

## 抗血液型抗体中和療法—ABO 血液型不適合移植に対する新たな治療戦略

長谷川康<sup>1)</sup>, 田辺稔<sup>1)</sup>, 加藤幸成<sup>2)</sup>, 金子美華<sup>2)</sup>, 島津元秀<sup>3)</sup>, 河地茂行<sup>1)</sup>, 尾原秀明<sup>1)</sup>, 篠田昌宏<sup>1)</sup>, 成松久<sup>2)</sup>, 北島政樹<sup>4)</sup>, 北川雄光<sup>1)</sup>

- 1)慶應義塾大学医学部外科
- 2)産業技術総合研究所糖鎖医工学研究センター
- 3)東京医科大学八王子医療センター消化器外科
- 4)国際医療福祉大学三田病院

### 【はじめに】

ABO 血液型不適合肝移植は、グラフト上の血液型抗原とレシピエント血清中の抗血液型抗体との抗原抗体反応による液性拒絶のために成績が著しく不良であった<sup>1,2)</sup>。グラフトにおける local DIC を制御するための門脈注入療法や抗血液型抗体を除去するための血漿交換および脾臓摘出により、血液型不適合肝移植の成績は改善された<sup>3-5)</sup>。しかしながら、血液型一致および適合症例に比べるとその成績は劣っており<sup>6)</sup>、新たな対策が講じられるべきである。

液性拒絶は、抗原とその抗原に対する抗体が存在して初めて起こりうる。そのため、ABO 血液型不適合肝移植における液性拒絶を抑制するために、レシピエント血清中の抗 ABO 血液型抗体の除去および産生の抑制が行われている。しかしながら、グラフトの ABO 血液型抗原を除去もしくは減弱化する試みは臨床応用されていない。そこで、われわれは血液型抗原に対するモノクローナル抗体を用いることにより、血液型抗原の抗原性を抑制および中和できるかを検討した。

### 【抗血液型 Fab 抗体による血液型抗原の中和】

#### 1. 抗 A 型 Fab 抗体の作製と意義

今回の実験で使用する抗 A 型モノクローナル抗体として K7508 (マウス IgG ; 科警研の大森毅先生と (株) 特殊免疫研究所とが共同で作製した抗体を (株) 特殊免疫研究所から購入) <sup>7)</sup> を選択した。この抗体が A 型抗原に特異的に反応することを flow cytometry および ELISA で確認した(図 1)。また、免疫組織染色の一次抗体としても使用することができた(図 2)。

ここで抗体の一般的な構造について述べるが、抗体は大まかに分けると Fab (Fragment, antibody binding) と Fc (Fragment, crystallizable) に分けることができる(図 3)。Fab は抗原結合活性を有し、Fc はエフェクター分子や細胞と相互作用するという役割を持つ<sup>8)</sup>。ABO 血液型不適合移植では、抗原抗体複合体の Fc に C1q が結合し、補体反応が活性化され拒絶反応が起こ<sup>9-11)</sup>。このとき抗体に Fc がなければ、補体の活性化が惹起されず液性拒

絶が起こらない可能性がある。そこで、K7508 をパパインで分解することで Fc を取り除き Fab 抗体(K7508Fab)を作製して、今回の実験に使用することとした。

K7508Fab が A 型抗原に特異的に反応するかどうかを flow cytometry, ELISA, および免疫組織染色で検討したところ、K7508 とほぼ同様の反応性を有することが示された(図 1)。この K7508Fab と A 抗原を結合させることで抗 A 抗体と A 抗原の反応を阻害し、液性拒絶を抑制することができると考えた。

## 2. A 型抗原の中和

まず、細胞上の A 型抗原を K7508Fab で中和できるかを検討した。A 型抗原を発現している細胞として、A 型赤血球および A431(epidermoid carcinoma cell line, 東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより入手)<sup>12)</sup>を使用した。これらの細胞に K7508 ではない抗 A 抗体(IgM 抗体)を一次抗体、抗マウス IgM-FITC を二次抗体として flow cytometry を行うと吸光度のピークが右方移動する。これに対して、A 型赤血球もしくは A431 と K7508Fab を反応させた後に、抗 A 抗体(IgM 抗体)を用いて flow cytometry を施行すると吸光度のピークはほぼ移動しなかった(図 4)。この flow cytometry の結果は、K7508Fab が細胞上の A 抗原と抗 A 抗体との反応を阻害したということを示している。

つづいて、組織上の A 型抗原を K7508Fab で中和できるかを検討した。組織は A 型のヒトの肝組織切片を使用した。この肝組織切片に対して抗 A 抗体(ウサギ抗体)を一次抗体、抗ウサギ HRP を二次抗体として免疫組織染色を施行すると、肝動脈、門脈、および赤血球が染色される。ところが、肝組織切片を K7508Fab と反応させた後に同様の免疫組織染色を施行すると、先ほどは染色されていた肝動脈、門脈、および赤血球がまったく染色されなかった(図 5)。つまり、組織上の A 型抗原と抗 A 抗体の反応が K7508Fab によって阻害されたといえる。

次に、生体内において K7508Fab が A 抗原を中和できるかを検討した。A431 をグラフト、マウスをレシピエントに見立て、A431 をマウスに腹腔内投与することで移植モデルとした。ABO 血液型不適合移植において、抗ドナー血液型抗体価の上昇は液性拒絶の指標の一つである。そこで、マウス血清中の抗 A 抗体価を ELISA にて測定し、その推移を検討した。A431 を腹腔内投与されたマウスの抗 A 抗体価は投与後一週で急激に上昇し、その後も上昇を続けた。それに対して、K7508Fab と反応させた A431 を腹腔内投与されたマウス血清中の抗 A 抗体価は投与後一週で上昇するものの、その値は有意に低値であった。また、投与後二週以降は抗体価の上昇を認めなかった(図 6)。この結果より、A431 を K7508Fab と反応させることで、A 型抗原を中和しマウスの抗 A 抗体産生を抑制することができたと考えられる。

### 【考察】

ABO 血液型不適合肝移植において問題となるのは、抗原抗体反応による補体の活性化および凝固系の亢進とその結果として起こるグラフト不全である<sup>1-3,8)</sup>。抗体の Fc が欠如し

ていると補体の活性化が起こらないことが知られているため<sup>8-10</sup>、**put in** 前にグラフトの血液型抗原を Fab 抗体で中和することで液性拒絶を防ぐことができると考えた。抗血液型 Fab 抗体による血液型抗原の中和の特徴は、①血液型抗原に特異的に作用すること、②グラフト灌流中に施行できることである。

現在行われている血漿交換による抗体の除去、脾摘、および抗 CD20 モノクローナル抗体は血液型抗原に対して特異的な治療ではなく、感染症などの観点からはデメリットもある。それに対して、抗血液型抗体は血液型抗原に特異的であるため過度の免疫抑制が必要なくなり、その結果として感染症のリスクを軽減できる可能性がある。また、今回の中和実験は 4℃で施行しており、冷保存中のグラフトに抗血液型 Fab 抗体を灌流させることによって血液型抗原を中和することができると考えられる。

### 【おわりに】

今回の実験の問題点は、移植モデルとして細胞とマウスを使用しており臓器を用いていないこと、および、抗体価の上昇を見ているだけで拒絶の有無に関する検討をしていないことである。今後の研究課題としては、ABO 血液型不適合臓器移植モデルの確立とそのモデルにおける中和療法の効果を検討することである。

これらの課題を検討し良い結果を得ることができれば、抗血液型 Fab 抗体による血液型抗原の中和は ABO 不適合肝移植の新たな補助療法として有用となる可能性があると考えられた。

### 【Figure legends】

図 1. K7508 および K7508Fab の反応性を flow cytometry(A-H)および ELISA(I,J)で確認した。Flow cytometry において、K7508 と K7508Fab は A 型赤血球および A431 とは反応したが(A,B,G,H)、B 型赤血球および O 型赤血球とは反応しなかった(C-F)。ELISA においても、K7508 と K7508Fab は A 型抗原に特異的に反応した(I,J)。また、IgG 抗体であることも確認された。

図 2. ヒト肝組織切片の免疫組織染色である。K7508 により A 型の肝動脈、門脈、および赤血球が染色された(A)。K7508Fab でも同様に A 型の肝動脈、門脈、および赤血球が染色された(B)。B 型および O 型の肝組織は染色されなかった(C,D)。

図 3. (A) 抗体の構造。抗体は、抗原結合性を持つ Fab と、エフェクター分子と相互作用する Fc に分けることができる。(B) 抗原抗体反応では抗原抗体複合体の Fc に C1q が結合し、補体反応が活性化され拒絶反応が起こる。(C) Fab 抗体で抗原をブロックすると C1q が結合しないため、補体の活性化が惹起されず液性拒絶が起こらない可能性がある

図 4. Flow cytometry による細胞の中和実験。A 型赤血球と K7508Fab を反応させることで、他の抗 A 抗体との反応を阻害することができた (A)。A431 を用いた実験でも同様の結果を得ることができた (B)。太線エリアは K7508Fab による中和を行った細胞。濃灰色エリアは中和を行っていない細胞。薄灰色エリアはネガティブコントロール。

図 5. 肝組織切片の中和実験。A 型ヒト肝組織切片を抗 A 型ウサギ抗体で免疫組織染色をすると、肝動脈、門脈、および赤血球が染色された(A)。しかし、K7508Fab を用いて A 型抗原を中和することにより、肝動脈、門脈、および赤血球が染色されなくなった (B)。

図 6. マウス生体内での中和実験。A431 をマウスの腹腔内に投与し、血清中の抗 A 抗体価を ELISA で測定した。A431 を単独で投与した群に比べて、K7508Fab で A 型抗原を中和した A431 を投与した群では抗 A 抗体価が有意に低値であった。

#### 【文献】

- 1) Gugenheim J, Samuel D, Reynes M, et al. Liver transplantation across ABO blood group barriers. Lancet 1990 ; 336 : 519-523.
- 2) Demetris AJ, Jaffe R, Tzakis A, et al. Antibody-mediated rejection of human orthotopic liver allografts. A study of liver transplantation across ABO blood group barriers. Am J Pathol 1988 ; 132 : 489-502.
- 3) Tanabe M, Shimazu M, Wakabayashi G, et al. Intraportal infusion therapy as a novel approach to adult ABO-incompatible liver transplantation. Transplantation 2002 ; 73 : 1959-1961.
- 4) Kozaki K, Kasahara M, Oike F, et al. Apheresis therapy for living-donor liver transplantation : experience for apheresis use for living-donor liver transplantation at Kyoto University. Ther Apher 2002 ; 6 : 478-483.
- 5) 日本 ABO 血液型不適合移植研究会. 第 13 回学術集会, 肝移植の統計. 2006 年 8 月 6 日.
- 6) 日本肝移植研究会. 肝移植症例登録報告. 移植 2006 ; 41 : 599-608.
- 7) 第74回日本生化学会, 分泌型及び非分泌型のヒト唾液中のA型物質に対するモノクロー

ナル抗体の作製, 生化学, 73巻8号 p. 696, 2001年

8) Janeway C. Immunobiology : the immune system in health and disease. 6th ed. New York : Garland Science, 2005.

9) Duncan AR, Winter G. The binding site for C1q on IgG. Nature 1988 ; 332 : 738-740.

10) Kilchherr E, Schumaker VN, Phillips ML, et al. Activation of the first component of human complement, C1, by monoclonal antibodies directed against different domains of subcomponent C1q. J Immunol 1986 ; 137 : 255-262.

11) Haga H, Egawa H, Shirase T, et al. Periportal edema and necrosis as diagnostic histological features of early humoral rejection in ABO-incompatible liver transplantation. Liver Transpl 2004 ; 10 : 16-27.

12) Parker PJ, Young S, Gullick WJ, et al. Monoclonal antibodies against the human epidermal growth factor receptor from A431 cells. Isolation, characterization, and use in the purification of active epidermal growth factor receptor. J Biol Chem 1984 ; 259 : 9906-9912.