

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10256

研究課題名(和文) 移植肺由来血中遊離DNAの定量による肺移植後急性拒絶反応の新しい診断方法の確立

研究課題名(英文) Donor-derived cell-free DNA is associated with acute rejection and decreased oxygenation in primary graft dysfunction after living donor-lobar lung transplantation

研究代表者

杉本 誠一郎 (Sugimoto, Seiichiro)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40570148

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)：本研究では、生体肺移植におけるドナーとレシピエントの一塩基多型の違いから、ドナー由来の移植肺由来血中遊離DNAを同定し、レシピエント血中遊離DNA中に占める割合を測定した。移植肺由来血中遊離DNAは移植直後に最も高値で、術後5日目までに徐々に低下した。移植直後と72時間後の移植肺由来血中遊離DNAの上昇は、酸素化の低下と有意に相関していた。移植後5～14日目では、移植肺由来血中遊離DNAが急性拒絶反応群で感染群や安定群より有意に上昇していた。低侵襲な移植肺由来血中遊離DNAの測定は、生体肺移植後の原発性移植片不全の重症度の判定や、急性拒絶反応の新しいバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Donor-derived cell-free DNA (dd-cf-DNA) has been shown to be an informative biomarker of rejection after lung transplantation (LT) from deceased donors. However, in living-donor lobar LT (LDLLT), because small grafts are implanted with short ischemic time from blood-relatives, the detection of dd-cf-DNA might be challenging. Our study was aimed to examine the role of dd-cf-DNA in the early phase after LDLLT. Immediately after LDLLT, the dd-cf-DNA levels were highly elevated, subsequently reaching the plateau, with the resolution of primary graft dysfunction (PGD). Increased levels of dd-cf-DNA significantly correlated with decreased oxygenation immediately and 72 hours after LDLLT. The dd-cf-DNA levels significantly increased in the patients with acute rejection than in those with infection or stable condition. The measurement of dd-cf-DNA might be useful to monitor the severity of PGD, and dd-cf-DNA could be a potential biomarker for the diagnosis of acute rejection after LDLLT.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺移植 生体肺移植 一塩基多型 血中遊離DNA 原発性移植片不全 急性拒絶反応 診断 デジタルPCR

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺移植と急性拒絶反応

肺移植は終末期肺疾患に対する確立された治療法である。本邦では、1998年の岡山大学における第1例目の成功以来、2013年末までに344例の肺移植が施行された。2014年10月現在、岡山大学では、国内最多の135例の肺移植が施行されたが、生体肺移植77例・脳死肺移植58例とその半数以上は生体肺移植である(図1)。2010年の臓器移植法の改正後に脳死肺移植の症例数が増加したが、小児肺移植を筆頭に依然ドナー不足は解決されておらず、日本における生体肺移植の重要性は変化していない。通常、生体肺移植では2人の健康なドナーから一つずつの下葉が提供され、レシピエントの両肺の代わりに移植される。生体肺移植後には、移植された小さい下葉のみにレシピエントの全心拍出量が流れるため、肺組織あたりの血流量が多くなる。このため、急性拒絶反応の診断に用いられる気管支鏡下肺生検は、出血量が多くなり致命的な合併症を招く危険性があるため、生体肺移植後には施行されていない。特に、当施設で世界に先駆けて成功した幼児に対する生体中葉肺移植(2013年)や生体区域肺移植(2014年)などでは、レシピエントの気管支径が細いため、生検用の気管支鏡の末梢気管支への挿入自体が不可能であり、急性拒絶反応の新しい低侵襲な診断方法の確立が急務である。

図1. 岡山大学の肺移植件数の推移 (2014.10月現在)



肺移植後の急性拒絶反応は、長期の生存率を減少させる慢性拒絶反応を発症させる危険因子であるため、肺移植後の急性拒絶反応を早期に診断し制御することは、肺移植後の予後を改善させるためにも重要である。現在の岡山大学での肺移植後5年生存率は約80%で、世界平均の約50%より良好だが、肺移植後の急性拒絶反応を制御することで、更に予後を改善できる可能性がある。

研究代表者はこれまでラット肺移植やマウス肺移植などの動物実験で、肺移植後の急性・慢性拒絶反応に関する研究を施行し、肺移植後の急性拒絶反応がG-CSFを介した顆粒球増加による虚血再還流障害によって制御されること(Kreisel D, Sugimoto S, et al: Blood 2011. Kreisel D, Sugimoto S, et al: J Clin Invest 2011)や、虚血再還流障害の

制御機構(Sugimoto S, et al: J Thorac Cardiovasc Surg 2009 など) 急性拒絶反応の制御機構(Waki N, Sugimoto S, et al: Eur J Cardiothorac Surg 2012)、またヒアルロン酸による慢性拒絶反応の発症機構(Todd JL, Sugimoto S, et al: Am J Respir Crit Care Med 2014)などを報告してきた。

(2) 肺移植後の急性拒絶反応の診断方法

臨床肺移植における急性拒絶反応の診断は、発熱・呼吸困難等の臨床症状や動脈血液ガスの酸素化能、胸水量、白血球数・CRP等の血液検査、X線・CTなどの画像診断、気管支鏡下肺生検などによる組織診断を組み合わせる総合的に行われ、治療としてステロイドパルス療法などが用いられる。これまで様々な診断方法が報告されてきたが、血液検査であるKL-6やプロカルシトニンなどの特異度は低い。また、近年報告されたImmuKnowアッセイは、血液中のCD4 T細胞のATP合成から免疫機能レベルを測定し、感染と急性拒絶反応の診断の一助にはなるが、鑑別が困難なことも多い。当院でも新しい診断方法として、レシピエントのHLA特異的IgM抗体価について報告した(Miyoshi K, et al. Ann Thorac Surg 2011)が、まだ実際の臨床では実用化に至っていない。

(3) 移植片由来血中遊離DNAによる臓器移植後の急性拒絶反応の診断

一方、近年の分子生物学におけるゲノム解析技術の進歩により、少量の血液サンプルによるDNA解析が可能となった。最新のドロップレット・デジタルPCR法では、以前に比べて少量のサンプルでDNAの検出が可能となり、迅速かつ安価となったため、癌領域だけでなく臓器移植後の急性拒絶反応の診断のような、迅速性を必要とする分野でも臨床研究が開始された。

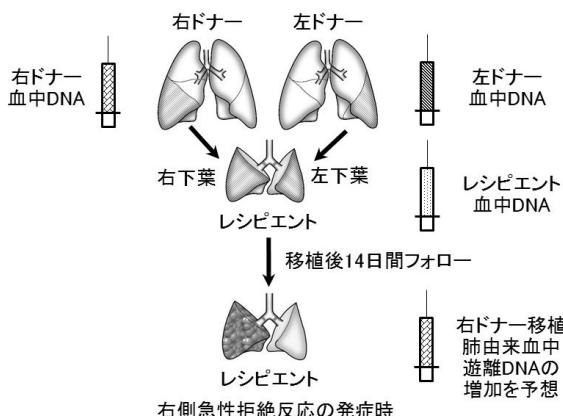
2013年には、肝移植後の急性拒絶反応の診断において、ドロップレット・デジタルPCR法を用いてレシピエントの血中を循環する移植片由来血中遊離DNAを測定する方法が報告された(Beck J, et al. Clin Chem 2013)。これは、急性拒絶反応によりドナー由来の移植片細胞が破壊され、レシピエント血中に遊離DNAとして増加することを利用した研究で、その他のバイオマーカーよりも早期に検出可能であり、検査期間もわずか1日であった。この研究では、DNA配列の個体差であるDNA多型のうち、個人によってDNA配列の1箇所の塩基配列が異なる、一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphisms: SNPs)がDNAの違いの判別に用いられた。しかし、レシピエントの検体のみが診断に用いられたため、ドナー由来のDNAであるという確証はとれず、方法が煩雑であった。また、移植後経過を追った症例数も7例のみと少なく、感染との比

較も 1 例だけであった。

本研究では、この測定方法を改善し、より多くの症例で検討するため、リアルタイム PCR 法によるドナーとレシピエントの SNPs の比較により、測定候補となる SNPs の絞りこみを行い、その後にドロップレット・デジタル PCR 法でレシピエント血中遊離 DNA 中の移植肺由来遊離 DNA が占める割合を定量する。生体肺移植では、術前に左ドナー、右ドナーとレシピエントの血液 DNA を採取することで、測定する SNPs を絞り込む (図 2)。肺移植後は急性拒絶反応と感染 (肺炎など) との鑑別が問題になるため、移植後 14 日目までレシピエント血中遊離 DNA 中の移植肺由来遊離 DNA が占める割合を定量することで、経時の変化を観察し、急性拒絶反応などの臨床でのイベントと対比する。

以上より、肺移植後の移植肺由来血中遊離 DNA の定量による急性拒絶反応の新しい診断方法を確立する。

図 2. 生体肺移植における移植肺由来血中遊離 DNA 測定の様式図



2. 研究の目的

本研究では、最新のデジタル PCR 法を用いて、ドナーとレシピエントの DNA の違いから、レシピエント血中遊離 DNA 中の移植肺由来遊離 DNA が占める割合を定量し、生体肺移植における新しい急性拒絶反応の診断方法を確立することを目的とする。従来の気管支鏡下肺生検に比べ、低侵襲で迅速かつ早期に診断できる方法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 対象患者

2011 年 10 月から 2016 年 11 月に岡山大学病院で施行された生体肺移植 22 例のうち、同意を取得し、適切な SNPs が同定できた 13 例を対象にした。急性拒絶反応群 (拒絶群) 4 例、肺炎群 (感染群) 4 例、安定群 5 例の 3 群で比較・検討した。研究プロトコルは岡山大学病院倫理審査委員会に承認された (No. 1601-030)。

ドナーからは生体肺移植前のみ、レシピエントからは生体肺移植前と生体肺移植後 14

日間の採血を行い、EDTA 採血管に採取し、遠心分離後の血漿と buffy coat を -20°C で冷凍保存した。

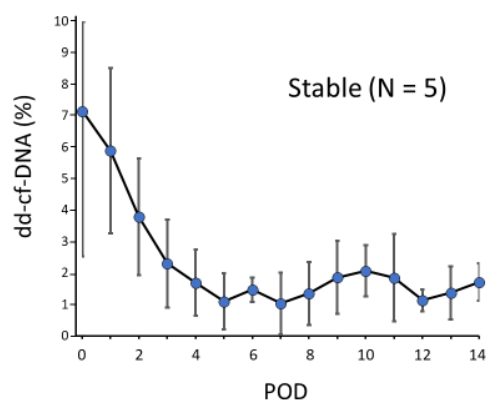
既知の SNPs 情報を基に、頻度の低いほうの対立遺伝子の頻度 (Minor allele frequency, MAF) が 50% に近いほど遺伝子マーカーとして有用であるため (MAF の範囲: 0 - 50%)、既出の報告 (Beck J, et al. Clin Chem 2013) と同様に、日本人で 40 ~ 50% の MAF を持つ 30 種類の一塩基多型 (SNPs) を用いて DNA の違いを判別した。

30 種類の SNPs を用いて、肺移植前のレシピエントとドナーの DNA (buffy coat) をリアルタイム PCR 法で分析した。片側生体肺移植では、単一のドナーから移植されるため、ドナーでヘテロ接合か、レシピエントとドナーで異種のコホ接合の遺伝子型を標的 SNPs として同定した。両側生体肺移植では、2 名のドナーから移植されるため、片側ドナーでヘテロ接合もしくはコホ接合で、かつ対側ドナーやレシピエントとは異なるコホ接合の遺伝子型を標的 SNPs として同定した。これらの標的 SNPs を移植肺由来血中遊離 DNA として、ドロップレット・デジタル PCR 法を用いてレシピエント血中遊離 DNA 中に占める割合を定量した。

4. 研究成果

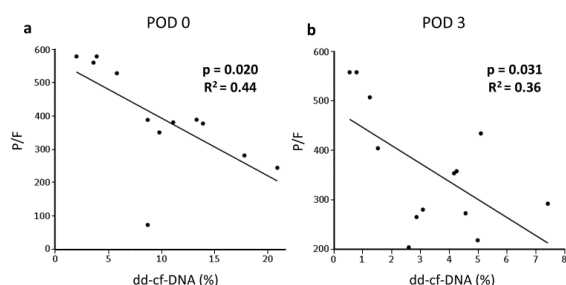
生体肺移植 13 例の合計 182 サンプルを対象に、移植肺由来血中遊離 DNA の生体肺移植後の経時的推移を観察した。安定群では、移植由来血中遊離 DNA は移植直後に最も高値で、その後、虚血再灌流障害の改善とともに低下し、術後 5 日目にプラトーに達した (図 3)。

図 3. 移植肺由来血中遊離 DNA の経時的変化



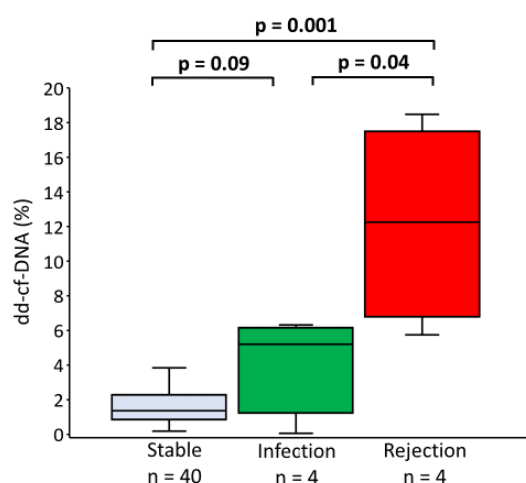
また、原発性移植片不全が発症する時期である生体肺移植直後、24 時間後、48 時間後、72 時間後では、 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 比と原発性移植片不全のグレードに 3 群間で有意な差は認められなかった。しかし、移植直後と移植後 72 時間の移植肺由来血中遊離 DNA の上昇は $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 比の低下とそれぞれ相関関係を認めた (図 4)。

図 4 . 生体肺移植直後と 72 時間後の移植肺由来血中遊離 DNA と PaO₂/FiO₂ 比の相関関係



移植後 5～14 日目の間、拒絶群では感染群や安定群に比べ、移植肺由来血中遊離 DNA がステロイドパルス療法前から有意に上昇していた(図 5)。また、抗体関連型拒絶反応ではその上昇が遷延していた。

図 5 . 発症時の移植肺由来血中遊離 DNA



生体肺移植後の急性拒絶反応の診断では、通常、侵襲的な気管支鏡下肺生検は行われていないが、低侵襲な移植肺由来血中遊離 DNA の測定は、原発性移植片不全の重症度の判定に有用で、急性拒絶反応の新しいバイオマーカーとなる可能性が示唆された。今後、生体肺移植後の慢性拒絶反応でも更なる検討を行う予定である。

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 8 件)

Sugimoto S, Yamane M, Otani S, Kurosaki T, Okahara S, Hikasa Y, Toyooka S, Kobayashi M, Oto T. Airway complications have a greater impact on the outcomes of living-donor lobar lung transplantation recipients than cadaveric lung transplantation recipients. *Surg Today* 2018. DOI: 10.1007/s00595-018-1663-6、査読有 Sugimoto S, Miyoshi K, Kurosaki T,

Otani S, Yamane M, Kobayashi M, Oto T. Favorable survival in lung transplant recipients on preoperative low-dose, as compared to high-dose corticosteroids, after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*.2018;107:696-702. DOI:10.1007/s12185-018-2417-3、査読有 Mesaki K, Sugimoto S, Otani S, Kurosaki T, Miyoshi K, Yamane M, Oto T. Pneumatosis intestinalis after lung transplantation for pulmonary graft-versus-host disease. *J Thorac Dis* 2018;10:E42-E45. DOI: 10.21037/jtd.2017.11.121、査読有 Hirano Y, Sugimoto S, Mano T, Kurosaki T, Miyoshi K, Otani S, Yamane M, Kobayashi M, Miyoshi S, Oto T. Prolonged Administration of Twice-Daily Bolus Intravenous Tacrolimus in the Early Phase After Lung Transplantation. *Ann Transplant* 2017;22:484-92. DOI:10.12659/aot.904225、査読有 Sugimoto S, Yamane M, Miyoshi K, Kurosaki T, Otani S, Miyoshi S, Oto T. Pulmonary artery patch for an inadequate donor atrial cuff in the absence of donor pericardium in lung transplantation. *Surg Today* 2017;47:399-401. DOI:10.1007/s00595-016-1370-0、査読有 Sugimoto S, Otani S, Ohki T, Kurosaki T, Miyoshi K, Yamane M, Miyoshi S, Oto T. Lung retransplantation in an adult 13 years after single lobar transplant in childhood. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2017;65:539-541. DOI:10.1007/s11748-016-0732-2、査読有 Ohki T, Sugimoto S, Kurosaki T, Otani S, Miyoshi K, Yamane M, Miyoshi S, Oto T. Balloon-expandable Metallic Stents for Airway Diseases. *Acta Med Okayama*. 2016;70:421-424. 査読有 Sugimoto S, Miyoshi K, Yamane M, Oto T. Lung transplantation for diffuse panbronchiolitis: 5 cases from a single centre. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2016;22:679-81. DOI: 10.1093/icvts/ivw008、査読有

[学会発表](計 9 件)

田中 真、杉本誠一郎、他、移植肺由来血中遊離 DNA は生体肺移植後の Primary graft dysfunction や急性拒絶反応に関連する、第 35 回日本呼吸器外科学会総会・学術集会、2018 年 5 月 17 日、幕張メッセ(千葉県千葉市) 山本治慎、杉本誠一郎、他、肺移植後の

肺機能にグルココルチコイド感受性遺伝子が与える影響、第35回日本呼吸器外科学会総会・学術集会、2018年5月17日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

Tanaka S, Sugimoto S, et al. Increased plasma levels of donor-derived cell-free DNA correlate with rejection in the recipients of living donor-lobar lung transplantation. The International Society for Heart and Lung Transplantation 38th Annual Meeting and Scientific Sessions、2018年4月11日、ニース(フランス)

Sugimoto S, et al. The feasibility of lung transplantation from donors mechanically ventilated for prolonged periods. The International Society for Heart and Lung Transplantation 38th Annual Meeting and Scientific Sessions、2018年4月11日、ニース(フランス)

田中 真、杉本誠一郎、他、シンポジウム・移植肺由来血中遊離DNAの定量による生体肺移植後の急性拒絶反応の診断、第53回日本移植学会総会、2017年9月9日、アートホテル旭川(北海道旭川市)

Sugimoto S, et al. Bronchial complications after living-donor lobar lung transplantation: bronchial stenoses in the lobar to segmental bronchi necessitating earlier intervention. The International Society for Heart and Lung Transplantation 37th Annual Meeting and Scientific Sessions、2017年4月7日、サンディエゴ(アメリカ合衆国)
Hirano Y, Sugimoto S, et al. Prolonged warm ischemia prevents lung allograft acceptance in lung transplantation from donation after cardiac death in the mouse. The International Society for Heart and Lung Transplantation 36th Annual Meeting and Scientific Sessions、2016年4月29日、ワシントンDC(アメリカ合衆国)

Hirano Y, Sugimoto S, et al. Prolonged administration of twice daily bolus intravenous tacrolimus early after lung transplantation. The International Society for Heart and Lung Transplantation 36th Annual Meeting and Scientific Sessions、2016年4月27日、ワシントンDC(アメリカ合衆国)

Sugimoto S, et al. Update on the outcomes of lung transplantation after hematopoietic stem cell transplantation: a single-center experience. The International Society for Heart and Lung Transplantation

35th Annual Meeting and Scientific Sessions、2015年4月16日、ニース(フランス)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 誠一郎 (SUGIMOTO, Seiichiro)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40570148

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者

大藤 剛宏 (OTO, Takahiro)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：40452578

豊岡 伸一 (TOYOOKA, Shinichi)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30397880

(4) 研究協力者

田中 真 (TANAKA, Shin)