

令和元年6月14日現在

機関番号：82506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10445

研究課題名(和文) 遺伝子多型を利用した移植臓器障害の迅速診断法開発に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Detecting and quantifying donor derived cell free DNA in the blood of solid organ transplant recipients as a biomarker for graft injury.

研究代表者

西郷 健一 (SAIGO, KENICHI)

独立行政法人国立病院機構(千葉東病院臨床研究部)・その他部局等・研究員

研究者番号：60323424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：移植臓器障害の確定診断は生検材料の組織病理学的診断によるが侵襲的で臓器の種類によっては困難ですらある。そこで移植臓器が障害された際に血中から放出されるDNAを定量することで迅速で非侵襲的な診断法を目指し、遺伝子一塩基多型を識別マーカーとしてレシピエント血中よりドナー由来DNAの定量を行い病理組織診断、臨床検査データ、臨床所見と比較検討を行ったところ、拒絶反応の際に測定値が上昇し治療による定常値への回復や抗免疫療法が不足した際に測定値の上昇がみられ移植臓器障害や免疫抑制療法を評価しうるバイオマーカーとしての有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫学や免疫抑制剤の進歩により臓器移植の成績が向上していると言うものの、未だ拒絶反応は移植臓器の長期生着にとって大きな問題である。また、その確定診断を得るための生検は侵襲的であり移植臓器の種類によっては困難ですらある。今回計画した障害された或いは壊死に陥った細胞から血流中に放出されるDNA断片であるドナー由来cell-free DNAの測定を利用した方法は拒絶反応を迅速かつ非侵襲的に診断しうる新たな診断法となりうると考えられた。また、抗免疫療法の評価法としての可能性も示唆され臓器移植症例毎の抗免疫療法の評価というオーダーメイド医療への発展も期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：Acute or chronic graft rejection is the primary threat to transplant recipients. Development of diagnostic test(s) with non-invasive biomarker to monitor allograft status will gain quality of life of transplant recipients. Measurement of donor derived cell free DNA (ddcfDNA) in the blood have been described as such a non-invasive biomarker for organ transplantations. Plasma collected after transplantation were examined. The ddcfDNA percentages were highly elevated on the first day after transplantation, and remained highly variable during the first week, then exponentially decreased to value below 1% after two weeks in stable patients with no sign of rejection. The percentages were elevated in the presence of rejection and decreased to the baseline after treatment. The quantification of ddcfDNA is the promising method to detect graft injury at early stage. This non-invasive method enables us close follow up the graft injury and prevent graft rejection.

研究分野：外科学

キーワード：拒絶反応 cell free DNA SNP 臓器移植 移植臓器障害

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

1. 研究開始当初の背景

我が国では末期腎不全の腎代替療法の一つとしてとして 1964 年に初めて腎臓移植が行われ、現在年間約 1,600 件の腎臓移植が行われている。免疫学の進歩や新しい免疫抑制剤の開発もあり腎移植の成績も向上しているものの、移植腎機能が早期から低下する症例がありそれらに対していかに移植腎機能を維持できるか等の研究が行われてきた。

我々も腎機能を低下あるいは喪失させる拒絶反応に関わるとされる遺伝子、TGF β 遺伝子の変化(Hutchinson IV et al. *Transplant Proc* 1999, J.-Y.Park et al. *Tissue antigens* 2001.)とそれによって引き起こされるとされる Chronic allograft nephropathy といわれる変化や、拒絶反応の診断や治療法の選択を目指す研究を行ってきた。その結果は遺伝子多型に人種差を認めたと拒絶を始めとする臓器障害の診断に関しては移植腎生検に及ぶものではなかった(Saigo K et al. *Transplant Proc* 2014)。更に代表的な免疫抑制薬シクロスポリンやタクロリムスは共に肝臓で薬物代謝酵素であるチトクローム P 450 (CYP3A4) により代謝される。CYP に関しては薬剤代謝酵素としての重要性から Allele Nomenclature database としてデータが蓄積・更新されつつ公開されており、移植症例についても解析が進められ、免疫抑制剤シクロスポリン或いはタクロリムスに対する生体反応にはかなりの個人差を認めこれら薬物の反応性に影響を及ぼす因子として遺伝子の一塩基多型(SNPs)についての報告がされて来た(Xin Zhang et al. *Clinical Transplantation* 2005. Pamela A Jacobson et al. *Transplantation* 2012)。このように臓器移植症例に対してこれら薬剤反応性遺伝子や免疫反応に係る遺伝子の SNP 解析を通じて臨床レベルでの遺伝子診断を行う事で、薬物の臨床効果・評価ひいては移植治療の予後向上の可能性が考えられるようになり、2011 年に入り共に pleiotropic effects を有するスタチン薬及びイムノフィリン作用薬に影響する CYP の SNP が報告され(Wang et al. *Pharmacogenomic J* 2011. Elens et al. *Pharmacogenomics* 2011)、我々も CYP 遺伝子の多型解析を行ってきたが薬剤投与量等との関連は認めたと移植臓器機能の指標とはなり得なかった。

移植臓器の繊維化あるいは薬剤の代謝や輸送といった遺伝子の機能とは全く異なる側面から移植臓器障害の際の遺伝子解析の有用性が報告されるようになってきた。腎移植において男性ドナー特有の Y 染色体が女性レシピエント尿中及び血漿中で観察され臓器障害の指標になりうる事が報告された(Zhong XY et al. *N Y Acad Sci* 2001. Gracia Moreria V et al. *Clin Chem* 2009)事を契機に、臓器移植後にレシピエントの末梢血中からドナー由来の cell-free DNA(donor-derived cell-free DNA;ddcfDNA)を定量的に検出することが移植臓器の拒絶反応や臓器障害の指標になり得る可能性が報告されてきた(Thomas MS et al. *PNAS* 2011. E.M. Gielis et al. *Am J Transplant* 2015)。心臓や肺、膵臓など拒絶反応の診断を得るために腎臓に比較し生検が容易に行えない際の有用性に言及されてきたが、どのような ddcfDNA を選択し、いかにして定量的に検出するかが今後の課題と考えられる。

2. 研究の目的

移植医療において免疫抑制療法への進歩は移植臓器を安定した状態で生着させることを可能とした。しかしながら現時点でも移植臓器機能廃絶は大きな問題であり、その原因は拒絶反応と免疫抑制剤の副作用による慢性臓器障害であると考えられる。移植症例の移植臓器の長期生着ひいては QOL を維持するため、移植臓器の生検以外に移植臓器障害を非侵襲的で安全かつ速やかに検出できる新たな機能評価法の開発が望まれる。異性間での移植において移植臓器障害の際に女性レシピエントの血液中に男性ドナー由来の Y 染色体が認められることが報告されていることを基に、本研究では劇的に進歩している次世代シーケンシング技術を用いてレシピエント血中に漏出する極微量のドナー由来の DNA 測定を試み、病理組織検査を含む臨床検査データと比較検討を行い拒絶反応及び臓器障害の指標としての評価を行い、ひいてはリスクの高い症例への積極的な介入による予防や移植臓器機能廃絶の最大の原因である拒絶反応などに対するモニタリングによる治療への早期介入により移植臓器の長期生着、QOL の維持への貢献を含めテラーメイド医療の具現化と云った臨床応用への発展を目的とする。

3. 研究の方法

研究同意の得られた生体腎移植症例を対象に先ずドナー・レシピエントの個人識別が可能な SNPs を選定した。Human genetic variation database の SNP より low quality のものを除外し、Minor Allele Frequency 0.45-0.55 の範囲で存在する染色体の異なる 17 個を選択し polymerase chain reaction (PCR) の primer sets を作成。ドナー C C レシピエント A A のような different homozygote あるいはドナー A C レシピエント A A のような donor heterozygote を informative SNP として 17 個の primer sets より症例毎に選択。EDTA-2K 採血管にドナー血液を採取し、13,000g で分遠心し血漿を分離し NucleoSpin Plasma XS スピニングカラムを用いてドナー血漿より ddcfDNA を抽出。抽出した ddcfDNA を鋳型にそれぞれの症例で Informative な primer sets を用いて PCR で増幅、そのようにして得られたライブラリーから次世代シーケンサーを用いてレシピエントの血液中に漏出する極微量の ddcfDNA の定量を行う。

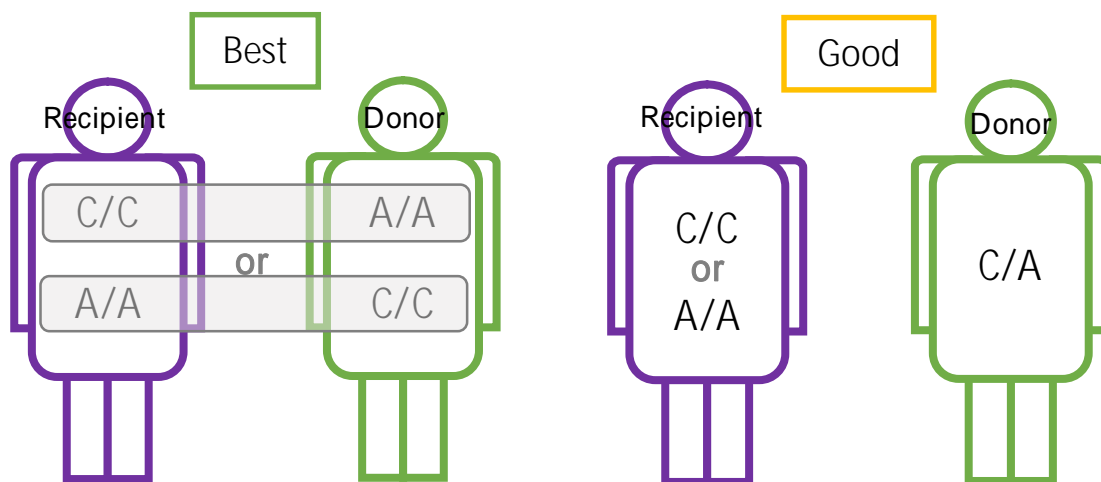
レシピエントからの検体採取は、術後 1、3、5、7、14、28 日及び臓器障害を疑わせる兆候のあった際に行い ddcfDNA 定量を実施し血液検査データや生検による病理組織検査結果との比較検討を行い、ddcfDNA の術後の経時的変化の確認と ddcfDNA 測定値の変化が拒絶反応や臓器障

害の指標として臨床応用が可能かについて検討した。

4. 研究成果

ドナー・レシピエントを識別するために an genetic variation database という日本人のデータベースに登録された SNPs 377,021 より low quality SNPs を除外した 165,150 から minor allele frequency が 0.45 から 0.55 のものを選択し 4,240 の候補がえられた。それらの中から異なる染色体上の 17SNPs を選択した。10 組のドナー・レシピエントの DNA 塩基配列を基に 17SNPs の中から個人識別が可能となる informative primer sets を選定し症例ごとに 2 sets から 7 sets が得られた。

ドナー・レシピエント個人識別可能な genotype の組み合わせ例



10 組のドナー・レシピエント

no	recipient	原疾患	donor	関係	ABO 不適合
1	43, M	左低形成腎	72, F	親子	*
2	34, M	IgA 腎症	62, F	親子	
3	65, F	慢性腎炎(疑)	70, M	夫婦	
4	57, M	糖尿病性腎症	57, F	夫婦	
5	55, M	糖尿病性腎症	53, F	夫婦	
6	30, M	高血圧性腎症	45, F	叔母甥	
7	60, F	慢性腎炎(疑)	67, F	姉妹	*
8	43, M	IgA 腎症	71, F	親子	
9	49, M	糖尿病性腎症	44, F	夫婦	*
10	40, M	SLE	65, F	叔母甥	

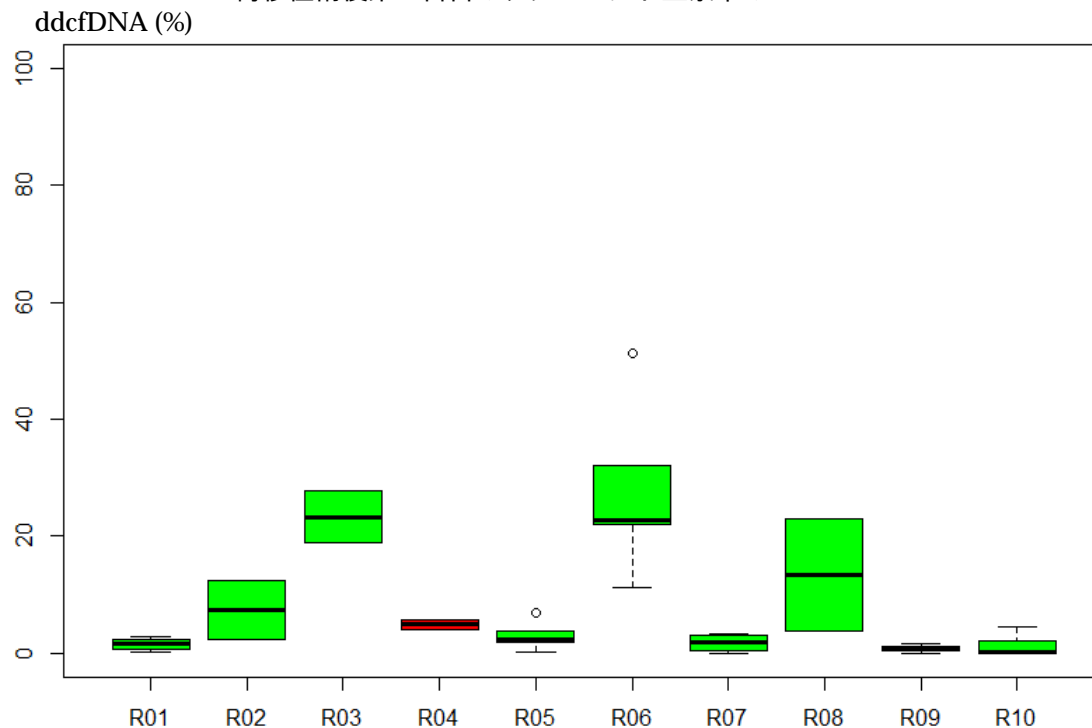
症例 4 は術後 61 日目に腎生検で acute T-cell mediated rejection と診断される。

ドナー・レシピエント (DR) での informative primer sets

Primer	1DR	2DR	3DR	4DR	5DR	6DR	7DR	8DR	9DR	10DR
P01S	Good					Good	Good		Good	
P02S						Good				Best
P03S										
P04S	Good							Good		Good
P05S			Good							Good
P06S		Good			Good		Good			
P07S					Best					Good
P09S				Good					Good	Good
P10S					Good	Good		Good	Good	
P11S					Good					
P14S		Good			Best	Good				
P15S	Good		Good		Best					Good
P16S	Good			Good		Good	Good			
P17S							Best		Good	Good

ddcfDNA が高値となると報告されている術後第 1 日目のレシピエント血漿中から我々が計画した方法で定量が可能かを先ず検証を行う事とし、各症例ごとに選定された informative primer sets を用い PCR で pre-amplify し NGS で定量を行った。

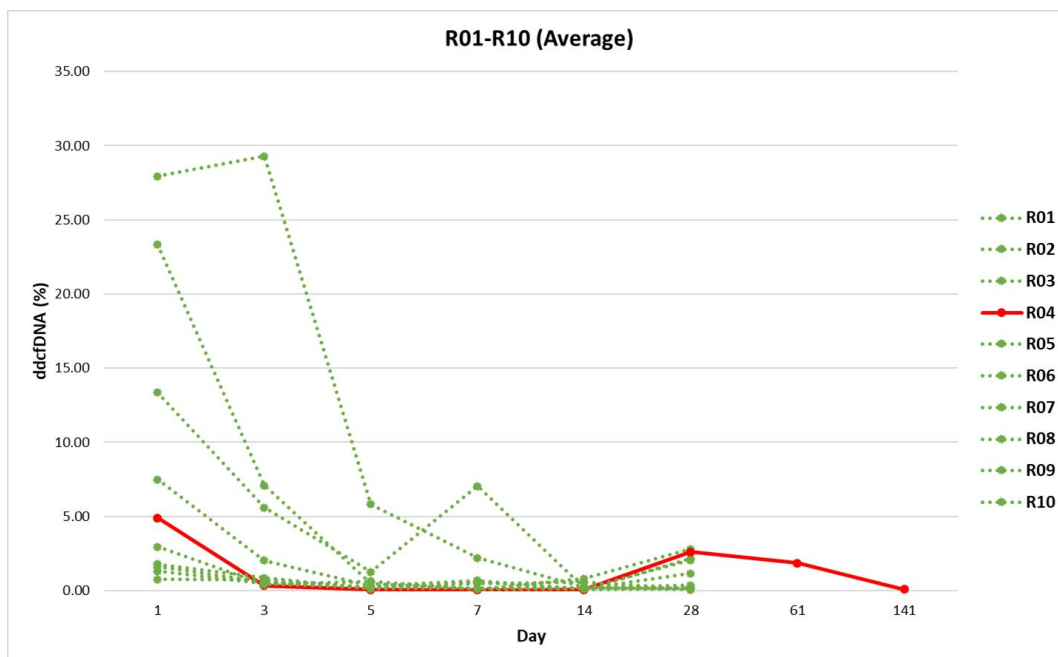
腎移植術後第 1 日目のレシピエント血漿中の ddcfDNA



上のグラフに示すように 10 症例総てのレシピエント血漿から夫々 ddcfDNA が定量可能で、その割合は 0.01% から 51.34% の範囲であった。

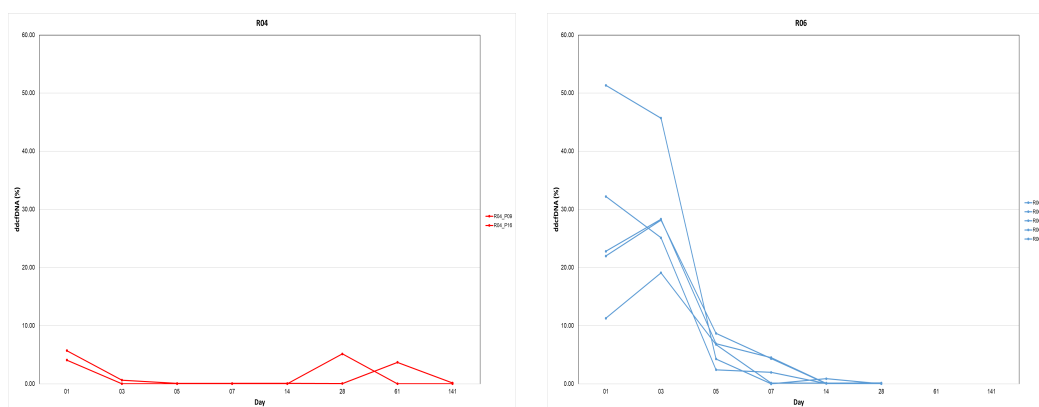
我々の考案した測定系での定量が可能であることが分かったので、術後経時的に収集されたサンプルと移植臓器障害を疑わせる兆候があった際に収集されたサンプルを用いて ddcfDNA の定量を試みた。ddcfDNA の定量に用いた primer sets に違いはないが、症例ごとに informative となりうる primer sets やその数には違いがあるので、測定値は症例ごとの平均値で比較検討してみると、殆どの症例で術後 1 日目の測定値をピークとして 14 日目にかけて徐々に低下し 28 日目で若干の上昇を認める。術後 28 日目のレシピエント血漿中の ddcfDNA の上昇は術後 3 週間から 4 週間目にかけて行われる移植腎生検による影響も考えられた。

腎移植後各症例の ddcfDNA 経時的变化



観察中に術後 61 日目に施行した移植腎生検で組織病理学的に拒絶反応(acute T-cell mediated rejection Banff IIA)と診断された症例 4 では定常状態と比較し ddcfDNA の測定値の上昇が認められる。症例 4 の術後 28 日目の測定値上昇は術後 26 日目に行った腎生検(検体量が少なく診断不能)の影響と報告にあるように病理組織診断に先立つ ddcfDNA の上昇が加わった可能性があるが詳細は不明である。症例 8 その他の症例と異なり術後 7 日目の測定値が上昇し術後 14 日目に定常状態に復旧している。術後 7 日目にかけて血中 Cre、Cys-C、尿素窒素などの移植腎機能を反映する検査値は徐々に改善し尿量も維持されていたが、体重で計算され 7 mg 投与されていた免疫抑制剤・プログラフの血中濃度が徐々に低下し投与量を増やし 7 日目には 9 mg が投与されるが目標血中濃度 8~15ng/ml に対し 3.6 まで低下、術後 14 日目に投与量を 15 mg まで増量し 9.0ng/ml という血中濃度を達成しえた。しかし Cre、Cys-C、尿素窒素は術後 7 日目までと比較し上昇傾向に転じ Cre は 1.77 から 2.11 mg/dl、Cys-C は 1.79 から 2.39 mg/dl、尿素窒素は 27.5 から 31.9 mg/dl を示していた。この事は免疫抑制剤の不足による抗免疫療法の減弱によって拒絶反応に類する移植腎障害がおり、免疫抑制剤の増量と共に障害が改善されたことを従来の検査よりもより鋭敏にかつ早期に検出したものと考えられた。

各症例における primer sets ごとの測定値 (症例 2、6)



各症例で用いた primer sets での測定値についてみると、primer set により測定値に差が認められた。症例 2 においては組織病理学的には大きな障害の見られない術後 28 日目で 2 つ informative primer sets の 1 つを用いた ddcfDNA の測定値の上昇が認められ、61 日目に組織病理学的に拒絶反応と診断された際には別の primer sets での測定値は上昇を認めたが 28 日目に上昇を検出したものでは定常値を示していた。また症例 6 では informative primer sets 5 つを用いた ddcfDNA の経時的な測定値の変化は概ね類似のパターンを示していたが術後 3 日目に 1 日目よりも測定値が上昇しその後は他と同じく低下していく 3 sets が認められた。サンプルは同一のものを使用していることから、この原因として primer の条件や PCR を行った際の増幅の影響が考えられる。他の報告でも ddcfDNA を検出するための SNP の数を多く設定しているのはこのような primer による増幅の差を数多くの primer sets を使う事で平均化するためと考えられた。

以上の結果や考察より個人識別のための SNP を検出する primer sets を多数設定し、PCR に

よる増幅の差を出来るだけ抑えるためにキャプチャーを取り入れたシステムを計画し臨床応用を目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

第 34 回腎移植・血管外科研究会 (2018)

第 54 回日本移植学会総会 (2018)

第 119 回日本外科学会定期学術集会 (2019)

19th Congress of European Society for Organ Transplantation (2019), accepted

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：井ノ上 逸郎

ローマ字氏名：(INOUE, ituro)

所属研究機関名：国立遺伝学研究所

部局名：ゲノム・進化研究系 人類遺伝研究室

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：00192500

研究分担者氏名：坪 尚武

ローマ字氏名：(AKUTSU, naotake)

所属研究機関名：独立行政法人国立病院機構

部局名：千葉東病院臨床研究部

職名：部長

研究者番号 (8 桁)：00344979

研究分担者氏名：北村 博司

ローマ字氏名：(KITAMURA, hiroshi)

所属研究機関名：独立行政法人国立病院機構

部局名：千葉東病院臨床研究部

職名：研究員

研究者番号 (8 桁)：40287701

研究分担者氏名：丸山 通広

ローマ字氏名：(MARUYAMA, michihiro)

所属研究機関名：独立行政法人国立病院機構

部局名：千葉東病院臨床研究部

職名：研究員

研究者番号 (8 桁)：40399754

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。