. 研究の方法

抗体関連拒絶モデルの作成：
一次移植 (初期感作)；マウスの MHC class である H-2 の異なる型の移植モデルとして、C57Bl/6 マウス (B6 マウス；H-2b) に H-2d の系統のマウスである DBA マウス由来の線維肉腫細胞である Meth A 腫瘍細胞を 3×10^6 個 / 匹で腹腔内移植する。この移植 Meth A 細胞は腫瘍であるため腹腔内で増殖をつづけるが、アロであるために拒絶反応が起こり移植後 7 日を最大として減少に転じ、14 日後には拒絶されマウス腹腔内から認められなくなる。(仮に H-2d の同型である Balb/c マウスの腹腔に Meth A 細胞を移植すると、Meth A 細胞は増殖をつづけマウスは死亡する。) 二次移植；一次移植細胞を拒絶したマウスに一次移植と同様に Meth A 細胞を腹腔移植すると、一次移植より明らかに早期に Meth A 細胞は拒絶されることまでは確認済みである。しかし、二次移植が早期に拒絶される原因としてなんらかの免疫記憶が作用していることは確かであるが、この二次拒絶が抗体関連型であるか否かを確認しなければならない。抗体が関与しているか否かを確認するために、二次移植拒絶反応時のマウス腹腔を PBS で洗浄し腹腔浸潤細胞 (PEC) 得て、この PEC に含まれる細胞を FACS で解析する。

二次移植時におけるアロ活性化マクロファージ (AIM) によるアロ細胞障害の確認：
Meth A 細胞は CTL で破壊されないいわゆる CTL 抵抗性の腫瘍であるが、AIM；allograft-induced macrophages は嘔み切る様な直接障害でこの Meth A 細胞を拒絶できることを我々は確認済みである。二次移植時に急速に拒絶される Meth A 細胞の AIM によるものと推定しているが、これも二次移植時の PEC から FACS により M の分画とリンパ球分画を分離し、⁵¹Cr-releasing assay により細胞障害活性のある分画が一次拒絶と同じ AIM (M) の分画であることを確認する。補体の影響を避けるために、実験に使用する細胞培養用の RPMI1640 に添加する牛血清は、添加前にすべて 56 に加温し補体を非動化したものを使用した。

AIM によるアロ細胞障害活性と抗体の関連：
二次移植モデルの PEC (S-PEC) から AIM を得る、この AIM により Meth A 細胞が細胞される細胞障害活性の強度を ⁵¹Cr-releasing assay で測定する。この際、標的とする Meth A 細胞を、一次感作した B6 マウスの腹腔内に Meth A を 2 時間注入しおいたものと、感作していない B6 マウスの腹腔においた Meth A との間で、AIM の細胞障害活性の差を比較する。このことで抗体に感作された Meth A とそうでない Meth A 細胞に対する AIM の反応の差をみた。

4. 研究成果

まず、一次移植 (初期感作)；マウスの MHC class である H-2D 方の異なる移植モデルと

して、C57Bl/6 マウス (B6 マウス ; H-2Db) に H-2Dd の系統のマウスである DBA マウス由来の線維肉腫細胞である Meth A 腫瘍細胞を腹腔内移植。この移植 Meth A 細胞は腫瘍であるため腹腔内で増殖をつづけるが、その後、アロであるために拒絶反応がおこり移植後 7 日を最大として減少に転じ、14 日後には拒絶されマウス腹腔内から消滅する。この際に腹腔内浸潤して免疫を担当する細胞群を腹腔浸潤細胞(PEC)として抽出し、抗体と免疫担当細胞群である PEC の関連を ^{51}Cr releasing assay を用いて調査した。同様の実験を二次移植モデルとして、一次移植細胞を拒絶したマウスに一次移植と同様に Meth A 細胞を腹腔移植したところ、一次移植より明らかに早期に Meth A 細胞は拒絶された。通説のとおり二次移植が早期に拒絶される原因として免疫記憶により早急に抗体が産生され免疫を早急に賦活したものと考えられた。

これらの PEC 中の免疫担当細胞を *in vitro* で吸着することで PEC の細胞障害活性を強く減弱させることを確認した。つまり、PEC に含まれる effector 細胞が抗体を利用し、アロ拒絶反応において補体によらない細胞障害活性の経路を持っているものと示唆された。また、PEC 中の AIM を *in vivo* でも吸着し除くことで、それぞれ PEC の細胞障害活性を強く減弱させることを確認した。つまり、PEC に含まれる effector 細胞の主体は AIM であると考えられた。

まず、一次移植における PEC の細胞障害活性が IgG の大量投与により抑制可能か否を検証したが、*in vitro* での ^{51}Cr releasing assay において IgG を添加したところ細胞障害活性の減弱傾向がみられた。しかし、IgG 添加なしでの細胞障害活性が 25-30% と低く、この減弱効果は有意とは断定できなかった。

ところが、二次移植における S-PEC では、*in vitro* において、マウス非特異 IgG 抗体を添加することで S-PEC の細胞障害活性が有意に低下することを確認した。さらに S-PEC より M (Allograft Induced Macrophage ; AIM) 分画をセルソーターで抽出し、AIM の障害活性を調査したところ、AIM の細胞障害活性は非特異的 IgG 抗体により有意に減衰することから拒絶反応における AIM 細胞障害活性に IVIG が作用すると判断した。

逆に ^{51}Cr releasing assay でターゲット (標的) となる Meth A 細胞を一次移植でアロ感作済みのマウスに腹腔内移植を一時的 (2 時間後に再抽出) に行い感作すると、コントロールとして感作していないマウスの腹腔に一時的に置いた場合と比して、移植後 7 日のマウスから得た PEC の細胞障害活性が有意に高くなることを確認した。(つまり、初回 C57Bl/6 マウスの腹腔内に移植して 2 時間後に抽出した Meth A 細胞をターゲットとした場合と、アロ感作マウスの腹腔内に一時的移植された Meth A をターゲット細胞とした場合、後者の Meth A の方が破壊されやす

い。)これは、ターゲットの細胞表面にアロに対する抗体が付着することで、AIM の障害活性がオプソニン効果で高まっていたものと推定される。

<まとめと考察>二次移植マウスから得られる S-PEC のうちリンパ球、顆粒球とアロ活性化マクロファージ(AIM)をそれぞれ Facs セルソーターで分離してそれぞれの細胞障害を評価したが、アロ Meth A 細胞に対する細胞障害活性が最も高い分画は AIM であり、この AIM の細胞障害活性は IVIG による抑制を受けることを確認した。つまり、AIM の細胞障害活性は大量の非特異的 IgG 抗体により有意に減弱することが判明した。

上記の結果から、IVIG の作用機序は補体の非存在 (非動化) 下では、AIM の effector 作用を低下させることが中心であると考えられた。今後、補体を非動化しない状態で IVIG の AIM に対する抑制効果の評価と Meth A 以外の細胞やアロ移植でも効果を検証する必要もあると考えられた。

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

1. 能見勇人, 平野 一, 松永 知久, 前之園良一, 吉川勇希, 辻野拓也, 斉藤賢吉, 高井朋聡, 内本泰三, 高原 健, 稲元輝生, 木山 賢, 東治人. アロ移植細胞拒絶におけるアロ活性化マクロファージの攻撃細胞としての役割. 第 103 回日本泌尿器科学会総会. 金沢都ホテル(石川県金沢市) 2015 年 04 月 18 日.

2. 能見勇人, 平野 一, 前之園 良一, 西本優大, 松永知久, 吉川勇希, 斉藤賢吉, 内本泰三, 南 幸一郎, 木山 賢, 東 治人. アロ活性化マクロファージによるアロ細胞拒絶機構に関する検討. 第 50 回日本移植学会総会. 京王プラザホテル(東京都新宿区) 2014 年 09 月 11 日.

3. 能見勇人, 吉川勇希, 前之園 良一, 松永知久, 市橋 淳, 小林大介, 辻野拓也, 反田直木, 内本泰三, 上原博史, 平野 一, 高原 健, 稲元輝生, 東 治人. アロ移植細胞拒絶におけるマクロファージのエフェクター細胞としての役割. 第 66 回日本泌尿器科学科中部総会. 四日市市文化会館(三重県四日市市) 2016 年 10 月 29 日.

[図書](計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

能見 勇人 (Nomi Hayahito)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80418938

(2) 研究分担者

東 治人 (Azuma Haruhito)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：40231914