

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10420

研究課題名(和文)糖鎖発現解析による腎移植後慢性拒絶反応の新規診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel diagnostic method for chronic rejection after kidney transplant using glycan expression analysis

研究代表者

高野 恵輔 (Kohno, Keisuke)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：70615038

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)：腎移植術後の拒絶反応でのT細胞の糖鎖変化を解析する目的であったが、期間中に拒絶を示す症例はなかった。そこで、移植前後、リツキサン投与前後および術後1年でのT細胞の糖鎖変化を調べた。合計7例(血液適合・一致移植3例、血液不適合移植4例)で調べた。移植前後での糖鎖変化は血液適合・一致移植および血液不適合移植で有意差はなかった。一方で、術後1年で血液適合・一致移植および血液不適合移植ともに、様々な糖鎖が変化が起きた。血液不適合移植では、リツキサン投与でMan<sub>1-3</sub>ManまたはMan<sub>1-6</sub>Manの発現が有意に増加することが明らかとなった。そして、この変化が術後長期に保持されることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では糖鎖発現の変化による拒絶反応の診断には結びつけることはできなかったが、血液不適合移植で「なぜ、移植後に免疫寛容が誘導され、移植腎は拒絶されないのか。」の解明の手掛かりになる可能性が示唆された。臨床的には腎移植術後長期間が過ぎ、B細胞数が戻ってきても、血液型抗体価が上がらないのは、リツキサンによる糖鎖変化が、B細胞に抗体産生の刺激を与えていない可能性が示唆された。本研究は免疫寛容に迫る新たな展開を切り開いた可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to detect the changes of glycan expression on the surface of the T cells, but there were no cases which showed rejection in the observation period. Therefore, we decided to clarify the changes of glycan expression after transplant, rituximab administration, and one-year post-transplant. Seven cases including ABO identical/compatible 3 cases and incompatible 4 cases was enrolled. There was no difference in glycan expression after transplant in both ABO identical/compatible and ABO incompatible transplants. On the other hand, there were many glycan changes one year post-transplant in ABO identical/compatible and ABO incompatible transplants. In ABO incompatible transplant, there was significant changes of “Man<sub>1-3</sub>Man or Man<sub>1-6</sub>Man” after rituximab administration. And this was clarified to be preserved for long period of time.

研究分野：移植外科学

キーワード：腎移植 T細胞 糖鎖 免疫寛容

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

拒絶反応は移植腎機能廃絶の主要な原因の1つである。急性拒絶反応の頻度は免疫抑制薬の進歩により、近年大きく減少し約20%の発症率となっているが、依然として移植後腎機能障害の重要な鑑別疾患であることに変わりはない。一方、慢性拒絶反応は移植腎機能廃絶の原因で最も多く約20%を占める。慢性拒絶反応は徐々に腎機能が低下し、高血圧、貧血、蛋白尿を主徴としやがて腎機能廃絶に至る最も治療が困難な拒絶反応である。この慢性拒絶反応の予防と治療が移植腎長期生着の鍵となっている。現状、慢性拒絶反応の診断には移植腎生検が不可欠であるが診断上、感染症か拒絶反応かの鑑別が困難な場合はしばしばあり、C4dやSV40などその有用性が確立された組織マーカーがあるが、決して十分とは言えない。また生検は侵襲的な検査であり、非侵襲的な新たな拒絶反応の診断法が移植医療において望まれている。近年注目されているのが糖鎖である。糖鎖は、核酸、タンパク質に次ぐ第3の生命鎖と呼ばれ、糖タンパク質、糖脂質のようにタンパク質や脂質と結合して生体内でとても重要な機能を果たしている。細胞表面は無数の糖鎖で覆われており、細胞の分化・成熟・活性化とともに配列構造が大きく変化し識別分子として機能している。正常細胞からがん細胞になると、細胞表面の糖鎖の構造が大きく変化し、がん細胞特異的な糖鎖の発現や特定の糖鎖の発現が増加する。このことから糖鎖は細胞を識別するために有効であり、様々な疾患を特定するバイオマーカーとして期待されている。

## 2. 研究の目的

近年糖鎖の解析技術の飛躍的な進展により、バイオマーカー候補としての糖鎖の発見、新たな診断法の開発が多くなされている。当教室では産総研と協力して独自のレクチンマイクロアレイを用いた癌の糖鎖解析を行い、標的マーカーの同定および薬剤開発の研究を進めている。糖鎖修飾は、その複雑な構造から研究が困難なものとされていたが、各種癌に対し、レクチンマイクロアレイに用いる96種類のレクチンを用いた網羅的な糖鎖発現パターンを解析することが可能である。この解析技術は全糖鎖の80%を解析することが可能であり癌の診断のみならず、特に移植後の拒絶反応の診断に有用と考えている。本研究ではこの解析技術を用いて、腎移植患者のリンパ球表面の糖鎖発現解析を行い、全く新しい拒絶反応を予測する糖鎖バイオマーカーを同定し、さらに拒絶反応の治療への応用を検討することである

## 3. 研究の方法

実験1. 腎移植後患者の末梢血からのリンパ球の単離 本研究の同意を得た腎移植後で外来通院中の患者および、今後腎移植を予定している患者から末梢血を採取してリンパ球を単離する。患者は、Group1(腎移植前)、Group2(腎移植後、腎機能安定)、Group3(腎移植後、腎機能安定、腎生検急性拒絶反応なし)、Group3(腎移植後、腎機能安定、腎生検で拒絶反応あり)、およびGroup4(腎移植後、腎機能悪化、腎生検急性拒絶反応あり))に分類する。

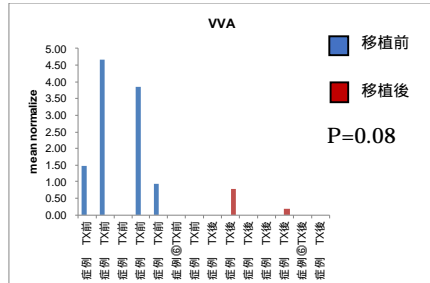
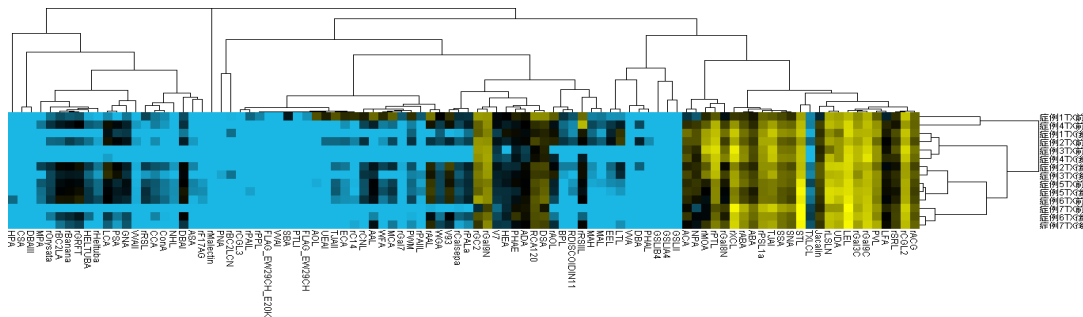
実験2. 高密度レクチンマイクロアレイを用いた網羅的な糖鎖修飾解析を、産総研が独自開発した96種類のレクチンで糖鎖全体の約80%を網羅的に解析可能な高密度レクチンマイクロアレイを用いて網羅的な糖鎖修飾解析を行う。患者の網羅的解析データを評価検討し、腎移植後の拒絶反応の診断に有用と思われるレクチンを数個に絞り込む。

#### 4. 研究成果

期間中に腎移植を受けたレシピエントは15名あり、組織学的に急性細胞性拒絶反応や慢性拒絶反応を呈した症例はなく、1名で急性抗体関連型拒絶反応を示した症例のみ1例あった。腎移植後患者を Group1 (腎移植前)、Group2 (腎移植後、腎機能安定)、Group 3 (腎移植後、腎機能安定、腎生検で慢性活動性抗体関連型拒絶なし)、Group 4 (腎移植後、腎機能悪化、慢性活動性抗体関連型拒絶あり)に分類することに決め、それぞれの血液サンプルをT細胞、CD4およびCD8細胞に分離して(RosetteSep Human T cell, Enrichment Cocktail, Stemcell) -80 冷凍保存した。

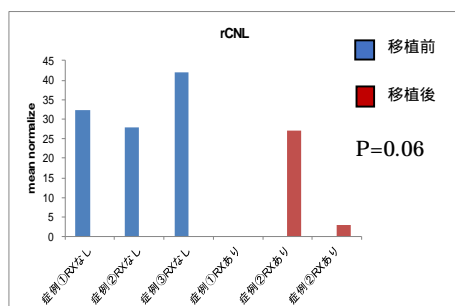
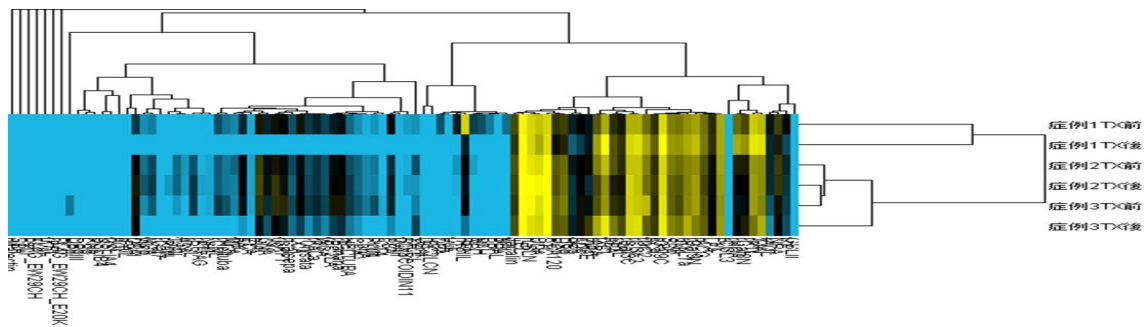
実際に保存サンプルで使用できたのは合計7例{血液適合・一致移植(リツキサンなし)3例、血液不適合移植4例(リツキサン(RTX)施行)}であった。急性抗体関連型拒絶反応を示した症例でのサンプル量は不十分であり、拒絶反応での糖鎖発現の変化を測定することは不可能となった。そこで、本研究では移植前後、リツキサン投与前後および術後1年以上での各T細胞の糖鎖発現の変化について調べた。

##### 1. 移植前後における反応性レクチンの変化(全体 n=7)



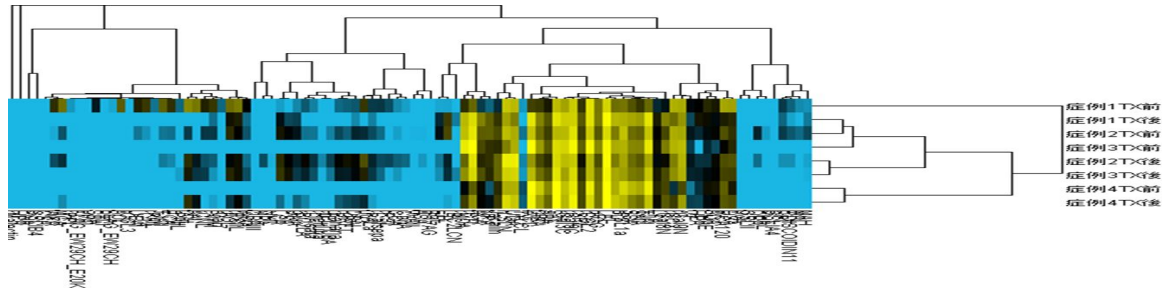
対応糖鎖  
Alpha,betaGalNAc(A, Tn, LacDiNAc)

##### 2. 血液型適合・一致症例における反応性レクチンの変化(n=3)



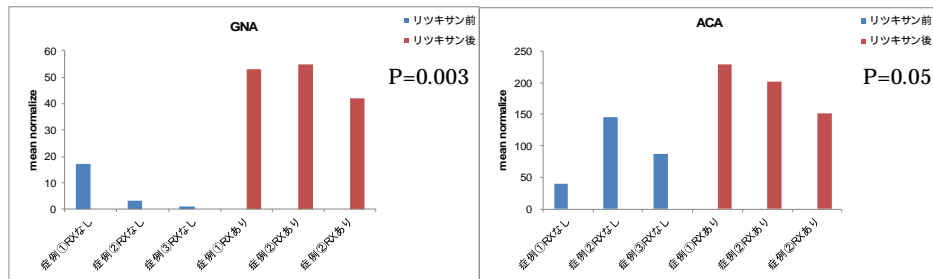
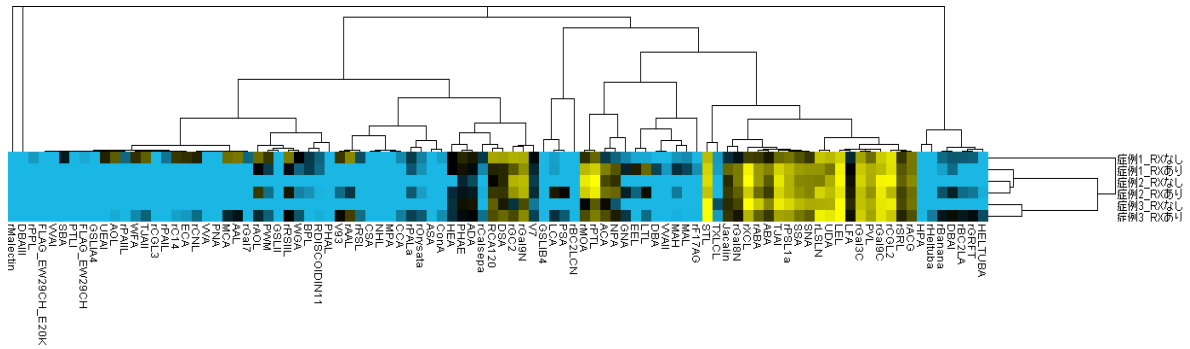
対応糖鎖  
Alpha,betaGalNAc(A, Tn, LacDiNAc)

### 3. 血液不適合症例における反応性レクチンの変化(n=4)



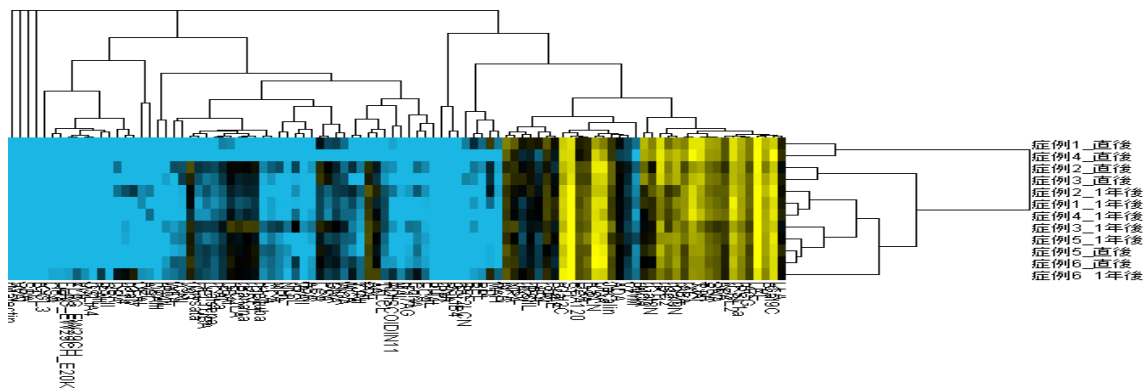
有意差のある反応性レクチンはなし

### 4. リツキサン前後の反応性レクチンの変化(n=3)



GNA 対応糖鎖  
 Manalpha1-3Man,  
 Manalpha1-6Man  
 ACA 対応糖鎖  
 Galbeta1-3GalNAc(T)

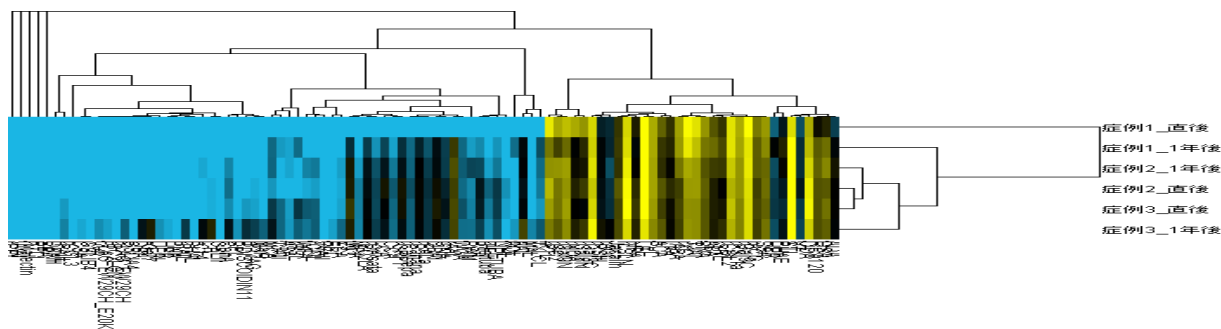
### 5. 移植長期における反応性レクチンの変化 (全体, n=6)



lectin	P	glycan
1 TXLCL	<0.001	galactosylated N-glycans up to triantenna
2 rPTL	0.002	alpha1-6Fuc
3 AOL	0.003	alpha1-2Fuc(H), alpha1-3Fuc(Lex), alpha1-4Fuc(Lea)
4 rGAL9N	0.01	GalNAcalpha1-4Gal(A), PolyLacNAc
5 rMOA	0.02	alphaGal(B)
6 AAL	0.02	alpha1-2Fuc(H), alpha1-3Fuc(Lex), alpha1-4Fuc(Lea)
7 UEAI	0.02	alpha1-2Fuc
8 MAL	0.02	alpha2-3Sia
10 rGC2	0.03	alpha1-2Fuc(H), alpha1GalNAc(A), alphaGal(B)

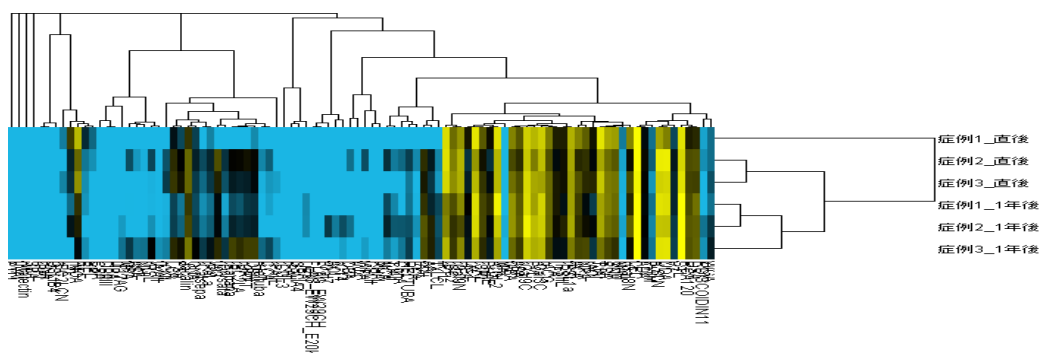
11	RCA120	0.04	bata-Gal
12	rAAL	0.05	alpha1-2Fuc(H), alpha1-3Fuc(Lex), alpha1-4Fuc(Lea)
13	rC14	0.07	brached LacNAc
14	PHAE	0.08	bisecting GlcNAc
15	NPA	0.09	Manalpha1-3Man

6. 移植長期における反応性レクチンの変化 (血液適合・一致, n=3)

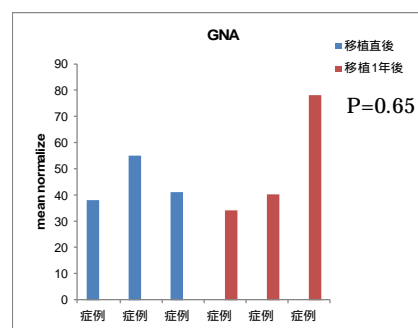


lectin	P	glycan
1	0.02	alpha1-2Fuc(H), alpha1-3Fuc(Lex), alpha1-4Fuc(Lea)
2	0.06	alpha1-2Fuc(H), alpha1-3Fuc(Lex), alpha1-4Fuc(Lea)
3	0.06	alpha2-3Sia
4	0.06	galactosylated N-glycans up to triantenna
5	0.09	Manalpha1-3Man

7. 移植長期における反応性レクチンの変化 (血液不適合, n=3)



lectin	P	glycan
1	0.001	polylactosamine(GlacNAc)n
2	0.003	polylactosamine(GlacNAc)n
3	0.005	galactosylated N-glycans up to triantenna
4	0.006	GalNAcalpha1-4Gal(A), PolyLacNAc
5	0.02	alpha1-2Fuc(H), alpha1GalNAc(A), alphaGal(B)
6	0.03	alpha1-6Fuc
7	0.04	GlcNacbeta1-6Man(teraantenna)
8	0.07	alphaGal(B)
9	0.09	alpha1-2Fuc(H), alpha1-3Fuc(Lex), alpha1-4Fuc(Lea)



以上の結果から、移植前後での糖鎖変化は血液適合・一致および血液不適合移植で有意なものではなかった。一方で、術後長期経過の中で血液適合・一致および血液不適合移植ともに、T細胞の様々な糖鎖が変化することが明らかになった。リツキサンを使用する血液不適合移植では、リツキサン投与前後で Manalpha1-3Man または Manalpha1-6Man の発現が有意に増えることが明らかとなった。そして、この変化が術後長期に渡って保持されることも明らかとなった。以上の結果は、血液型不適合移植においてリツキサンが免疫寛容を誘導する機序を解明する足がかりとなる可能性がある。

## 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕0 件

## 6．研究組織 筑波大学消化器外科

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：館野浩章、

ローマ字氏名： Tateno Hiroaki

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：生命工学領域 創薬基盤研究部門

職名：上級主任研究員

研究者番号(8桁): 30450670

研究分担者氏名：大河内信弘

ローマ字氏名： Ohkohchi Nobuhiro

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系

職名：教授

研究者番号(8桁): 40213673

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：高橋一広

ローマ字氏名： Takahashi Kazuhiro

研究協力者氏名：梁宸

ローマ字氏名： Liang Chen

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。