

2024年8月6日

“ヒト RP105 抗体は抗原特異的な抗体産生を増強する”  
～移植拒絶を引き起こすドナー特異的抗体や自己免疫疾患での病因抗体  
検出感度向上に期待～

愛知医科大学医学部感染・免疫学講座の山崎達也講師、高村祥子教授及び腎疾患・移植免疫学寄附講座の岩崎研太准教授らの研究グループは、京都橘大学、大阪大学免疫学フロンティア研究センター、日本赤十字社愛知医療センター名古屋第二病院及び愛知医科大学医学部外科学講座（腎移植外科）との共同研究により、ヒト RP105 抗体（クローン名：MHR73）のみによる刺激で末梢血 B 細胞を強く活性化できる方法を見出し、さらにヒト RP105 抗体と CpGDNA<sup>\*1</sup> の同時刺激で抗原特異的な抗体産生の誘導に成功しました。またヒト RP105 抗体刺激では B 細胞の増殖因子を誘導し、一方で CpGDNA 刺激では抗体産生細胞への分化に関わる因子を誘導することが判明しました。これら異なる刺激の作用があいまって、抗原特異的な抗体産生につながると考えられました。本研究におけるヒト B 細胞活性化方法は、移植拒絶や自己免疫疾患でのドナーHLA 特異的抗体 (Donor specific HLA antibody, DSA) や病因抗体の検出感度の向上や、易感染性の免疫不全症でのワクチン抗原抗体レベルの増強など、将来的に臨床応用につながる可能性があります。本研究成果は、2024年8月3日に米国科学誌『iScience』でオンライン公開されました。

【本研究成果のポイント】

- ヒト RP105 抗体単独で B 細胞に強い活性化を誘導できる方法を見出しました。
- ヒト RP105 抗体と CpGDNA の同時刺激で抗原特異抗体の誘導に成功しました。
- ヒト RP105 抗体刺激では B 細胞の増殖因子が誘導され、一方で CpGDNA 刺激では抗体産生細胞への分化に関わる因子が誘導されることが明らかとなりました。
- 本研究のヒト B 細胞活性化方法は、移植拒絶や自己免疫疾患での DSA や病因抗体の検出感度の向上や、免疫不全症における抗原特異的抗体レベルの増強などの臨床応用に発展する可能性があります。

# PRESS RELEASE

## I. 研究の背景

B細胞は強く活性化されると抗体を産生する細胞に変化します。一方で刺激が入らないと死にやすく、特にヒトB細胞の安定的な培養は特に難しい技術とされています。どのような抗体を産生するのか調べるためにはヒトB細胞に強い活性化を誘導できるような刺激物が必要です。

RP105分子は、病原体認識タンパク質のひとつToll-like receptor (TLR) 4<sup>\*\*2</sup>によく似た構造をしており、B細胞をはじめとする免疫担当細胞に発現しています。マウスにおいて抗RP105抗体は強くB細胞を活性化することが知られており、ワクチンアジュバント<sup>\*\*3</sup>としても有用であることがインフルエンザウイルスの実験系などで示されていました。ところが、ヒトRP105抗体でヒト末梢血中のB細胞を刺激してもその活性化作用は低いため、レチノイン酸やIL-21などの追加の添加物質が必要であり、抗RP105抗体のみでのヒトB細胞の活性化機構の研究は困難でした。ヒト末梢血B細胞に抗体産生を促す培養法は多くのリコンビナントサイトカインなどを必要とするなどコストが高くなり、さらにその再現性にも多くの課題があり、簡便でかつ再現性の高い方法が望まれていました。

## II. 研究内容

我々は研究の過程で、細胞培養液を一般的なRPMI1640からAIM-V<sup>\*\*4</sup>に変更したところ、ヒトRP105抗体によるB細胞増殖作用が約3.7倍上昇し、AIM-V条件下では、

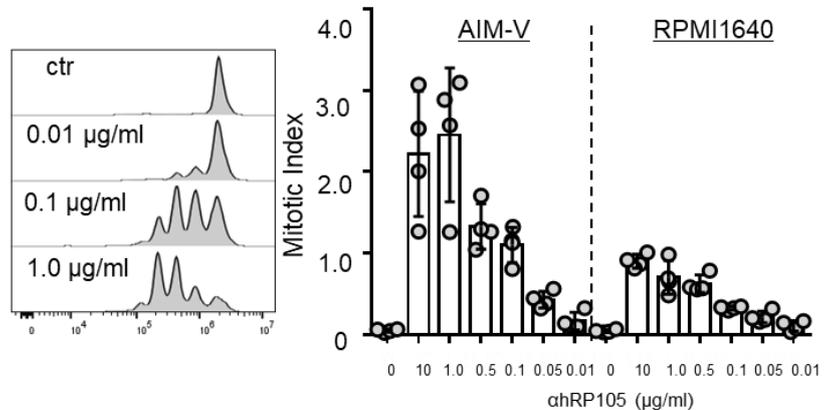
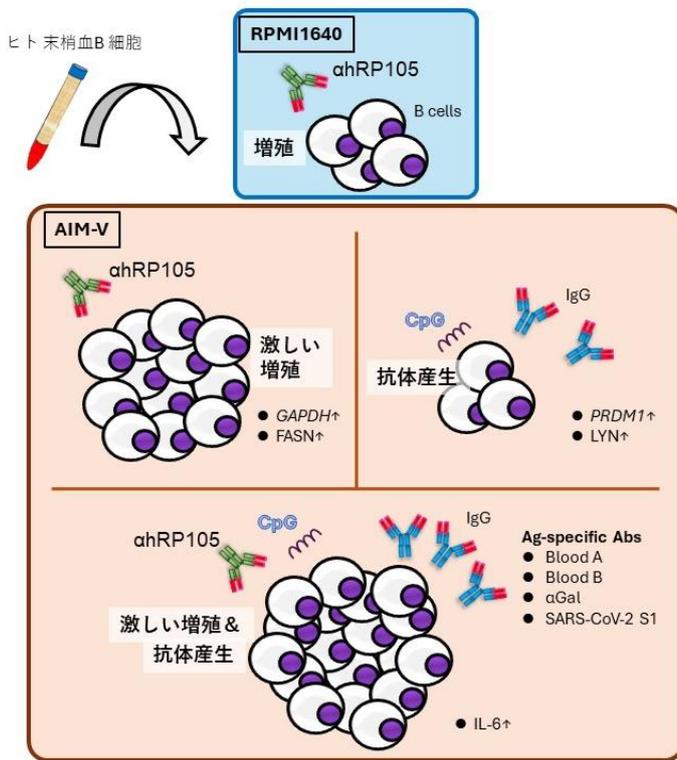


図1 ヒトRP105抗体刺激の培養液の違いによるB細胞増殖の比較

RPMI1640を用いた場合の100分の1の抗体量で同程度の増殖作用を示すことがわかりました(図1)。この活性化増強作用には、AIM-V中に含まれるトランスサイレチンやハプトグロビンが関与していることがわかりました。さらに単一細胞RNA sequencing (sc-RNAseq)解析により、ヒトRP105抗体刺激によってCD86などの活性化マーカーや細胞周期関連因子、NF-κBファミリーなどのmRNAレベルが上昇することがわかりました。またTLR9の発現上昇も確認され、以前の報告と合致していました。

PRESS RELEASE



TLR9のリガンドである CpGDNA もヒト B 細胞を活性化することが知られていることから、ヒト RP105 抗体刺激との違いについて比較解析を行いました。まず細胞増殖や活性化マーカー (CD38, CD80) レベルについて解析したところ、ヒト RP105 抗体刺激の方が CpGDNA 刺激に比べて、有意に高いことが分かりました。一方で、刺激によって B 細胞から産生される総 IgG 抗体レベルは、CpGDNA 刺激の方が有意に高いという結果が得られました。また定量 PCR 法や LC/ESI-MS/MS を用いて解析したところ、ヒト RP105 抗体刺激では、代謝関連因子 (*GAPDH* (mRNA),

図 2 ヒト RP105 抗体、CpGDNA の単独刺激および同時刺激によるヒト B 細胞活性化作用 Fatty Acid Synthase [*FASN*]) のレベルが有意に上昇し、CpGDNA 刺激では、B 細胞分化に重要な因子 (*PRDM1*(mRNA)) や B 細胞内シグナル因子 (*LYN*) のレベルが有意に上昇することも分かりました (図 2)。以上の結果から、ヒト RP105 抗体刺激は B 細胞に高レベルの細胞増殖と活性化を誘導し、CpGDNA 刺激では抗体産生を誘導するということが明らかになりました。

このような特徴をもつ両者で、B 細胞を同時に刺激して、B 細胞サブセットの割合の変化をフローサイトメーターで解析しました。その結果、クラススイッチされたメモリー B 細胞

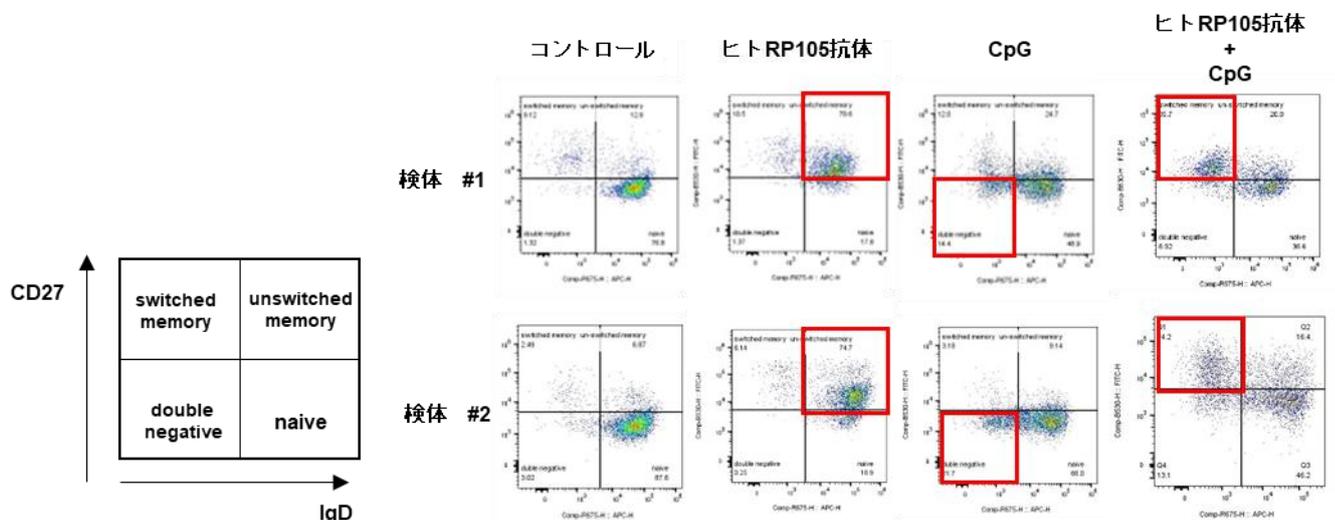


図 3 ヒト RP105 抗体、CpGDNA の単独刺激および同時刺激による B 細胞サブセットの割合の変化

# PRESS RELEASE

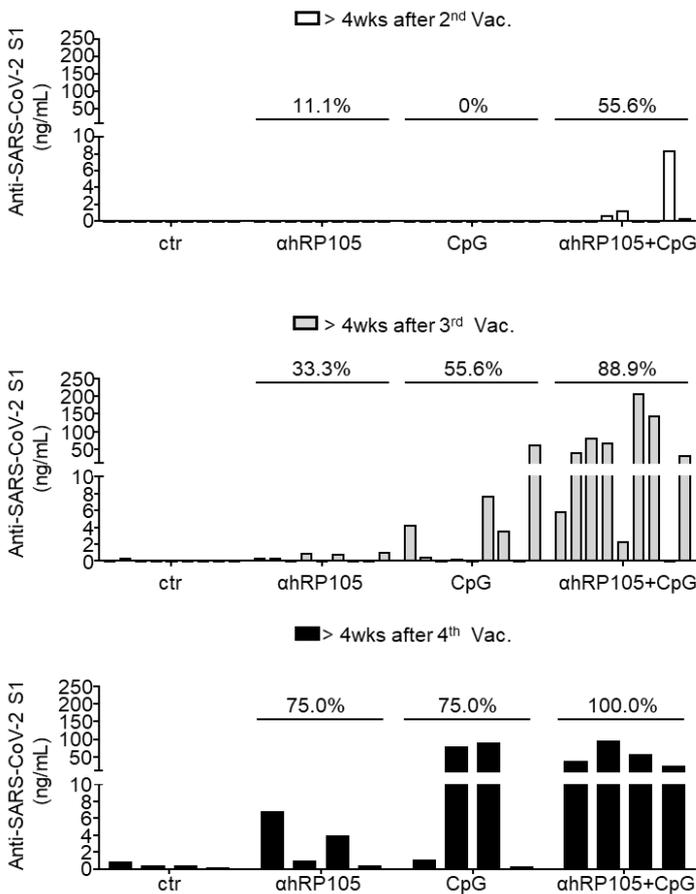


図4 上清中の抗 SARS-CoV-2 S1 抗体価

(switched memory, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>)の割合が増加しました(図3)。これは、それぞれ単独刺激とは異なる結果となりました(ヒト RP105 抗体刺激:クラススイッチされていないメモリーB細胞 (unswitched memory, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>)の割合が増加、CpGDNA 刺激:クラススイッチマーカーとメモリーB細胞マーカーが両方陰性のB細胞(double negative, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>)の割合が増加)。また両方で刺激されたB細胞の上清中では、IL-6<sup>\*5</sup>や血液型抗体(抗A抗体, 抗B抗体)や糖鎖抗体(抗 $\alpha$ Gal抗体)を検出することができました(図2)。これらは、それぞれ単独刺激では、ほとんど検出されませんでした。最後に新型コ

ロナウイルス(SARS-CoV-2)ワクチンを接種した健常人から採取した末梢血B細胞を、ヒトRP105抗体とCpGDNAで同時に刺激して10日間培養し、上清中のSARS-CoV-2 S1抗原に対する抗体価を測定しました。その結果、2回目ワクチン後では55.6%、3回目ワクチン後では88.9%、4回目ワクチン後では100%の検体で、特異抗体を認めることができました(図4)。以上より、AIM-V培養下で、ヒトRP105抗体とCpGDNAで同時にB細胞を刺激すると、抗原特異的抗体産生を誘導できることが分かりました。

### Ⅲ. 今後の展開

臓器移植の場合、ドナーHLA特異的抗体(DSA)の存在が拒絶の原因として大きな問題になります。血清中にこのような抗体が検出されたときにはすでに拒絶反応が進行していることが課題です。このような抗体を産生するB細胞を今回の方法を用いて分化・増殖させ、DSAを同定することで、ドナーHLA特異的抗体産生B細胞を事前に検出でき免疫抑制剤強化などによる移植臓器の長期生着率の向上が期待されます。また自己免疫疾患においても、今回の方法で自己

## PRESS RELEASE

---

抗体（病因抗体）産生 B 細胞の検出感度を上げることで、疾患解明につながる結果が得られる可能性もあります。また将来的には、免疫不全症の患者さんから B 細胞を取り出し、微生物に対して反応する B 細胞をヒト RP105 抗体で刺激して増やして体内に戻したり、ヒト RP105 抗体をワクチン接種時のアジュバントとして利用したりなどといった、新しい感染症対策に発展させられる可能性も考えられます。本研究の、AIM-V を用いたヒト RP105 抗体刺激による B 細胞活性化法は、移植拒絶や自己免疫疾患、免疫不全症における病態解明や治療開発につながることで期待されます。

### IV. 用語説明

- ※1 CpG DNA: DNA 中に存在するシトシンとグアニンがホスホジエステル結合でつながった DNA 配列。哺乳類ではメチル化されることが多いのに対して、細菌やウイルスではメチル化されていない（非メチル化）ことが知られている。非メチル化 CpG DNA は TLR9 を強く活性化してさまざまな免疫応答を引き起こす。
- ※2 Toll-like receptor (TLR) 4: TLR は細菌やウイルスなどの特徴的な構造（分子パターン）を見分けるセンサー（受容体）で、主にマクロファージや樹状細胞などの自然免疫系の細胞が発現している。ヒトでは現在までに 10 種類の TLR (TLR1~10) の存在が確認されており、中でも TLR4 は大腸菌などのグラム陰性菌の細胞膜に局在する LPS (リポ多糖) の活性中心・LipidA (リピド A) を認識し、免疫応答を起こす。
- ※3 ワクチンアジュバント: ワクチンと一緒に投与して、その効果（免疫原性）を高めるために使用される物質のこと。
- ※4 AIM-V: 市販されている無血清培地で、アレルギー領域のヒト末梢血リンパ球機能の研究や、ヒト末梢血での抗原特異的リンパ球増殖反応の測定などにおいての使用報告がある。
- ※5 IL-6: 活性化 B 細胞を抗体産生細胞に分化させるサイトカイン（主に免疫系細胞から分泌されるタンパク質で、極めて微量で生理作用を示し、細胞間の情報伝達を担う）。IL-6 は多彩な生物活性を有することが知られており、炎症反応においても中心的な役割を果たしていることが示されている。

### V. 研究成果の公表

本研究成果は、2024 年 8 月 3 日（米国時間）、iScience 誌オンライン版として掲載されました。

論文題名:

Human RP105 monoclonal antibody enhances antigen-specific antibody production in unique culture conditions (ヒト RP105 モノクローナル抗体による新規培養条件下での抗原特異的抗体産生促進作用)

山崎達也 (Tatsuya Yamazaki)<sup>1</sup>, 岩崎研太 (Kenta Iwasaki)<sup>2</sup>, 伴野勸 (Susumu Tomono)<sup>1</sup>, 今井優樹 (Masaki Imai)<sup>3</sup>, 三輪祐子 (Yuko Miwa)<sup>2</sup>, 雫真人 (Masato Shizuku)<sup>4</sup>, 安次嶺聡 (Satoshi

---

## PRESS RELEASE

Ashimine)<sup>4</sup>, 石山宏平 (Kohei Ishiyama)<sup>4</sup>, 乾匡範 (Masanori Inui)<sup>1</sup>, 奥崎大介 (Daisuke Okuzaki)<sup>5</sup>, 岡田学 (Manabu Okada)<sup>6</sup>, 小林孝彰 (Takaaki Kobayashi)<sup>4</sup>, 高村 (赤司) 祥子 (Sachiko Akashi-Takamura)<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 愛知医科大学 医学部感染・免疫学講座

<sup>2</sup> 愛知医科大学 医学部腎疾患・移植免疫学寄附講座

<sup>3</sup> 京都橘大学

<sup>4</sup> 愛知医科大学 医学部外科学講座 (腎移植外科)

<sup>5</sup> 大阪大学免疫学フロンティア研究センター

<sup>6</sup> 日本赤十字社愛知医療センター名古屋第二病院

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.110649>

本研究は日本学術振興会科学研究費助成事業 (JP21K09385, JP15K15472, JP19K08500, JP16H05465)、愛知医科大学ユニット支援費、東京大学医科学研究所共同研究事業の支援を受けて行われました。

### 本件に関するお問い合わせ先 (研究内容)

愛知医科大学医学部 腎疾患・移植免疫学寄附講座 准教授 岩崎 研太  
TEL: 0561-62-3311 (内線 13854)  
e-mail: kentaiwasaki@aichi-med-u.ac.jp

愛知医科大学医学部 感染・免疫学講座 教授 高村 祥子  
TEL: 0561-62-3311 (内線 12366)  
FAX: 0561-63-3645  
e-mail: sachiko@aichi-med-u.ac.jp

### (報道に関すること)

愛知医科大学 庶務課  
Tel: 0561-61-5396, Fax: 0561-62-6690  
e-mail: syomu@aichi-med-u.ac.jp