(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年6月28日(28.06.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/117011 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/04 (2006.01)　*C12N 5/0781* (2010.01)
G01N 33/53 (2006.01)　*C12N 5/0783* (2010.01)
C07K 14/52 (2006.01)　*C12N 5/0786* (2010.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2017/045267

(22) 国際出願日：　2017年12月18日(18.12.2017)

(25) 国際出願の言語：　日本語

(26) 国際公開の言語：　日本語

(30) 優先権データ：
特願 2016-245749　2016年12月19日(19.12.2016) JP

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (**OSAKA UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 Osaka (JP).

(72) 発明者: ▲高▼原 史郎 (**TAKAHARA, Shirou**); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 松田 佳子 (**MATSUDA, Yoshiko**); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 鮫島 睦，外 (**SAMEJIMA, Mutsumi** et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町８番１号梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）

(54) Title: METHOD FOR IN VITRO EARLY DIAGNOSIS OF POST-ORGAN-TRANSPLANTATION ANTIBODY MEDIATED REJECTION USING IgM-TYPE MEMORY B CELL DIFFERENTIATION CULTURE SYSTEM

(54) 発明の名称： インビトロでのＩｇＭ型メモリーＢ細胞分化培養系を用いた臓器移植後抗体関連型拒絶反応の早期診断法

(57) Abstract: Provided is a means for detecting the occurrence of an antibody mediated rejection (ABMR) in a patient after organ transplantation simply and at an early stage without requiring carrying out an organ biopsy. A method for detecting the occurrence of an antibody mediated rejection (ABMR) *in vitro* in a patient after organ transplantation, said method including culturing a peripheral blood sample collected from the patient in the presence of a humoral factor and/or an inflammatory cytokine from an activated T cell and then detecting an IgM-type DSA in a culture supernatant, wherein a fact that the IgM-type DSA is detected is the indicator for the occurrence of ABMR; and a kit which can be used for performing the method.

(57) 要約：臓器移植後の患者において抗体関連型拒絶反応（ABMR）の有無を臓器の生検によることなく簡便かつ早期に検出する手段を提供する。臓器移植後の患者において抗体関連型拒絶反応（ABMR）の有無をインビトロで検出する方法であって、患者からの末梢血試料を、活性化T細胞からの液性因子および／または炎症性サイトカインの存在下で培養し、培養上清中のIgM型DSAを検出することを含み、その際、IgM型DSAの検出がABMRの存在の指標となる前記方法、および該方法に使用するキット。

WO 2018/117011 A1

明　細　書

発明の名称 ：

インビトロでのＩｇＭ型メモリーＢ細胞分化培養系を用いた臓器移植後抗体関連型拒絶反応の早期診断法

技術分野

[0001] 本発明は、IgM型メモリーB細胞を用いた臓器移植後の抗体関連型拒絶反応（antibody mediated rejection; 以下、「ABMR」ともいう）の早期診断法に関する。詳細には、本発明は、臓器移植後の患者において抗体関連型拒絶反応（ABMR）の有無をインビトロで検出する方法、および臓器移植後の患者においてABMRの有無をインビトロで検出するためのキットに関する。

背景技術

[0002] 臓器移植は慢性の臓器不全患者にとり、生活の質の改善、さらに生命維持の点からも大変効果的な治療法である。しかしながら、本邦においては欧米諸国と比較し、提供される臓器が大幅に不足しており、腎臓について言えば、腎不全患者の多くは生命維持のため透析医療に頼っている。さらに肝臓、心臓、肺移植などでは臓器の廃絶が死に直結しており、臓器提供を受ける機会は限られている。また、幸いにも臓器提供を受けた患者においても再度の臓器提供の機会はほぼ望むことができない。つまり、移植臓器の機能をより長期間保持する必要性が、移植医療の普及した欧米諸国と比較し、本邦ではより高い。一方で移植短期予後は著明に改善しているものの、抗体関連型拒絶反応（antibody mediated rejection; ABMR）に関連した、5～10年以降の長期成績は改善されていない。ABMRは、病態が進行すると不可逆的に移植臓器の微小血管が障害を受けるため早期診断が必要である。現状では組織生検が唯一の早期診断法であるが侵襲が高く、頻回に行うことが困難である。それゆえ、早急に臨床応用可能な、簡便性、経済性、再現性の高い、新しい免疫モニタリング法の開発が望まれている。

[0003] 近年、高感度のHLA抗体測定法（Single antigen beadsを用いたLuminex te

chnologyによる解析：LABScreenなど）の開発により、抗ドナーHLA抗体（Donor Specific HLA Antibody；以下、「DSA」ともいう）とABMRとの関連が明らかにされた（非特許文献１、非特許文献２）。そこでABMR制御の可能性を求めて、移植後の血清中モニタリングが実施されているが、その有効性は明らかになっていない。その理由の一つとして、DSA検出の限界がある。初期の段階では、DSAはグラフトに吸着されるため、末梢血中では検出されにくい（非特許文献３）。そこで、TTSガイドラインにおいても移植後1年目以降での血清中からの測定は推奨されていない。DSA産生が多量となりグラフトからoverflowした状況、またはグラフトへの血流が低下した状況において初めて、末梢血でDSAが検出される。そのため、ABMRの進行を血清中DSAで正確にモニタリングできない可能性がある。しかしながら、インビトロにおいて患者の抗体産生細胞（形質細胞）から産生されるDSAを検出できれば、産生されるDSAは移植臓器への吸着の影響を受けないため、血清中よりも早期に検出可能であり、液性免疫反応の進行状況をより鋭敏に把握することが可能である。そこで抗原特異性の観点からもIgG型DSAが注目され、インビトロ末梢血B細胞培養上清中からの検出が試みられてきた。数施設においてすでに末梢血B細胞培養上清中より、IgG型DSAの検出に成功しているが、検出に末梢血を30ml以上要する点と血清と比較して得られる情報に限界があるため、臨床応用には至っていない（非特許文献４）。形質細胞は、骨髄、二次リンパ組織に存在し、末梢血中にはほとんど存在しないため、末梢血でのモニタリングはほぼ不可能と考えてよい。

[0004] これまで、腎臓移植等の臓器移植の拒絶を診断またはモニタリングする方法としては、移植対象において異なって発現される遺伝子に基づくものや（特許文献１、特許文献２、特許文献３、特許文献４、特許文献５、特許文献６、特許文献７、特許文献８、特許文献９、特許文献１０、特許文献１１、特許文献１２）、ポリペプチドマーカーに基づくもの（特許文献１３、特許文献１４、特許文献１５、特許文献１６、特許文献１７、特許文献１８）が知られている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表２００５－５３６２３０

特許文献2：特表２００７－５２０２０９

特許文献3：特表２００８－５４５４４４

特許文献4：特表２００８－５４５４４５

特許文献5：特表２００８－５４５４４６

特許文献6：特開２００９－１９５２３４

特許文献7：特表２００９－５２９３４０

特許文献8：特表２００９－５３２０４７

特許文献9：特表２０１０－５２４４２７

特許文献10：特表２０１１－５１５０６８

特許文献11：特表２０１３－５０９８８３

特許文献12：特表２０１６－５３１５８０

特許文献13：特表２００８－５４５１３０

特許文献14：特表２０１１－５２２２６７

特許文献15：特表２０１２－５０６５３７

特許文献16：特表２０１２－５０６５３８

特許文献17：特表２０１２－５０８３８２

特許文献18：特表２０１２－５１００５８

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Significance of qualitative and quantitative evaluations of anti-HLA antibodies in kidney transplantation. Transplant International 2011; 24(2); 150-157.

非特許文献2：HLA antibodies and chronic rejection: From association to causation. Transplantation 2008; 86; 377-383.

非特許文献3：Detection of donor-specific HLA antibodies before and after removal of a rejected kidney transplant. Transplant Immunology 20

10; 22(3-4); 105-109.

非特許文献4：Peripheral blood B cells producing donor-specific HLA antibodies in vitro. Hum Immunol. 2009; 70(1);29-34.

非特許文献5：腎移植臨床登録集計報告（2010）-3 2009年経過追跡調査結果 日本臨床腎移植学会.日本移植学会 雑誌2010; 45; 608.

非特許文献6：Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. Am J Transplant 2011; 11; 450-62.

非特許文献7：APRIL promotes cell-cycle progression in primary multiple myeloma cells: influence of D-type cyclin group and translocation status. Blood 2011; 117(3); 890-901.

非特許文献8：BAFF production by antigen‐presenting cells provides T cell co‐stimulation. Int. Immunol 2004; 16(3); 467-475.

非特許文献9：An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. Blood 2009; 114(25); 5173-81.

非特許文献10：Clinical Relevance of HLA Antibody Monitoring after Kidney Transplantation. Journal of Immunology Research volume 2014; Article ID 845040.

非特許文献11：Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. Transplantation 2008; 86(3):377-83.

非特許文献12：All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. Transplantation 2002; 74(8):1192-4.

非特許文献13：Regulation of CXCR3 and CXCR4 expression during terminal differentiation of memory B cells into plasma cells. Blood 2005; 105(10): 3965-71.

非特許文献14：Unique properties of memory B cells of different isotypes. Immunol Rev 2010; 237(1): 104-16.

非特許文献15：Early differentiated CD138(high) MHCII+ IgG+ plasma cells express CXCR3 and localize into inflamed kidneys of lupus mice. PLoS One 2013; 8(3).

非特許文献16：Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. Proc Natl Acad Sci U S A2012; 109(7): 2485-90.

非特許文献17：Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. Blood 2004; 104(12): 3647-54.

非特許文献18：Repression of the transcription factor Bach2 contributes to predisposition of IgG1 memory B cells toward plasma cell differentiation. Immunity 2013; 25;39(1): 136-47.

非特許文献19：Antigen-specific memory B cell development. Annu Rev Immunol 2005; 23: 487-513.

非特許文献20：Impact of IgM and IgG3 anti-HLA alloantibodies in primary renal allograft recipients. Transplantation 2014; 97(5): 494-501.

非特許文献21：Why do we need IgM memory B cells?. Immunol Lett 2013; 152(2): 114-20.

非特許文献22：In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. Nat Commun 2011; 2; 465.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 上記のように、DSAとABMRとの関連が明らかにされ、移植後の血清中DSAモニタリングが実施されているが、初期の段階ではDSAはグラフトに吸着されるため、末梢血中では検出されにくい。移植後の血清中DSAは、DSA産生が多量となりグラフトからoverflowした状況、つまりABMRがかなり進行した後でないと検出することができなかった。また、IgG型DSAのインビトロ末梢血B細胞培養上清中からの検出が試みられてきたが、IgG型メモリーB細胞は抗原感作

後、2度目の抗原侵入に備えて２次リンパ組織もしくは炎症組織に局在することが知られている。それゆえ、IgG型メモリーB細胞は、臓器が移植された周辺の２次リンパ組織（例えば腎移植においては内外腸骨動脈リンパ組織）に高頻度に局在し、末梢中を循環している可能性は低いことが予測される。さらに、IgG型DSAの検出には末梢血を30ml以上要するうえ、血清と比較して得られる情報に限界があるため、臨床応用には至っていない。

[0008] このように、現在に至るまで、移植後の血清中DSAを早期にモニタリングする方法は確立されていない。また、IgG型DSAを検出する場合には末梢血が30ml以上必要となるため患者負担が大きいことや、血清と比較して得られる情報に限界があることから臨床応用には至っていないといいう問題があった。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、患者末梢血単核球を用いてインビトロで特にIgM型メモリーB細胞から抗体産生細胞まで分化、培養する系を確立し、上清中に分泌される抗体を解析することで移植後の血清でのIgM型DSAの産生を早期にモニタリングすることが可能であることを見出した。

[0010] IgG型メモリーB細胞は抗原感作後、2度目の抗原侵入に備えて２次リンパ組織もしくは炎症組織に局在することが知られている。それゆえ、DSAに対応したIgG型メモリーB細胞は、例えば腎移植においては内外腸骨動脈リンパ組織に高頻度に局在し、末梢中を循環している可能性は低いことが予測される。また組織局在性にはケモカインレセプターなどの発現が関与することが報告されている。一方、DSAに対応したIgM型メモリーB細胞においてはこれらのケモカインレセプターの発現に関する報告が認められていない。以上より、本発明者らはIgM型メモリーB細胞はより高い頻度で末梢中を循環していると予想した。しかしながら、IgM型抗体は感作後、短期間のみ血清中から検出されるがその後検出されなくなる。それゆえ、培養上清中からIgM型抗体を検出するには、通常は膜型として存在するIgM型メモリーB細胞をインビトロにおいて分泌型（抗体産生細胞）まで分化誘導する必要があった。また実際の臨床においては病態の進行した拒絶反応症例においてのみ、血清中からIgM型DSA

が検出されることが報告されており、本発明者らはIgM型メモリーB細胞の分泌型への分化には炎症性サイトカインもしくは活性化T細胞からの液性因子などが重要な役割が果たしていると予測した。そこで末梢血単核球培養条件にProtein kinase C、T cell receptor stimulatorを添加することでT細胞もしくはマクロファージを刺激し、前記炎症性サイトカインおよび活性化T細胞からの液性因子の産生を促した。その結果、安定して培養上清中からのIgM型DSAの検出が可能となった。

[0011] 従って、本発明は以下を含む。

［１］臓器移植後の患者において抗体関連型拒絶反応（ABMR）の有無をインビトロで検出する方法であって、患者からの末梢血試料を、活性化T細胞からの液性因子および／または炎症性サイトカインの存在下で培養し、培養上清中のIgM型抗ドナーHLA抗体（Donor Specific HLA Antibody；以下、「DSA」という）を検出することを含み、その際、IgM型DSAの検出がABMR発症を早期診断するための指標となる前記方法。

［２］前記活性化T細胞からの液性因子および／または炎症性サイトカインの存在下での培養を、健常人単核球培養上清を添加することにより行う、上記［１］に記載の方法。

［３］臓器移植が腎移植である、上記［１］または［２］に記載の方法。

［４］患者からの末梢血試料の培養をB細胞に適した培養条件下で行う、上記［１］から［３］のいずれかに記載の方法。

［５］臓器移植後の患者において抗体関連型拒絶反応（ABMR）の有無をインビトロで検出するためのキットであって、患者からの末梢血試料を、活性化T細胞からの液性因子および／または炎症性サイトカインの存在下で培養する手段、及び、培養上清中のIgM型DSAを検出する手段を含み、IgM型DSAの検出がABMRの存在の指標となる前記キット。

［６］前記患者からの末梢血試料を、活性化T細胞からの液性因子および／または炎症性サイトカインの存在下での培養する手段が、健常人単核球培養上清を含む、上記［５］に記載のキット。

［７］臓器移植が腎移植である、上記［５］または［６］に記載のキット。

［８］前記患者からの末梢血試料を培養する手段が、前記患者からの末梢血試料をB細胞に適した培養条件下で培養する手段である、上記［５］から［７］のいずれかに記載のキット。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、臓器移植後の患者においてABMRの有無をインビトロで早期に検出することができる。これまでABMRの診断法として唯一の方法であった移植臓器の組織生検は、侵襲が高く、頻回に行うことが困難であったが、本発明によれば、少量の末梢血のみで非侵襲的に行うことが可能である。

[0013] 本発明による末梢血単核球培養上清からのIgM型DSAの検出は、血清からのIgG型DSA検出と対比すると、8mlという少量の末梢血で可能であること、IgG型メモリーB細胞はIgM型メモリーB細胞からクラススイッチするため、IgG型DSAより早期に検出されるなどの診断における利点がある。また治療においてもIgM型メモリーB細胞はIgG型と比較して既存の免疫抑制療法への治療反応性が高いことが示唆されている。以上より、培養上清中からのIgM型DSA抗体検出はABMRの早期診断、治療方法を新たな段階へと発展させることが期待される。

[0014] さらに、臓器移植は患者のQOLの改善の点、または生命維持からも非常に有用であるが、本発明によるIgM型DSAの検出は、医療経済におけるcost performanceも優れており、医療費節約への貢献も期待できる。また、本発明に従ってIgM型抗体を培養上清中から検出可能とすることで、これらの抗体の検出意義が再認識され、他分野（自己免疫性疾患など）における臨床への応用も期待することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図１は、HLA抗原に対する液性免疫反応の活性化レベルにより、末梢血中のHLA抗原に対応したIgG型メモリーB細胞もしくはIgM型メモリーB細胞の存在比に影響を及ぼすことを示す図である。

[図2A]図２Ａは、末梢血単核球培養上清中から検出されたIgM型HLA抗体は血

清中IgG型抗体とHLA抗体特異性が一致し、ドナー抗原に対する抗体も含まれていることを示す図である。

[図2B]図２Ｂは、末梢血単核球培養上清中から検出されたIgM型HLA抗体は血清中IgG型抗体とHLA抗体特異性が一致し、ドナー抗原に対する抗体も含まれていることを示す図である。図２Ｂ中、Supは末梢血単核球培養上清を示す。

[図3]図３は、IgM型メモリーB細胞の形質細胞への分化には活性化T細胞から産生される液性因子が重要な役割を果たしていることを示す図である。

[図4]図４は、IgM型メモリーB細胞はB cell receptorからの抗原刺激により、IgG型メモリーB細胞にクラススイッチすることを示す図である。

[図5]図５は、IgM型メモリーB細胞とIgG型メモリーB細胞のそれぞれの関係を示す模式図である。

[図6]図６は、B細胞表面上のIgM型B cell receptorをCross-linkingすることで抗原刺激の代わりにIgM型メモリーB細胞を刺激した結果を示す図である。

[図7]図７は、血清でのIgG/IgM DSAの比較を示す図である。

[図8]図８は、末梢血単核球（PBMC）培養条件にPHA-LおよびPMAを添加すると培養上清中で有意に多くのIgG,IgMを検出できることを示す図である。

[図9]図９は、移植直後に培養上清中からIgM DSAが検出され、その後、8日後に血清からIgG DSAが検出され、9日後にはABMRと診断されたことを示す図である。

[図10]図１０は、移植後8日目に採取したPBMC培養上清からIgM DSAが検出され、移植後28日目の血清からIgG DSAが検出されたことを示す図である。

[図11]図１１は、移植後67日目に採取したPBMC培養上清からIgM DSAが検出され、移植後133日目の血清からIgG DSAが検出されたことを示す図である。

[図12A]図１２Ａは、移植時にstandard immunosuppressive agentsの内服を開始した場合に、移植前後でIgG DSAの検出量は変わらなかったのに対し、IgM DSAの検出量は著明に減少していたことを示す図である。

[図12B]図１２Ｂは、移植時にstandard immunosuppressive agentsの内服を開始した場合に、移植前後でIgG DSAの検出量は変わらなかったのに対し、Ig

M DSAの検出量は著明に減少していたことを示す図である。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明は、DSAに対応したIgM型メモリーB細胞を分泌型にまでインビトロにて分化誘導し、培養上清中からIgM型DSAを検出し、抗体関連型拒絶反応（ABMR）の早期診断、治療に応用することを特徴とする。

[0017] ナイーブB細胞は抗原刺激により、まず胚中心においてIgM型メモリーB細胞へと分化し、さらなる抗原刺激により、IgG型へとクラススイッチする。IgM型メモリーB細胞は末梢血中を循環し、一方、IgG型メモリーB細胞は抗原の再侵入に備えて2次リンパ組織もしくは炎症組織へと移動し、局在する。

[0018] ドナー抗原に対応した、IgM型メモリーB細胞は感作後の抗原抗体の反応性が低い時点から末梢血中を循環し、さらにドナー抗原への液性免疫反応性が高まるとクラススイッチすることがインビトロにおいて確認されている。それゆえ、培養上清中からのIgM型DSAは血清中のIgG型DSAに比べて早期に検出されることが期待される。

[0019] DSAに対応した、IgM型メモリーB細胞はドナー抗原に対する液性免疫反応が賦活化していない、つまりABMR発症の比較的早期から末梢血中を循環していることが示唆された。一方、IgG型メモリーB細胞は、２次リンパ組織もしくは炎症反応に通常は局在化し、末梢血中を循環する頻度はIgM型と比較し低いため、末梢血B細胞培養上清中からはABMRが進行したもしくは移植臓器が拒絶されてしまった状況においてはじめて検出可能であることが予測された。

[0020] 抗原抗体特異性の点から、IgG型DSAが注目されてきたが、末梢血B細胞培養上清中からの検出に末梢血を30-40ml必要とされているうえ、血漿中と比較して得られる情報に限界があるため、臨床応用にはいたっていない。

[0021] 本発明者らは、IgG型メモリーB細胞は必ず、IgM型メモリーB細胞を経てナイーブB細胞から分化してくるため、血清中のIgG型DSAよりも早期に培養上清中からIgM型DSAが検出可能であること、ケモカインレセプター発現の関連からもIgG型と比較し、2次リンパ組織、炎症組織に局在化せず、末梢血中を高頻度で循環する可能性が高いことからIgM型DSAに着目した。これまで抗原特

異性に関する点以外にもIgM型DSAが注目されなかった理由として血清中からの検出率の低さにあり、拒絶反応が進行した一部の症例のみで検出可能であった。その理由として、IgM型メモリーB細胞は通常は膜型で存在し、分泌型へと分化しにくいと考えられる。本発明者らの研究結果では活性化T細胞からの液性因子と炎症性サイトカインなどが膜型から分泌型への分化に重要な役割を担っていることが示唆された。つまりインビトロにおいてこれらの液性因子を満たした条件下で培養することで、効率よく、DSAに対応したIgM型メモリーB細胞を抗体産生細胞まで分化誘導することが可能であることを見出した。さらに、末梢血8mlという少量で培養上清中からIgM型DSAを検出可能であるため、従来のABMR診断法である腎生検などと比較し、低侵襲で施行できる。以上より、本発明者らのインビトロアッセイ系は、IgM型メモリーB細胞の特性を生かすことでより早期により簡便にABMRを診断する画期的な手段となりうる。

[0022] 本発明において、患者からの末梢血試料の培養は、活性化T細胞からの液性因子および／または炎症性サイトカインの存在下で行われる。斯かる培養により、試料中に含まれるIgM型メモリーB細胞は分泌型に分化されるので、培養上清中からのIgM型DSAの検出が容易となる。ここで、活性化T細胞からの液性因子および／または炎症性サイトカインの存在下での培養は、例えば、健常人単核球培養上清を添加することにより行うことができる。

[0023] B細胞を培養する際に従来はCD40 ligand feeder cellを使用していた。しかしながら、活性化T細胞から産生される液性因子中にCD40 Ligandは含まれているため、本発明のアッセイ系ではCD40 ligand feeder cellを添加していない。またこれらのFeeder cellはIgM型B細胞のクラススイッチを促進するため、生理的な条件でのIgM型メモリーB細胞とIgG型メモリーB細胞から産生される抗体の存在比を評価できない可能性がある。本発明では、より生理的な状況で培養することでより生理的状況下でのIgM/IgGメモリーB細胞の存在比を評価している。

[0024] 本発明により、メモリーB細胞の分化増殖に活性化T細胞、炎症細胞からの

液性因子が重要な役割を果たしていることが明らかになった。それゆえ、本発明者らは末梢血単核球のまま培養を試み、その際にT細胞、炎症細胞を活性化させるサイトカインを添加した。従来は、末梢血単核球のままの培養はT細胞とB細胞とにおける増殖率、生存率が異なるため、T細胞のみが爆発的に分化増殖し、培地中のサイトカインなどを消耗してしまうため、B細胞の生存維持、分化増殖は困難であった。そこで、本発明では、B細胞に適した培養条件［Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma-Aldrich) with 10% fetal calf serum (Thermo Scientific HyClone, Logan, UT, USA) supplemented with 50 μg/ml human transferrin-selenium and 5 μg/ml human insulin (Gibco/Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)］下に培養を行った。

[0025] メモリーB細胞の分化増殖には細胞間の直接コンタクトによるサポートが重要な役割を果たしているが、末梢血単核球ごと培養することにより、より少量の末梢血（8ml）により結果をえることができる（B細胞まで分離して培養する場合は末梢血20～30ml以上採取する必要がある）。

[0026] 血清中からは病態に関係なくドナー抗原感作後はIgG DSAが産生されるが、末梢血中のメモリーB細胞は現在進行形で抗原に暴露されているかどうかで存在比が左右される。それゆえ、末梢血ではドナー抗原（移植臓器）に対応したメモリーB細胞の存在比は、非ドナー抗原（輸血歴、妊娠歴、感染歴など）に対応するメモリーB細胞と比べ存在比が高い。それゆえ、従来はSingle antigen beadsにより、ドナー抗原に対する抗体の有無を判断する必要があったが、末梢血ではFlowPRA screeningのみでドナー抗原に感作されているかどうかの判断を行うことができる。すなわち、末梢血においてメモリーB細胞由来の抗体を評価することで、簡単なスクリーニングのみでABMRに関連したより多くの臨床情報をえることができる。

[0027] 本発明を適用できると見込まれる具体的な態様としては、腎移植においては例えば以下が考えられる。

（１）腎移植後の患者から移植直後、さらに定期的（1～3ヶ月）に末梢血を8-16ml採取し、インビトロにおいて培養を行う。培養上清を解析し、IgM型DSA

（特にDSAs, C1q binding）が検出された症例においてDSA特異的IgMメモリーB細胞のアポトーシスを促進する免疫抑制剤（cellcept）さらにクラススイッチを抑制する免疫抑制剤（CNI）の増量を行う。

（２）腎移植後、3週目の症例から末梢血（8～16ml）を採取し、インビトロにおいて培養を行う。培養上清を解析し、IgM型DSA（特にDSAs, C1q binding）が検出されるかどうか確認する。検出された症例においてはcellcept, CNIの投与量を維持する。未検出例においては、cellceptの減量とCNIの早期中止を目標とする。再検査は1ヶ月後に行い、それを元に今後の治療方針を決定する。

（３）腎移植前例において移植前に末梢血を8-16ml採取し、インビトロにおいて培養を行う。培養上清を解析し、IgM型DSA（特にDSAs, C1q binding）が検出された症例においては移植時に再度ドナー抗原に感作されることにより、DSA特異的IgMメモリーB細胞が植後早期にDSA特異的IgGメモリーB細胞へとクラススイッチし、ABMR発症の原因になることが予測される。よってDSA特異的IgMメモリーB細胞のアポトーシスを促進する免疫抑制剤(cellcept)さらにクラススイッチを抑制する免疫抑制剤（CNI）を移植前より、内服を開始するなどして、移植後、早期のABMR発症を予防する。

[0028] 本発明はまた、上記態様を実施するためのキット、すなわち、臓器移植後の患者において抗体関連型拒絶反応（ABMR）の有無をインビトロで検出するためのキットであって、患者からの末梢血試料を、活性化T細胞からの液性因子および／または炎症性サイトカインの存在下で培養する手段、及び、培養上清中のIgM型DSAを検出する手段を含み、IgM型DSAの検出がABMRの存在の指標となる前記キットを提供する。

[0029] 以下、腎移植の場合の実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

実施例 1

[0030] 末梢血単核球の分離および培養

腎移植後のHLA抗原感作症例、腎移植レシピエントから末梢血8mlを採取し

た。末梢血からFicoll-Hypaque density gradient (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) を用いて単核球を分離し、培養した。培地はIscove's modified Dulbecco's medium (Sigma-Aldrich) に10% fetal calf serum (FCS; Thermo Scientific HyClone, NYSE, TMO) 、50μg/ml human transferrin-selenium and human insulin (Gibco Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) とサイトカインとして50ng/ml IL-21(Miltenyi Biotech)、2.5μg/ml phosphorothioate CpG-ODN 2006(Invivogen)、2.5μg/ml phytohemagglutinin (PHA) (Sigma)、15ng/ml phorbol 12-myristate-13 acetate (PMA)を添加したものであった。さらに末梢血単核球を24-well平底(5×10^5 cells/well)にて7日間培養した。

実施例 2

[0031] 末梢血B細胞の分離および培養

腎移植後のHLA抗原感作症例から末梢血8mlを採取し、単核球に分離し、さらにMACS separation (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany)を用いてCD19陽性B細胞を分離した。基本培地は単核球と同条件を用い、サイトカインは50 ng/ml IL-21、2.5μg/ml phosphorothioate CpG-ODN 2006、50ng/ml histidine-tagged soluble recombinant human CD40L (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)を添加したものであった。さらに健常人単核球培養上清として、輸血歴のない健康な男性10人から採取した末梢血単核球(CD19陽性B細胞を除いたもの)を24-well平底(1×10^6 cells/well)にて36時間培養し、培養上清を回収した。培地はRPMI1640に10%fetal calf serum (FCS; Thermo Scientific HyClone, NYSE, TMO)と2.5μg/ml phytohemagglutinin (PHA)(Sigma)、10ng/ml phorbol 12-myristate-13 acetate (PMA)を添加したものであった。健常人単核球培養上清を末梢血B細胞培養条件に5%添加し、24-well平底(1×10^5 cells/well)にて7日間培養した。

実施例 3

[0032] 末梢血単核球培養上清の解析

培養上清中にFlowPRA^R Class I & II Screening Test (One Lamda)を用いて

IgG型もしくはIgM型抗体、Class IあるいはClass II HLA抗体が産生されているかをスクリーニングした。さらに、陽性例においてはLuminex technologyを用いてHLA抗体のプロファイルの解析、抗ドナーHLA抗体の有無などを詳細に解析した。

実施例 4

[0033] 臨床検体解析

HLA抗原感作症例からの患者検体を用いて、確立したインビトロ培養系により産生された抗体と血清中の抗体を比較検討した。また、培養上清中のドナーHLA抗体の解析結果と実際の臨床経過、および腎生検の病理組織結果とを比較検討した。

実施例 5

[0034] HLA抗原に対する液性免疫反応の活性化レベルにより、末梢血中のHLA抗原に対応したIgG型メモリーB細胞もしくはIgM型メモリーB細胞の存在比に影響を及ぼす

De novo DSA陽性でABMR(-)、移植腎機能が安定した症例群(Group I)と、腎生検によりABMRと診断されているもしくはABMRにより移植腎が廃絶された症例(Group II)との2群に分類し、さらにコントロール群として移植後、血清中からのHLA抗体非産生症例群(Group III)に分類した。これらの症例から回収した末梢血単核球の培養上清をFlow PRAにてIgG型とIgM型それぞれにおいて解析を行った。

[0035] その結果、図１に示すように、Group IはClass I, IIにおいてIgM型HLA抗体(class I;31.76%, class II;11.15%)がGroup III(class I;18.1%, class II;1.0%)と比較し、有意に多く検出された(class I;p=0.014, class II;p=0.018)。一方、Group IIにおいてはIgG型HLA抗体がClass I, IIともGroup III(class I;2.04%,class II;2.21%)と比較し、有意に多く検出された(class I;p=0.01, class II;p=0.03)。

実施例 6

[0036] 末梢血単核球培養上清中から検出されたIgM型HLA抗体は血清中IgG型抗体とHL

A抗体特異性が一致し、ドナー抗原に対する抗体も含まれていた

Flow PRA screening法にて末梢血単核球培養上清からIgM型HLA抗体が検出された症例においてLABScreenを施行し、結果、de novo DSA陽性、腎機能安定症例においてはIgM型DSAも検出された(図２Ａ)。一方で移植腎拒絶群においてはDSAはIgG型、IgM型として検出された。また培養上清中からのIgG型DSAのMFI値は血清中と比較し、高値であり、IgG型DSAの移植腎への吸着が疑われた(図２Ｂ)。

実施例 7

[0037] IgM型メモリーB細胞の形質細胞への分化には活性化T細胞から産生される液性因子が重要な役割を果たしている

末梢血単核球培養上清からIgM型HLA抗体が検出された症例において、さらに末梢血をCD19陽性B細胞まで分離した。B細胞の培養条件に健常人単核球培養上清を添加した群と非添加群に分けて培養上清をFlow PRA screening法にて解析し、結果を比較検討した。

[0038] その結果、健常人単核球培養上清添加群においてのみ、IgM型HLA抗体が検出された（図３）。上清中には活性化T細胞から産生された液性因子さらにマクロファージなどからの炎症性サイトカインも含まれていることが予測される。それゆえ、これらの液性因子がIgM型メモリーB細胞の抗体産生細胞への分化に重要な役割を果たすことが示唆された。

実施例 8

[0039] IgM型メモリーB細胞は抗原刺激により、IgG型メモリーB細胞にクラススイッチする

培養上清中からIgM型HLA抗体のみが検出された10症例において抗原刺激の代わりにAffini Pure $F(ab)_2$ Fragment Goat anti-Human IgM (Jackson Immuno Research) を5μg/mlを培養条件に添加し、7日間培養した。培養上清を回収し、FLOW PRA screening法にて解析した。

[0040] その結果、7症例においてIgG型HLA抗体が検出された。さらにLABScreenにおいてもIgM型HLA抗体の一部がIgG型として検出されていた（図４）。以上よ

り、抗原刺激により、IgM型メモリーB細胞はIgG型へのクラススイッチが誘導されることが示唆された。IgM型メモリーB細胞とIgG型メモリーB細胞のそれぞれの関係を図５にまとめた。

[0041] 培養上清中のIgG/IgM DSA検出はドナー抗原に対する液性免疫反応の賦活化を反映している。さらに抗原特異的IgM型メモリーB細胞とIgG型メモリーB細胞との生体内での関係を調べるため、EBウイルス特異的抗体の解析を行った。

健常人から採取した、末梢血単核球(5×10^5 cells/well)を24-well flat-bottom plates にて培養した。サイトカインは基本培養条件としてIL-21 (50ng/ml)、CpG-ODN (2.5μg/ml)、phorbol myristate acetate (PMA)(2.5μg/ml)、phytohemagglutinin / leucoagglutinin (PHA-L)(15μg/ml)を添加した。さらにIgM BCRを介した抗原抗体反応の賦活化をin vitroで再現するためにAffini Pure $F(ab)_2$ Fragment Goat anti-Human IgM (5.2μg/ml)を添加した条件下においても７日間培養した。その後、培養上清を回収し、ELISAにてIgG/IgM EBV抗体濃度を測定した。基本培養条件下とAffini Pure $F(ab)_2$ Fragment Goat anti-Human IgM添加条件下における、培養上清中のIgG/IgM EBV抗体濃度を比較検討した。

[0042] B細胞表面上のIgM型B cell receptorをCross-linkingすることで抗原刺激の代わりにIgM型メモリーB細胞を刺激した。その結果、刺激群ではIgG EBV抗体が非刺激群に比べ有意に高値で検出され、一方、IgMは減少していた（図６）。このことから、末梢血中の抗原特異的IgM型メモリーB細胞はB cell receptorを介した抗原刺激によりＩｇG型へとクラススイッチすることがわかった。

比較例１

[0043] 血清でのIgG/IgM DSAの比較

健常人から採取した末梢血を遠心分離し、血清を分離した。その血清中のIgG/IgM EBV抗体濃度をELISAにて測定し、比較検討を行った。

[0044] その結果、血清からは病態に関係なくIgG DSAが検出され、一方、IgM DSA

の検出率は低く、疑陽性反応が多く認められた（図７）。

実施例 9

[0045] 末梢血単核球（PBMC）培養条件にPHA-LおよびPMAを添加すると培養上清中で有意に多くのIgG,IgMを検出できる

健常人から採取した、末梢血単核球(5×10^5 cells/well)を24-well flat-bottom plates にて培養した。サイトカインは基本培養条件としてIL-21（50ng/ml）、CpG-ODN（2.5μg/ml)、phorbol myristate acetate (PMA)(2.5μg/ml)、phytohemagglutinin / leucoagglutinin (PHA-L)(15μg/ml)を添加し、7日間培養した。またPMA, PHA-L非添加条件にても同様に7日間培養を行った。その後、培養上清を回収し、ELISAにてIgG/IgM抗体濃度を測定した。基本培養条件下とPMA, PHA-L非添加条件下における、培養上清中のIgG/IgM抗体濃度を比較検討した。

[0046] その結果、PBMC培養条件にPHA-L（T細胞活性化）およびPMA（チロシンキナーゼアクチベーター；炎症細胞などを活性化）を添加することで培養上清中から有意に多くのIgG, IgMを検出できた（メモリーB細胞由来の抗体を主に検出）（図８）。

実施例 10

[0047] 腎移植後症例においてもIgG DSAよりもIgM DSAが早期に培養上清から検出される

腎移植症例から採取した、末梢血単核球（5×10^5 cells/well）を24-well flat-bottom plates にて培養した。サイトカインは基本培養条件としてIL-21（50ng/ml)、CpG-ODN (2.5μg/ml)、phorbol myristate acetate (PMA)(2.5μg/ml)、phytohemagglutinin / leucoagglutinin (PHA-L)(15μg/ml)を添加し、7日間培養した。その後、培養上清を回収し、5倍に濃縮後、Flow PRA screening法にて解析し、陽性症例においてはさらにsingle antigen beads法にてHLA抗体の特異性、DSAの有無などの評価を行った。

[0048] その結果、血清からIgG DSAが検出されていない症例においても培養上清中からIgM DSAが検出された症例を認めた（図９～１１）。

図９において、移植直後に培養上清中からIgM DSAが検出され、その後、8日後に血清からIgG DSAが検出され、9日後にはABMRと診断された。図１０において、移植後8日目に採取したPBMC培養上清からIgM DSAが検出され、移植後28日目の血清からIgG DSAが検出された。図１１において、移植後67日目に採取したPBMC培養上清からIgM DSAが検出され、移植後133日目の血清からIgG DSAが検出された。

実施例 11

[0049] DSA特異的IgMメモリーB細胞は通常の免疫抑制療法で除去することができるが、DSA特異的IgGメモリーB細胞は脱感作療法などの強力な免疫抑制療法が必要である

移植前に末梢血単核球を採取し、培養上清からIgG DSAが検出された症例（1次移植にて移植臓器が拒絶）およびIgM DSAが検出された症例において、移植後にも末梢血単核球を採取し、培養上清中のIgG/IgM DSA推移を検討した。

２次移植前に採取した，末梢血単核球（5×10^5 cells/well）を24-well flat-bottom platesにて培養した。サイトカインは基本培養条件としてIL-21（50ng/ml)、CpG-ODN（2.5μg/ml)、phorbol myristate acetate (PMA)(2.5μg/ml)、phytohemagglutinin/leucoagglutinin (PHA-L)(15μg/ml)を添加し、7日間培養した。その結果、培養上清中から１次ドナー抗原に対するIgGあるいはIgM抗体が検出された症例において、移植後も末梢血単核球を採取し、同様に培養を行った。また培養上清を解析し、移植前と比べて１次ドナー抗原に対するIgGあるいはIgM抗体の検出量などを比較検討した。移植時にはサイモグロブリン（T細胞除去）、プレドニン、セルセプト、タクロリムスのstandard immunosuppressive agentsの内服を開始した。

[0050] その結果、移植前後でIgG DSAの検出量は変わらなかったのに対し、IgM DSAの検出量は著明に減少していた（図１２Ａ、図１２Ｂ）。このように、DSA特異的IgMメモリーB細胞は通常の免疫抑制療法で除去することができたのに対し、DSA特異的IgMメモリーB細胞は脱感作療法などの強力な免疫抑制療法が必要となることがわかった。

産業上の利用可能性

[0051] 本発明によれば、臓器移植後の患者においてABMRの有無をインビトロで早期に検出することができる。これまでABMRの診断法として唯一の方法であった臓器の生検は、侵襲が高く、頻回に行うことが困難であったが、本発明によれば、少量の末梢血のみで非侵襲的に行うことが可能である。

請求の範囲

[請求項1] 臓器移植後の患者において抗体関連型拒絶反応（antibody mediated rejection; 以下、「ABMR」という）の有無をインビトロで検出する方法であって、患者からの末梢血試料を、活性化T細胞からの液性因子および／または炎症性サイトカインの存在下で培養し、培養上清中のIgM型抗ドナーHLA抗体（Donor Specific HLA Antibody；以下、「DSA」という）を検出することを含み、その際、IgM型DSAの検出がABMR発症の早期診断の指標となる前記方法。

[請求項2] 前記活性化T細胞からの液性因子および／または炎症性サイトカインの存在下での培養を、健常人単核球培養上清を添加することにより行う、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 臓器移植が腎移植である、請求項１または２に記載の方法。

[請求項4] 患者からの末梢血試料の培養をB細胞に適した培養条件下で行う、請求項１から３のいずれかに記載の方法。

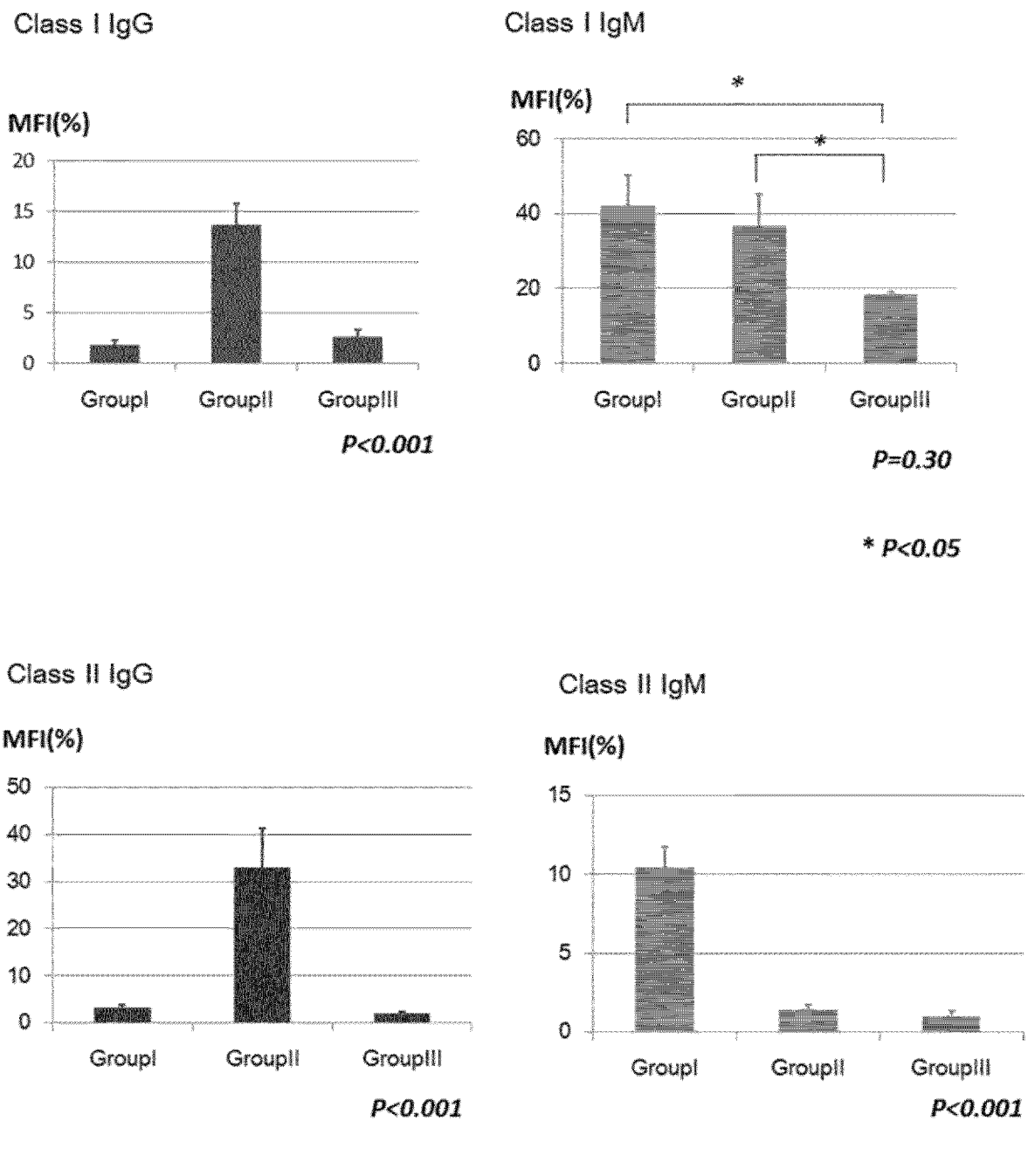
[請求項5] 臓器移植後の患者において抗体関連型拒絶反応（antibody mediated rejection; 以下、「ABMR」という）の有無をインビトロで検出するためのキットであって、患者からの末梢血試料を、活性化T細胞からの液性因子および／または炎症性サイトカインの存在下で培養する手段、及び、培養上清中のIgM型DSAを検出する手段を含み、IgM型DSAの検出がABMRの存在の指標となる前記キット。

[請求項6] 前記患者からの末梢血試料を、活性化T細胞からの液性因子および／または炎症性サイトカインの存在下での培養する手段が、健常人単核球培養上清を含む、請求項５に記載のキット。

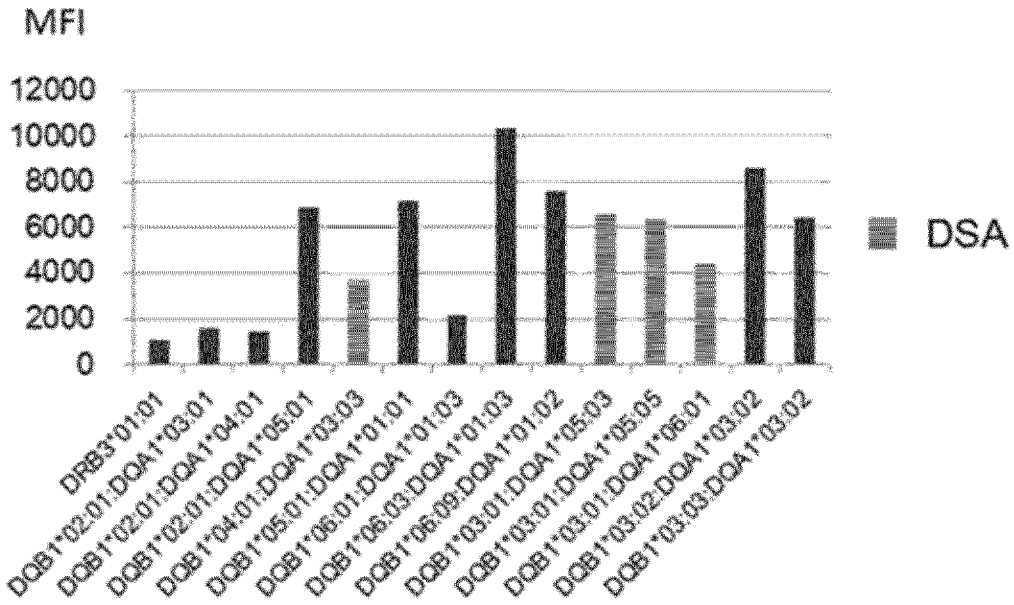
[請求項7] 臓器移植が腎移植である、請求項５または６に記載のキット。

[請求項8] 前記患者からの末梢血試料を培養する手段が、前記患者からの末梢血試料をB細胞に適した培養条件下で培養する手段である、請求項５から７のいずれかに記載のキット。

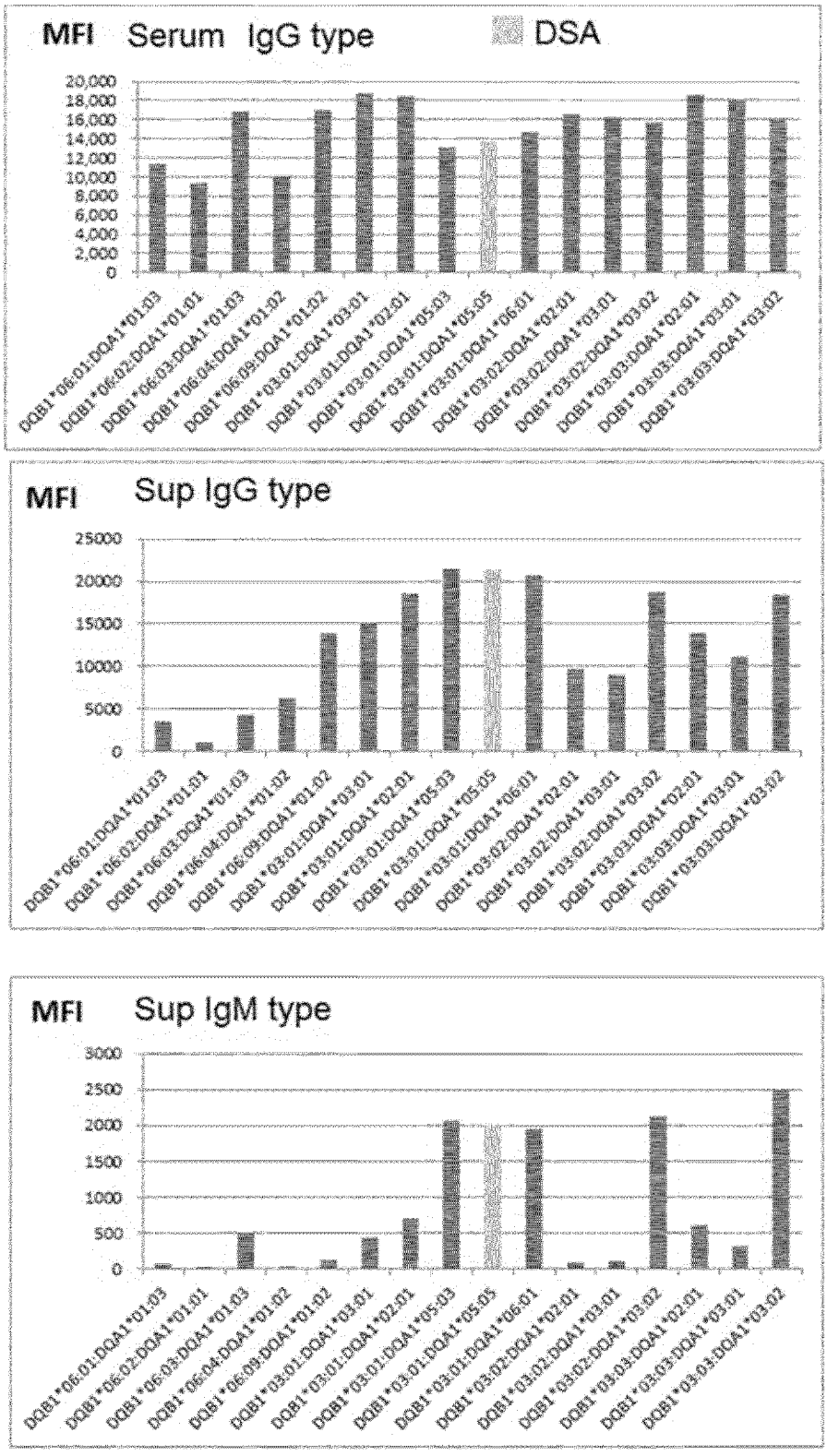
[図1]


Class I IgG
MFI(%)
20
15
10
5
0
GroupI
GroupII
GroupIII
P<0.001
Class I IgM
MFI(%)
*
*
60
40
20
0
GroupI
GroupII
GroupIII
P=0.30
* P<0.05
Class II IgG
MFI(%)
50
40
30
20
10
0
GroupI
GroupII
GroupIII
P<0.001
Class II IgM
MFI(%)
15
10
5
0
GroupI
GroupII
GroupIII
P<0.001

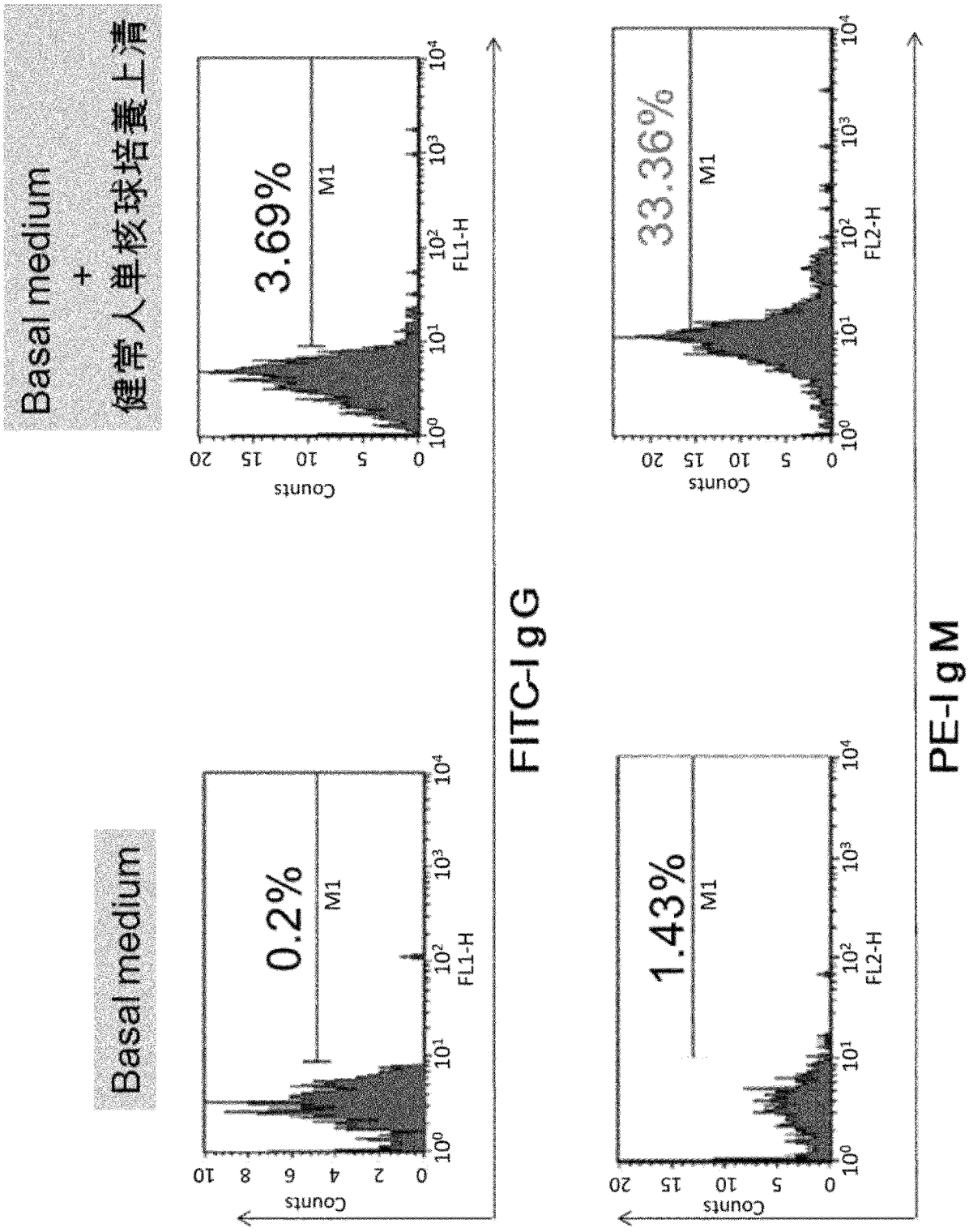
[図2A]


MFI
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
DSA
DRB3*01:01
DQB1*02:01:DQA1*03:01
DQB1*02:01:DQA1*04:01
DQB1*02:01:DQA1*05:01
DQB1*04:01:DQA1*03:03
DQB1*05:01:DQA1*01:01
DQB1*06:01:DQA1*01:03
DQB1*06:03:DQA1*01:03
DQB1*06:09:DQA1*01:02
DQB1*03:01:DQA1*05:03
DQB1*03:01:DQA1*05:05
DQB1*03:01:DQA1*06:01
DQB1*03:02:DQA1*03:02
DQB1*03:03:DQA1*03:02

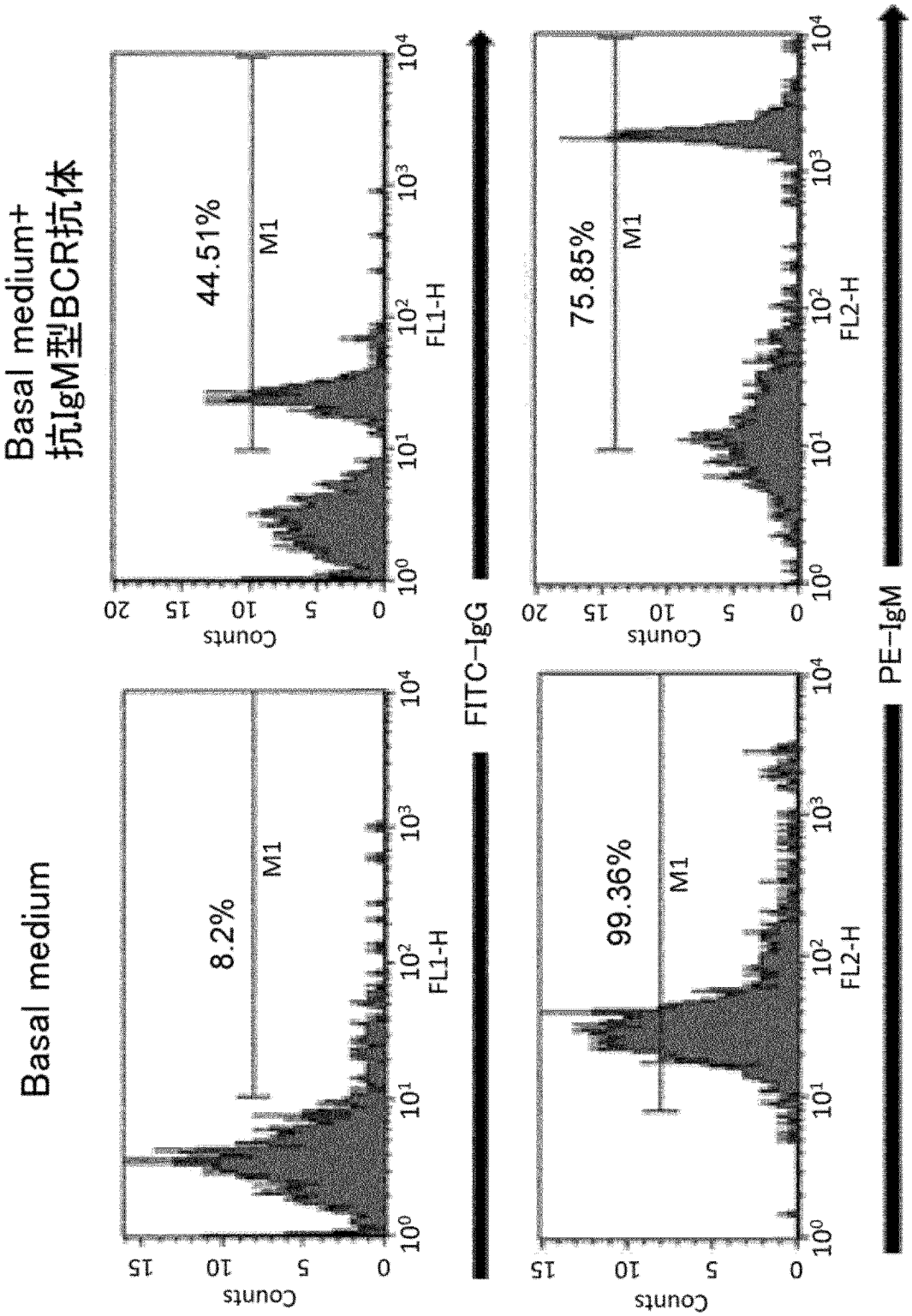
[図2B]


MFI Serum IgG type
DSA
20,000
18,000
16,000
14,000
12,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
DQB1*06:01:DQA1*01:03
DQB1*06:02:DQA1*01:01
DQB1*06:03:DQA1*01:03
DQB1*06:04:DQA1*01:02
DQB1*06:09:DQA1*01:02
DQB1*03:01:DQA1*03:01
DQB1*03:01:DQA1*02:01
DQB1*03:01:DQA1*05:03
DQB1*03:01:DQA1*05:05
DQB1*03:01:DQA1*06:01
DQB1*03:02:DQA1*02:01
DQB1*03:02:DQA1*03:01
DQB1*03:02:DQA1*03:02
DQB1*03:03:DQA1*02:01
DQB1*03:03:DQA1*03:01
DQB1*03:03:DQA1*03:02
MFI Sup IgG type
25000
20000
15000
10000
5000
0
DQB1*06:01:DQA1*01:03
DQB1*06:02:DQA1*01:01
DQB1*06:03:DQA1*01:03
DQB1*06:04:DQA1*01:02
DQB1*06:09:DQA1*01:02
DQB1*03:01:DQA1*03:01
DQB1*03:01:DQA1*02:01
DQB1*03:01:DQA1*05:03
DQB1*03:01:DQA1*05:05
DQB1*03:01:DQA1*06:01
DQB1*03:02:DQA1*02:01
DQB1*03:02:DQA1*03:01
DQB1*03:02:DQA1*03:02
DQB1*03:03:DQA1*02:01
DQB1*03:03:DQA1*03:01
DQB1*03:03:DQA1*03:02
MFI Sup IgM type
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
DQB1*06:01:DQA1*01:03
DQB1*06:02:DQA1*01:01
DQB1*06:03:DQA1*01:03
DQB1*06:04:DQA1*01:02
DQB1*06:09:DQA1*01:02
DQB1*03:01:DQA1*03:01
DQB1*03:01:DQA1*02:01
DQB1*03:01:DQA1*05:03
DQB1*03:01:DQA1*05:05
DQB1*03:01:DQA1*06:01
DQB1*03:02:DQA1*02:01
DQB1*03:02:DQA1*03:01
DQB1*03:02:DQA1*03:02
DQB1*03:03:DQA1*02:01
DQB1*03:03:DQA1*03:01
DQB1*03:03:DQA1*03:02

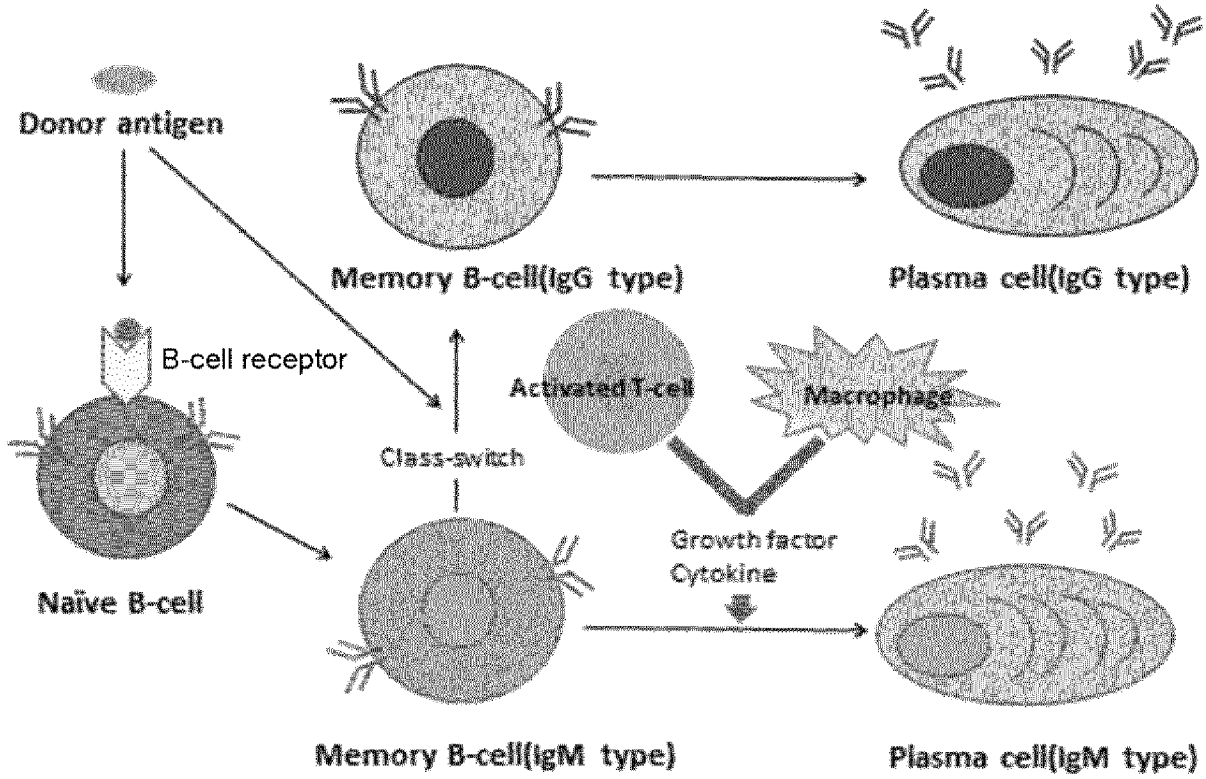
[図3]


Basal medium
+
健常人単核球培養上清
Basal medium
3.69%
33.36%
0.2%
1.43%
M1
Counts
FL1-H
FL2-H
FITC-IgG
PE-IgM

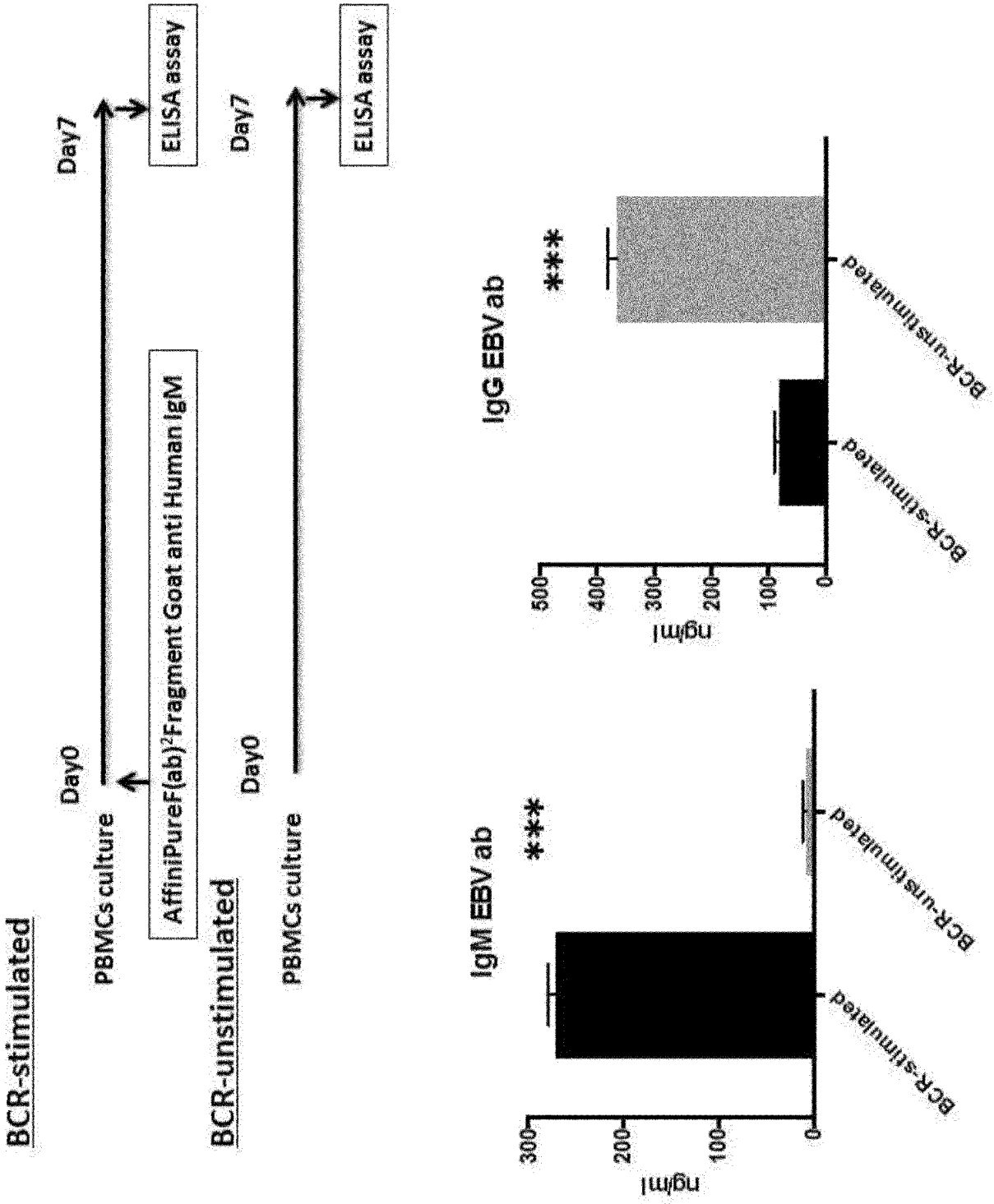
[図4]


Basal medium
Basal medium+
抗IgM型BCR抗体
8.2%
44.51%
99.36%
75.85%
M1
Counts
FL1-H
FL2-H
FITC−IgG
PE−IgM

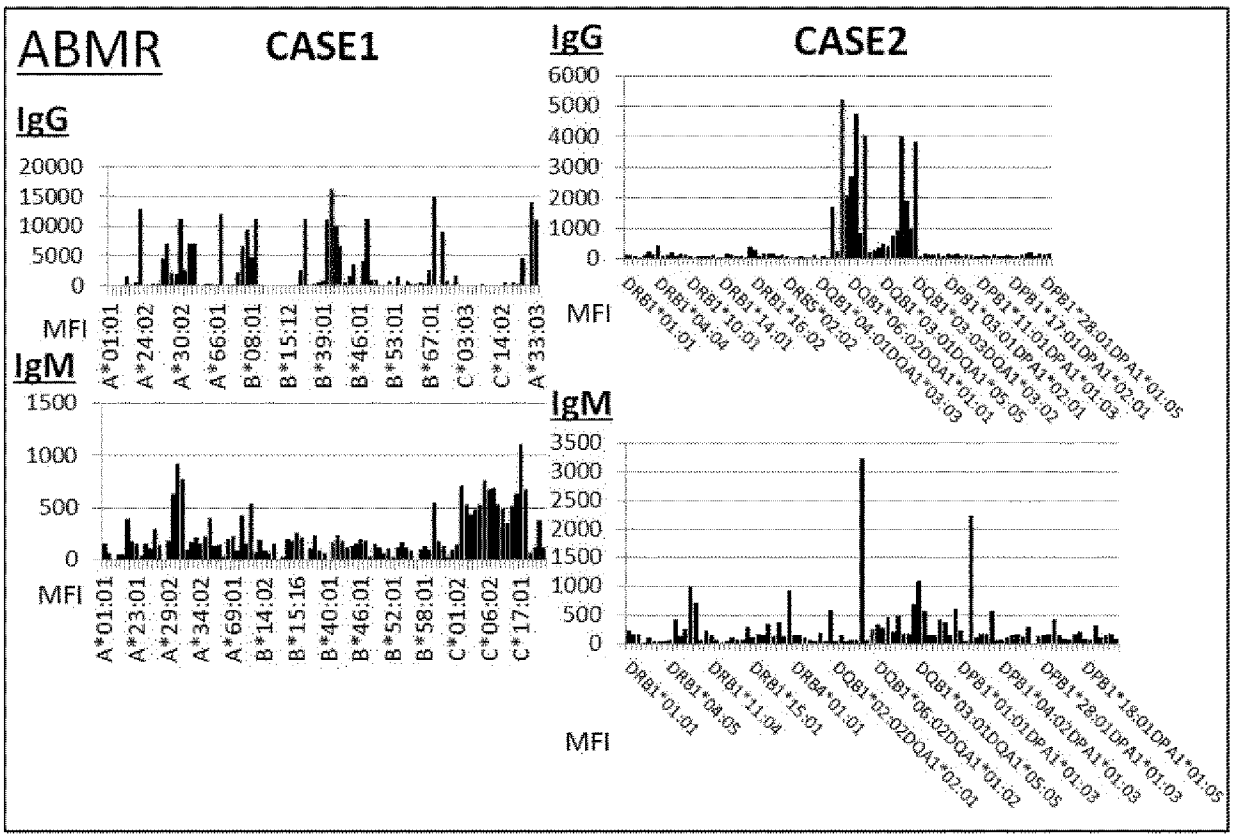
[図5]

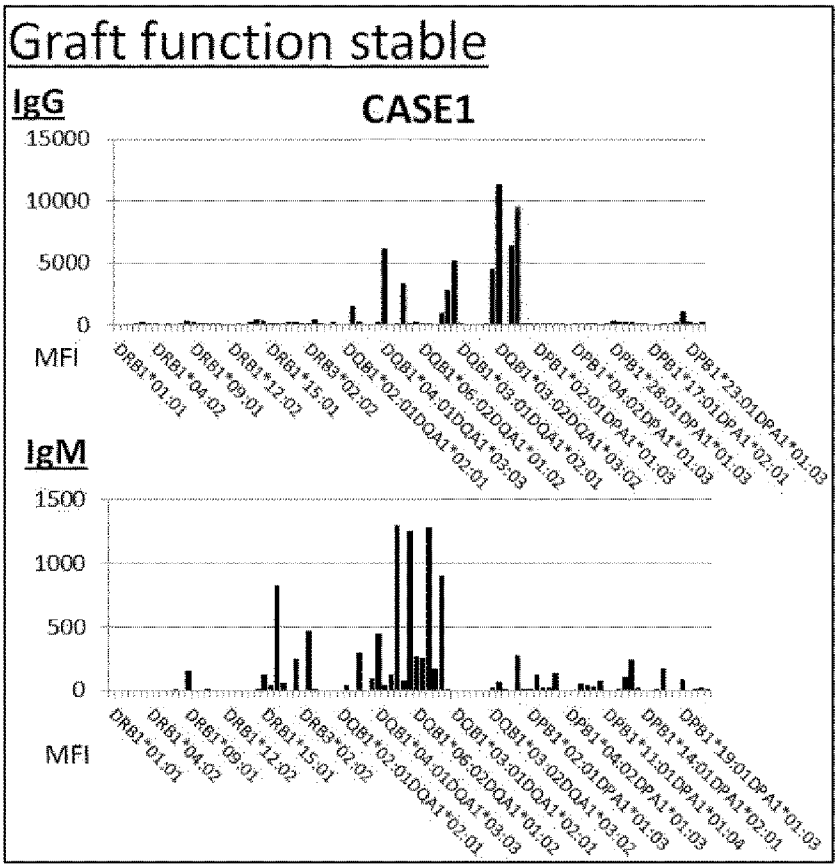

Donor antigen
Memory B-cell(IgG type)
Plasma cell(IgG type)
B-cell receptor
Activated T-cell
Macrophage
Class-switch
Growth factor
Cytokine
Naïve B-cell
Memory B-cell(IgM type)
Plasma cell(IgM type)

[図6]

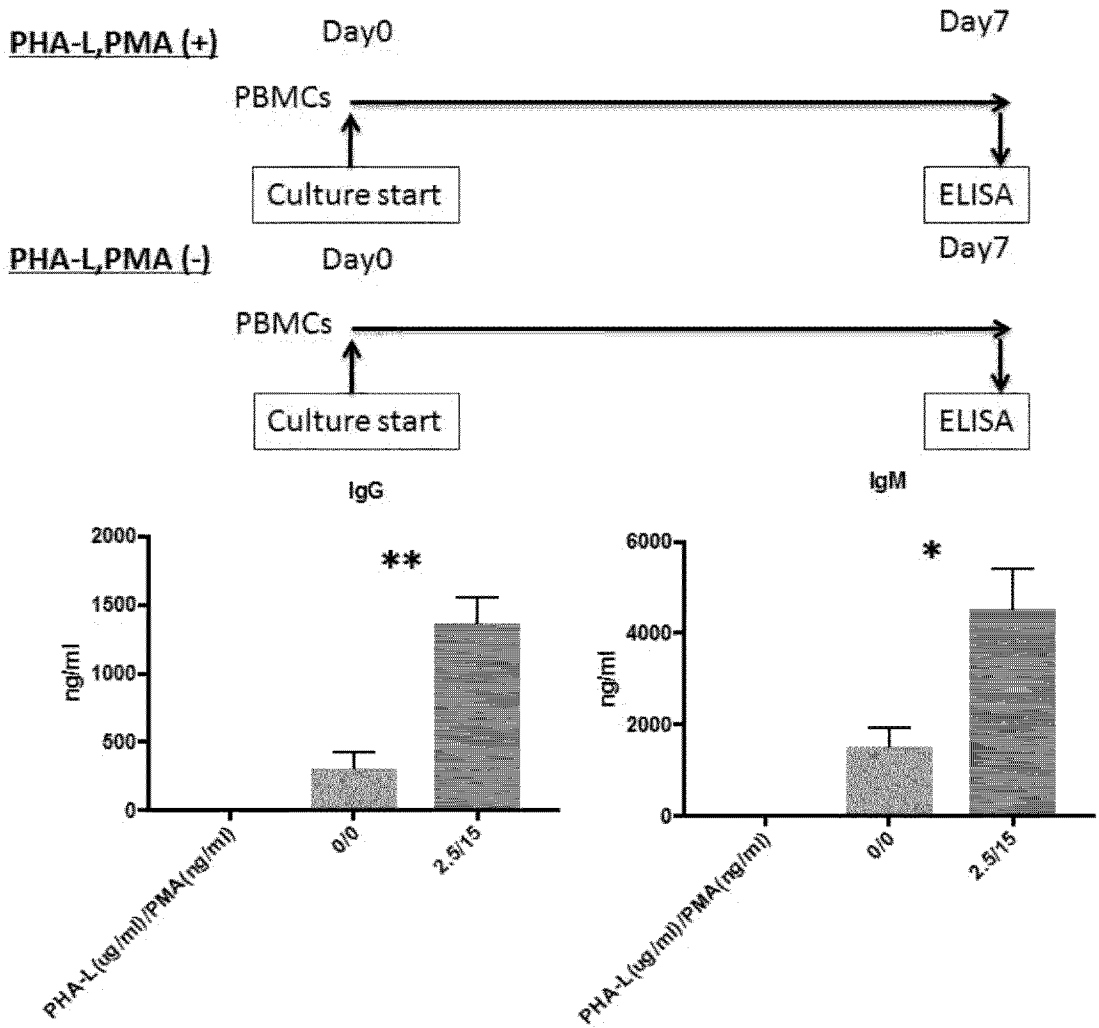

BCR-stimulated
Day0
PBMCs culture
AffiniPureF(ab)2Fragment Goat anti Human IgM
Day7
ELISA assay
BCR-unstimulated
Day0
PBMCs culture
Day7
ELISA assay
IgM EBV ab
***
ng/ml
300
200
100
0
BCR-stimulated
BCR-unstimulated
IgG EBV ab
***
ng/ml
500
400
300
200
100
0
BCR-stimulated
BCR-unstimulated

[図7]

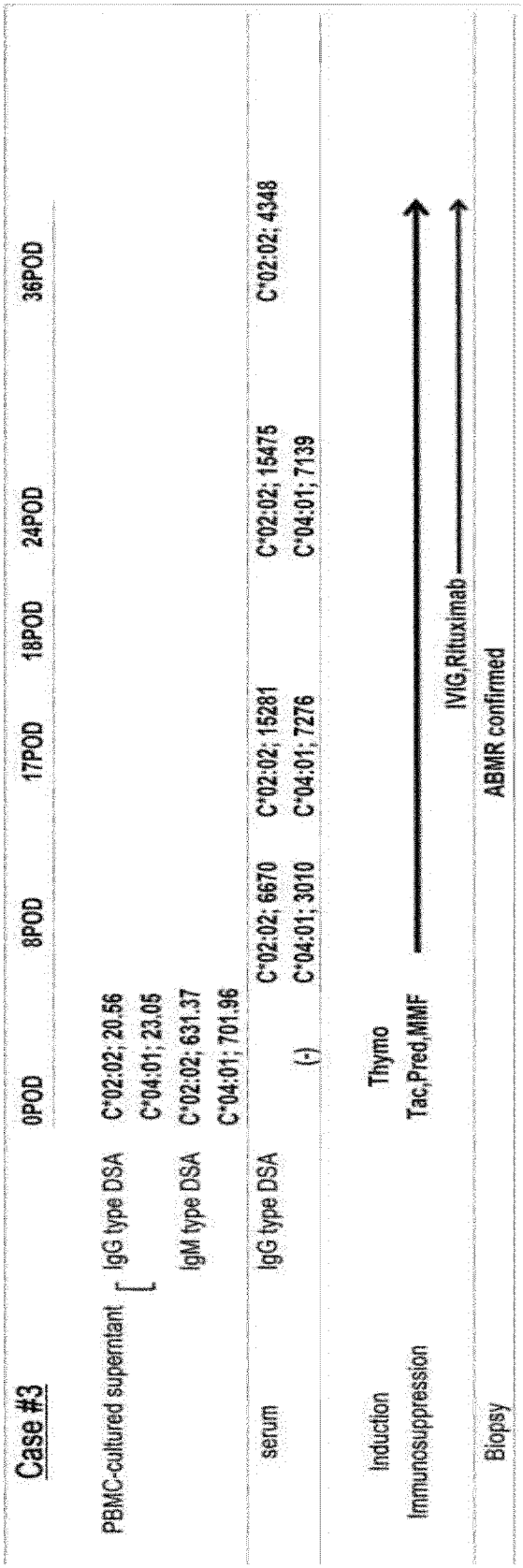

ABMR
CASE1
IgG
MFI
IgM
MFI
A*01:01
A*24:02
A*30:02
A*66:01
B*08:01
B*15:12
B*39:01
B*46:01
B*53:01
B*67:01
C*03:03
C*14:02
A*33:03
A*01:01
A*23:01
A*29:02
A*34:02
A*69:01
B*14:02
B*15:16
B*40:01
B*46:01
B*52:01
B*58:01
C*01:02
C*06:02
C*17:01
IgG
CASE2
MFI
DRB1*01:01
DRB1*04:04
DRB1*10:01
DRB1*14:01
DRB1*16:02
DRB5*02:02
DQB1*04:01DQA1*03:03
DQB1*06:02DQA1*01:01
DQB1*03:01DQA1*05:05
DQB1*03:03DQA1*03:02
DPB1*11:01DPA1*02:01
DPB1*17:01DPA1*01:03
DPB1*28:01DPA1*01:05
IgM
MFI
DRB1*01:01
DRB1*04:05
DRB1*11:04
DRB1*15:01
DRB4*01:01
DQB1*02:02DQA1*02:01
DQB1*06:02DQA1*01:02
DQB1*03:01DQA1*05:05
DPB1*01:01DPA1*01:03
DPB1*04:02DPA1*01:03
DPB1*28:01DPA1*01:03
DPB1*18:01DPA1*01:05


Graft function stable
IgG
CASE1
MFI
DRB1*01:01
DRB1*04:02
DRB1*09:01
DRB1*12:02
DRB1*15:01
DRB3*02:02
DQB1*02:01DQA1*03:03
DQB1*04:01DQA1*01:02
DQB1*06:02DQA1*02:01
DQB1*03:01DQA1*03:02
DPB1*02:01DPA1*01:03
DPB1*04:02DPA1*01:03
DPB1*28:01DPA1*01:03
DPB1*17:01DPA1*02:01
DPB1*23:01DPA1*01:03
IgM
MFI
DRB1*01:01
DRB1*04:02
DRB1*09:01
DRB1*12:02
DRB1*15:01
DRB3*02:02
DQB1*02:01DQA1*03:03
DQB1*04:01DQA1*01:02
DQB1*06:02DQA1*02:01
DQB1*03:01DQA1*03:02
DPB1*02:01DPA1*01:03
DPB1*04:02DPA1*01:03
DPB1*11:01DPA1*01:04
DPB1*14:01DPA1*02:01
DPB1*19:01DPA1*01:03

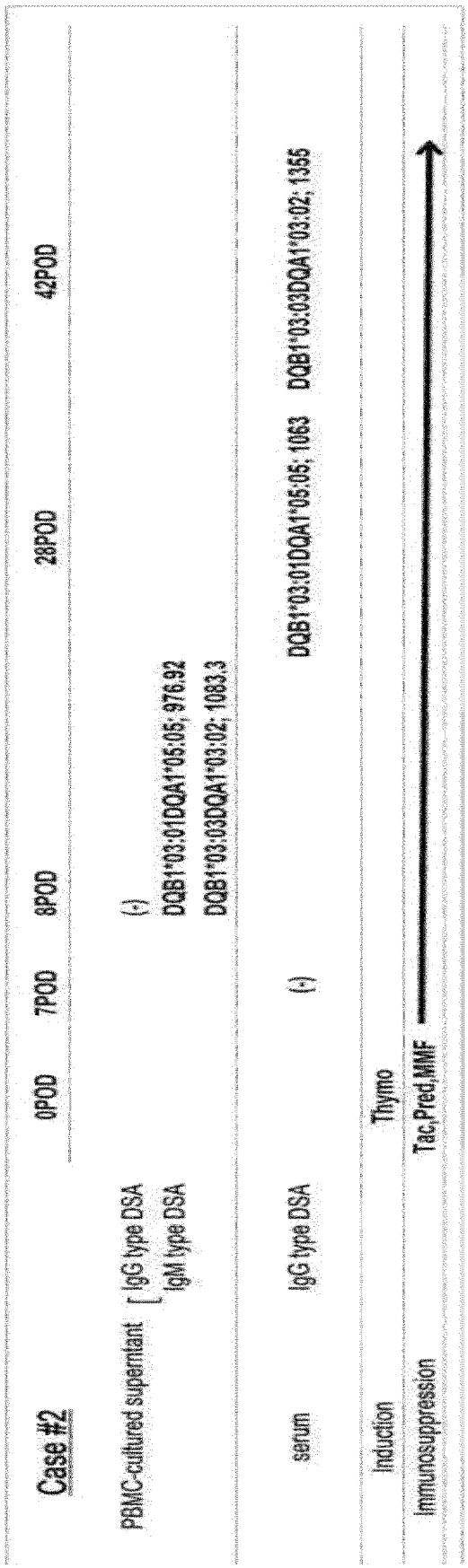
[図8]


PHA-L,PMA (+)
Day0
Day7
PBMCs
Culture start
ELISA
PHA-L,PMA (-)
Day0
Day7
PBMCs
Culture start
ELISA
IgG
IgM
ng/ml
2000
1500
1000
500
0
**
PHA-L(ug/ml)/PMA(ng/ml)
0/0
2.5/15
ng/ml
6000
4000
2000
0
*
PHA-L(ug/ml)/PMA(ng/ml)
0/0
2.5/15

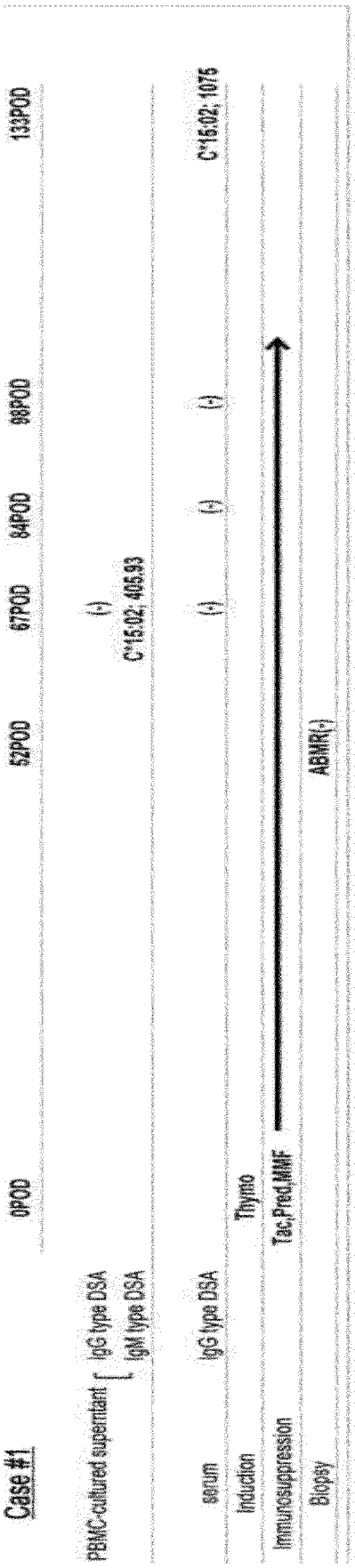
[図9]


Case #3
0POD
8POD
17POD
18POD
24POD
36POD
PBMC-cultured supernatant
IgG type DSA
C*02:02; 20.56
C*04:01; 23.05
IgM type DSA
C*02:02; 631.37
C*04:01; 701.96
serum
IgG type DSA
C*02:02; 6670
C*04:01; 3010
C*02:02; 15281
C*04:01; 7276
C*02:02; 15475
C*04:01; 7139
C*02:02; 4348
(-)
Induction Immunosuppression
Thymo
Tac,Pred,MMF
IVIG,Rituximab
Biopsy
ABMR confirmed

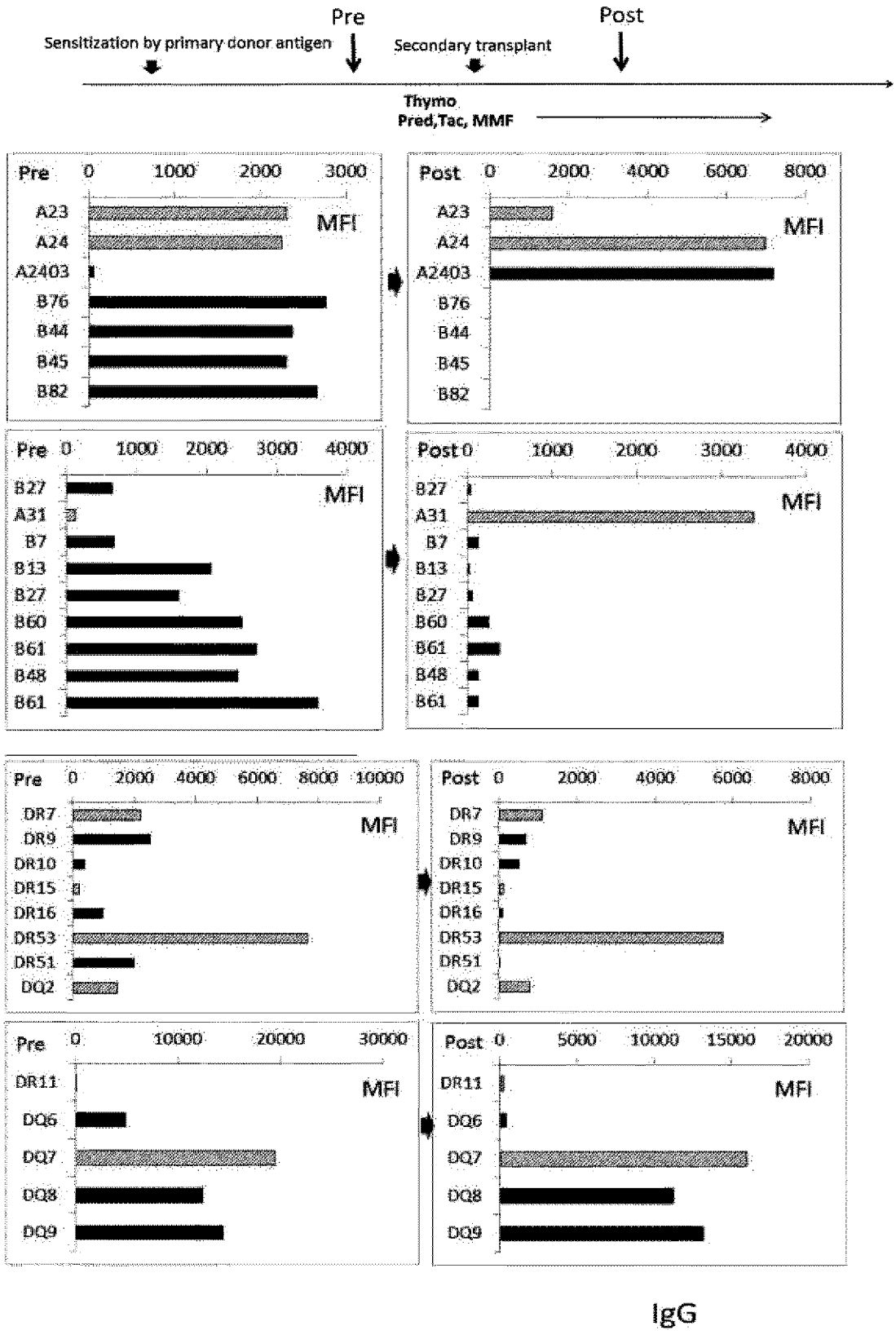
[図10]


Case #2
0POD
7POD
8POD
28POD
42POD
PBMC-cultured supernatant
IgG type DSA
IgM type DSA
(-)
DQB1*03:01DQA1*05:05; 976.92
DQB1*03:03DQA1*03:02; 1083.3
serum
IgG type DSA
(-)
DQB1*03:01DQA1*05:05; 1063
DQB1*03:03DQA1*03:02; 1355
Induction
Thymo
Immunosuppression
Tac,Pred,MMF

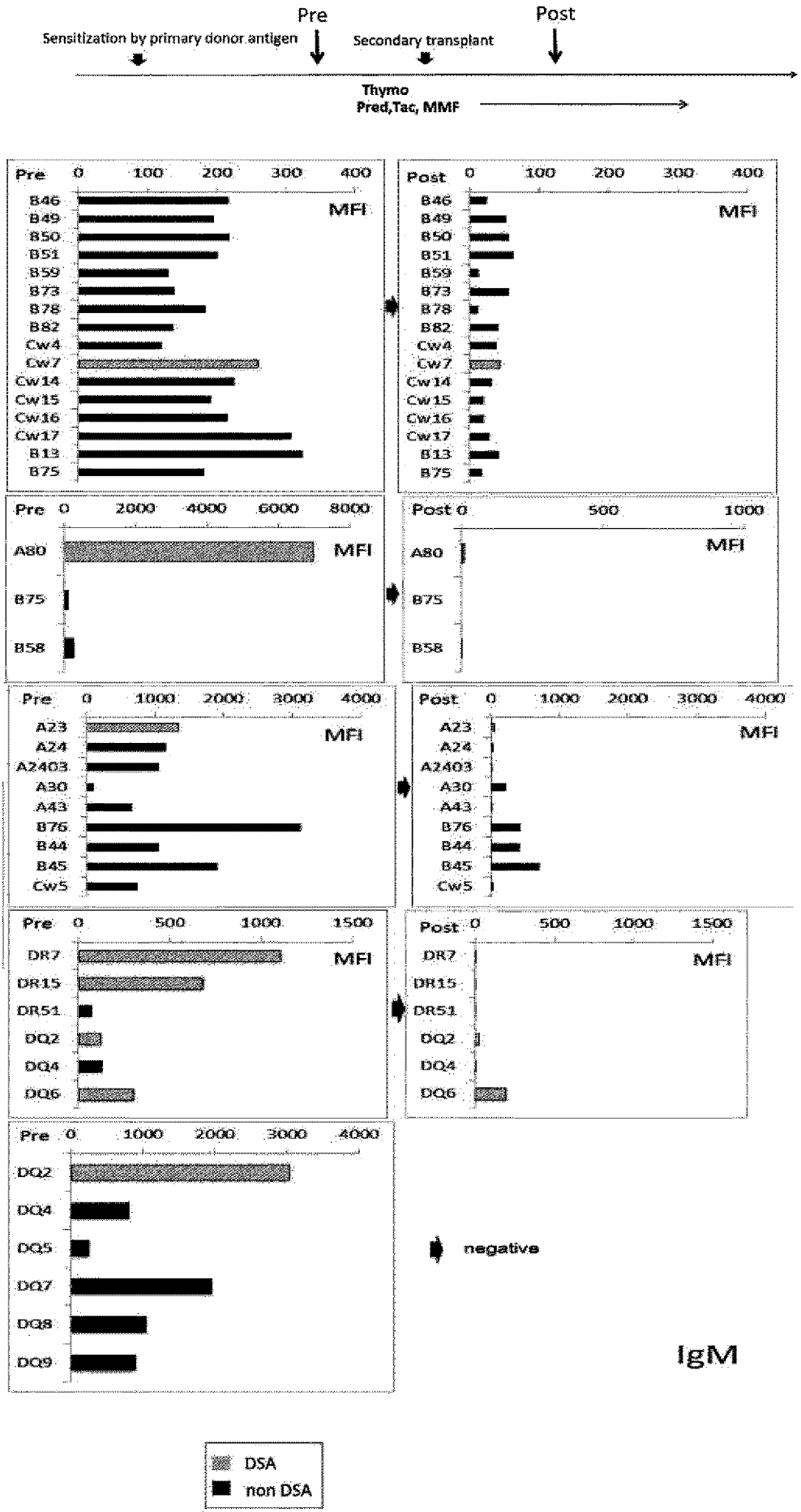
[図11]


Case #1
0POD
52POD
67POD
84POD
98POD
133POD
PBMC-cultured supernant
IgG type DSA
IgM type DSA
(-)
C*15:02; 405.93
serum
IgG type DSA
(+)
(-)
(-)
C*15:02; 1075
Induction
Thymo
Immunosuppression
Tac,Pred,MMF
Biopsy
ABMR(-)

[図12A]


Pre
Post
Sensitization by primary donor antigen
Secondary transplant
Thymo
Pred,Tac, MMF
Pre 0 1000 2000 3000
A23
A24
A2403
B76
B44
B45
B82
MFI
Post 0 2000 4000 6000 8000
A23
A24
A2403
B76
B44
B45
B82
MFI
Pre 0 1000 2000 3000 4000
B27
A31
B7
B13
B27
B60
B61
B48
B61
MFI
Post 0 1000 2000 3000 4000
B27
A31
B7
B13
B27
B60
B61
B48
B61
MFI
Pre 0 2000 4000 6000 8000 10000
DR7
DR9
DR10
DR15
DR16
DR53
DR51
DQ2
MFI
Post 0 2000 4000 6000 8000
DR7
DR9
DR10
DR15
DR16
DR53
DR51
DQ2
MFI
Pre 0 10000 20000 30000
DR11
DQ6
DQ7
DQ8
DQ9
MFI
Post 0 5000 10000 15000 20000
DR11
DQ6
DQ7
DQ8
DQ9
MFI
IgG
DSA
non DSA

[図12B]


Pre
Post
Sensitization by primary donor antigen
Secondary transplant
Thymo
Pred,Tac, MMF
MFI
B46
B49
B50
B51
B59
B73
B78
B82
Cw4
Cw7
Cw14
Cw15
Cw16
Cw17
B13
B75
A80
B58
A23
A24
A2403
A30
A43
B76
B44
B45
Cw5
DR7
DR15
DR51
DQ2
DQ4
DQ6
DQ5
DQ7
DQ8
DQ9
negative
IgM
DSA
non DSA

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/045267

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12Q1/04(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C07K14/52(2006.01)n, C12N5/0781(2010.01)n, C12N5/0783(2010.01)n, C12N5/0786(2010.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl. C12Q1/04, G01N33/53, C07K14/52, C12N5/0781, C12N5/0783, C12N5/0786

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018
Registered utility model specifications of Japan 1996-2018
Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	松田佳子 ほか, In vitro における末梢血 B 細胞から HLA 抗体検出系の確立, 今日の移植, 2014, Vol. 27, No. 6, pp. 515-519, 第 515 頁左欄, 第 515-517 頁(1)-(2),(4), 第 518 頁結論欄, 第 518-519 頁討論欄, non-official translation (MATSUDA, Yoshiko et al. Establishing an HLA Antibody Detection System from Peripheral Blood B Cells in Vitro. Transplantation Now, 2014, Vol. 27, No. 6, pp. 515-519 (p. 515, left column; pp. 515-516, (1)-(2), (4); p. 518, Conclusion; p. 519, Discussion))	1-8
P, X	MATSUDA, Yoshiko et al., Evaluation of Antigen-Specific IgM and IgG Production during an In Vitro Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture Assay, Frontiers in immunology, 10 July 2017, vol. 8, no. 794, pp. 1-14, abstract column	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／０４５２６７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/04(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C07K14/52(2006.01)n, C12N5/0781(2010.01)n, C12N5/0783(2010.01)n, C12N5/0786(2010.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/04, G01N33/53, C07K14/52, C12N5/0781, C12N5/0783, C12N5/0786

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１８年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	松田　佳子　ほか，Ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける末梢血Ｂ細胞からＨＬＡ抗体検出系の確立，今日の移植，2014，Vol. 27，No. 6，pp. 515-519，第５１５頁左欄、第５１５－５１７頁（１）－（２）、（４）、第５１８頁結論欄、第５１８－５１９頁討論欄	1-8
P，X	MATSUDA, Yoshiko et al., Evaluation of Antigen-Specific IgM and IgG Production during an In Vitro Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture Assay, Frontiers in immunology, 2017.07.10, Vol. 8, No. 794, pp. 1-14, Ａｂｓｔｒａｃｔ欄	1-8

☐　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０７．０２．２０１８	２０．０２．２０１８

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　６２２０
布川　莉奈
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８