

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06786

研究課題名(和文) 移植肝の遺伝的背景に着目した拒絶反応回避に関する新規分子機構の探索

研究課題名(英文) Survey of molecular mechanisms for avoiding rejection focusing on the genetic background of liver allograft

研究代表者

田島 壮一郎 (Tajima, Soichiro)

九州大学・大学病院・薬剤師

研究者番号：10579460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体肝移植後の拒絶反応の発症は、しばしば致命的な肝機能障害をもたらす。このため生体肝移植における免疫抑制導入療法は、より厳密な管理が必要とされる。肝移植後免疫抑制療法における拒絶反応克服を目指し、移植肝の遺伝的背景に着目した新規分子機構の探索を行った。生体肝移植患者を対象に拒絶反応発現の個人差に関わる候補分子IFRに着目し、免疫応答の中心的役割を果たす細胞傷害性リンパ球(NK細胞)を用いて解析を進め、IFRとNK細胞の細胞傷害活性との関連性が示された。従って、移植肝におけるIFRの発現がNK細胞の細胞傷害活性を低下させ、拒絶反応回避に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植直前のドナー肝を用いた遺伝子発現解析により得られた新しい免疫制御因子としてのIFRに着目し、IFRのNK細胞における細胞傷害活性の抑制作用を明らかにした。臨床的にはIFRが新しい作用機序の画期的な免疫抑制薬の標的分子となりうることを示唆され、IFRの免疫学的意義の詳細な解明によって、多方面への波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The development of acute rejection after living-donor liver transplantation (LDLT) often results in fatal liver dysfunction. Therefore, immunosuppression induction therapy in LDLT requires stricter control. In order to overcome rejection in post-liver transplantation immunosuppressive therapy, we searched for a novel molecular mechanism focusing on the genetic background of liver allograft. Focusing on IFR as a candidate molecule involved in individual differences in rejection in LDLT patients, we proceeded with analysis using cytotoxic lymphocytes (NK cells) that play a central role in rejection. As a result, the relationship between IFR and cytotoxic activity of NK cells was shown. Therefore, it was suggested that the expression of IFR in liver allograft reduced the cytotoxic activity of NK cells and may be involved in the avoidance of rejection.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：生体肝移植 拒絶反応 免疫抑制薬 個別化医療 免疫寛容

### 1. 研究開始当初の背景

生体肝移植において、術後の免疫抑制薬タクロリムスに対する感受性には個人差があるため、目標血中濃度の個別化など薬学的な個人差の克服が求められている。これまでにタクロリムス体内動態の個体差に関する多くの研究が行われており、小腸移植術並びに肝移植術直後のタクロリムス経口用量の指標として小腸粘膜に発現するMDR1( multidrug resistance protein 1 ) の mRNA 発現量が有用な指標となること ( Masuda S et al., Clin Pharmacol Ther. 68: 98-103, 2000 ) 肝移植術 2 週目以降のタクロリムス体内動態の個体差は薬物代謝酵素 CYP3A5 の機能欠損を引き起こす CYP3A5\*3 多型 ( 遺伝子多型 ) の影響を強く受ける事などが明らかにされている ( Goto M et al. Pharmacogenetics. 14: 471-478, 2004 )。しかし、血中濃度が目標域にあるにもかかわらず拒絶反応を示す症例が散見され、タクロリムスに対する感受性にも個人差があることが指摘されている。

生体肝移植を施行された患者の原疾患として、C 型肝炎ウイルス ( HCV ) 感染による肝硬変や肝細胞がんが多数を占めており、この HCV 感染による肝硬変患者への肝移植で最も問題となっているのが、ウイルスの再感染と肝炎の再燃である。つまり、肝移植時に肝外組織に遺残した HCV が移植肝に再感染し、その後急速かつ著明に増殖することで肝炎の再発を引き起こすこととなる。肝移植術後の C 型肝炎再発の特徴としては、免疫抑制薬を使用する影響により (1) 血液中のウイルス量が多い、(2) 慢性肝炎から肝硬変への進展が早い、(3) 非移植患者に比べて抗ウイルス治療の効果が低いことなどが挙げられる。その結果、他の疾患に比べて移植後 1 年で約半数が慢性肝炎を発症し、5 年後には約 20-30% の患者で肝硬変に移行するため、肝移植後の長期予後は不良である。近年、インターフェロンを使用しない直接作用型抗ウイルス薬 ( Direct Acting Antivirals : DAA ) が開発され、肝移植後の HCV 再発患者に対する劇的な効果が報告されているが、長期間使用によるウイルスの再燃や薬剤選択 ( DAA の組み合わせや免疫抑制薬との相互作用 ) など、克服すべき課題も多い。

これまでに HCV に感染している肝移植患者を対象とした網羅的な遺伝子解析を実施し、肝移植後の HCV 治療あるいは免疫抑制療法に対する感受性に影響を与えるいくつかの新しい遺伝子を見出した。そこでこれらの遺伝子を Immunomodulatory Factors of hepatitis C reactivation and Rejection ( IFR ) と命名し、肝移植後の拒絶反応発現の個人差に関連する候補因子として注目した。すなわち移植肝における IFR の発現量やその種類差が、肝移植後の拒絶反応に何らかの影響を及ぼしていることが考えられる。これらの背景から、IFR 自体の免疫学的意義の解明と肝移植術後経過に伴って発症する拒絶反応の対処法の開発によって移植肝の長期生着をもたらすことが期待される。

### 2. 研究の目的

肝移植術後の移植片不全の要因として、レシピエント側の脂肪肝、肝酵素・ビリルビンの上昇、さらに高ナトリウム血症の有無等が報告 ( Belli LS, et al., Dig Liver Dis. 47(8):689-94, 2015 ) されているが、肝移植後の予後に影響を与えるドナー側の遺伝子発現プロファイルについて網羅的に検討した報告は殆どない。そこで本研究では、移植直前のドナー肝を用いた遺伝子発現解析により得られた新しい免疫制御因子 IFR に着目し、IFR の機能・生理的役割を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

臓器移植における拒絶反応の中心は、細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte : CTL) や細胞傷害性リンパ球 (NK 細胞) であり、その活性化が移植された臓器の生着に大きく関与している。IFR は CTL の細胞死を誘導するとの報告があるが、詳しいシグナル伝達や NK 細胞に対する作用については不明である。そこで本研究では、NK 細胞による細胞傷害性は、フローサイトメトリーを用いて評価した。すなわち、ヒトナチュラルキラー様細胞株である KHYG-1 細胞 (Effector 細胞) およびヒト前骨髄性白血病細胞株である K562 細胞 (Target 細胞) を選択し、Effector/Target 比=5:3 となるように共培養 6 時間後における target 細胞の annexin-V 陽性細胞率を比較することで NK 細胞による細胞傷害性評価を行なった。IFR は、50  $\mu$ M となるように混合培養 1 時間前に Target 細胞に添加した。また、NK 細胞の IFN- $\gamma$  産生に対する IFR の影響については、ELISA 法や real time PCR 法を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

KHYG-1 および K562 細胞の細胞死に対する IFR の影響を検討するため、それぞれの細胞に IFR を 12 時間添加した結果、IFR の濃度依存的 (20, 50, 75, 100  $\mu\text{M}$ ) に細胞死誘導を認められた (図 1)。また KHYG-1 と K562 細胞を用いた killing assay 系において、細胞を AnnexinV で染色した後、直ちにフローサイトメーターによって検出した結果、KHYG-1 による K562 細胞に対する細胞傷害活性が確認された。この条件下で IFR 50  $\mu\text{M}$  を 6 時間添加した結果 K562 細胞に対する攻撃性は回避され、細胞死が減少傾向にあることが示された (図 2)。これらの結果より、IFR は NK 細胞の細胞死を誘導し、細胞傷害活性を低下している可能性が示唆された。

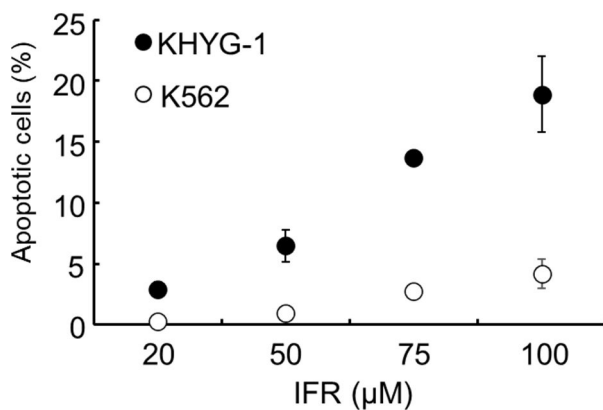


図 1. KHYG-1 および K562 細胞に対する IFR 濃度依存的な細胞死誘導

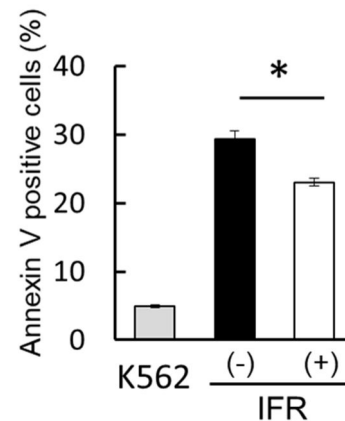


図 2. Killing assay 系を用いた細胞傷害活性の評価

NK 細胞の  $\text{IFN}\gamma$  産生に対する IFR の影響を調べるため、KHYG-1 細胞を用いて  $\text{IFN}\gamma$  mRNA および  $\text{IFN}\gamma$  発現について解析を行った。これまでの研究から ibrutinib (IBR) が、NK 細胞の  $\text{IFN}\gamma$  産生を抑制することが報告されているので IBR を positive control として実験に用いた。KHYG-1 単独培養時と比べて、K562 細胞および KHYG-1 細胞の共培養によって  $\text{IFN}\gamma$  mRNA 発現および  $\text{IFN}\gamma$  産生は有意な増加を認めた。この条件下で IFR を添加した結果、 $\text{IFN}\gamma$  mRNA および  $\text{IFN}\gamma$  産生に有意な変化は認められなかった。一方、IBR はこれらの変化を抑制した (図 3, 図 4)。今回の検討により、肝移植術後における移植肝の IFR 発現が NK 細胞の細胞傷害活性を低下させ、拒絶反応回避に関与している可能性が示唆された。今後は免疫抑制薬を用いた検討を重ねることで、免疫担当細胞に対する IFR の分子作用機序が明らかになると期待される。

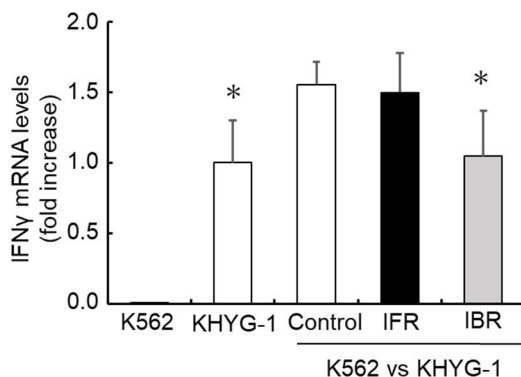


図 3. IFR 添加における  $\text{IFN}\gamma$  mRNA 発現

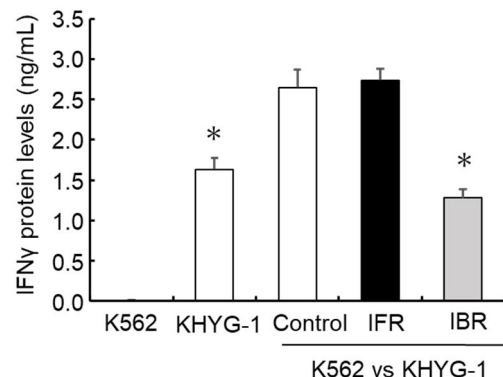


図 4. IFR 添加における  $\text{IFN}\gamma$  産生

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Zhang Mengyu, Tajima Soichiro, Shigematsu Tomohiro, Noguchi Hiroshi, Kaku Keizo, Tsuchimoto Akihiro, Okabe Yasuhiro, Egashira Nobuaki, Ieiri Ichiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Development and Validation of A Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method to Simultaneously Measure Tacrolimus and Everolimus Concentrations in Kidney Allograft Biopsies After Kidney Transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Therapeutic Drug Monitoring	6. 最初と最後の頁 275 ~ 281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/FTD.0000000000000912	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fu Rao, Tajima Soichiro, Shigematsu Tomohiro, Zhang Mengyu, Tsuchimoto Akihiro, Egashira Nobuaki, Ieiri Ichiro, Masuda Satohiro	4. 巻 341
2. 論文標題 Establishment of an experimental rat model of tacrolimus-induced kidney injury accompanied by interstitial fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 43 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxlet.2021.01.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Zhang Mengyu, Tajima Soichiro, Shigematsu Tomohiro, Fu Rao, Noguchi Hiroshi, Kaku Keizo, Tsuchimoto Akihiro, Okabe Yasuhiro, Egashira Nobuaki, Masuda Satohiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Donor CYP3A5 Gene Polymorphism Alone Cannot Predict Tacrolimus Intrarenal Concentration in Renal Transplant Recipients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2976 ~ 2976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21082976	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Fukuda Mio, Suetsugu Kimitaka, Tajima Soichiro, Katsube Yurie, Watanabe Hiroyuki, Harada Noboru, Yoshizumi Tomoharu, Egashira Nobuaki, Mori Masaki, Masuda Satohiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is Not Associated with Tacrolimus-Induced Acute Kidney Injury in Liver Transplant Patients Who Received Mycophenolate Mofetil with Delayed Introduction of Tacrolimus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3103 ~ 3103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20123103.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Tajima Soichiro, Fu Rao, Shigematsu Tomohiro, Noguchi Hiroshi, Kaku Keizo, Tsuchimoto Akihiro, Okabe Yasuhiro, Masuda Satohiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Urinary Human Epididymis Secretory Protein 4 as a Useful Biomarker for Subclinical Acute Rejection Three Months after Kidney Transplantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4699 ~ 4699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20194699	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tajima Soichiro, Yamamoto Nanae, Masuda Satohiro	4. 巻 170
2. 論文標題 Clinical prospects of biomarkers for the early detection and/or prediction of organ injury associated with pharmacotherapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 113664 ~ 113664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2019.113664	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fu Rao, Tajima Soichiro, Suetsugu Kimitaka, Watanabe Hiroyuki, Egashira Nobuaki, Masuda Satohiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Biomarkers for individualized dosage adjustments in immunosuppressive therapy using calcineurin inhibitors after organ transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Pharmacologica Sinica	6. 最初と最後の頁 151 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41401-018-0070-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 張 夢雨、田島 壮一郎、重松 智博、岡部 安博、江頭 伸昭、家入 一郎
2. 発表標題 腎移植患者におけるタクロリムスおよびエベロリムスの血中濃度と腎組織内濃度の相関性に関する検討
3. 学会等名 第42回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 張 夢雨、田島 壮一郎、重松 智博、付 饒、岡部 安博、江頭 伸昭、家入 一郎、増田 智先
2. 発表標題 腎移植患者における移植腎組織中タクロリムス濃度とドナー腎CYP3A5遺伝子多型の関連
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重松 智博、田島 壮一郎、張 夢雨、末次 王卓、岡部 安博、増田 智先、江頭 伸昭、家入一郎
2. 発表標題 腎移植患者におけるタクロリムスの移植腎組織濃度に及ぼすCYP3A5遺伝子多型の影響
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張 夢雨、田島 壮一郎、重松 智博、付 饒、土本 晃裕、岡部 安博、江頭 伸昭、増田 智先
2. 発表標題 タクロリムスの移植腎組織中濃度と血中濃度との関連に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Soichiro Tajima, Rao Fu, Mio Fukuda, Kimitaka Suetsugu, Yasuhiro Okabe, Satohiro Masuda
2. 発表標題 Urinary Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, as Potential Noninvasive Biomarkers for Subclinical Rejection at 3 Months after kidney Transplantation
3. 学会等名 American Transplant Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rao Fu, Soichiro Tajima, Kimitaka Suetsugu, Nanae Yamamoto, Yasuhiro Okabe, Satohiro Masuda
2. 発表標題 Relationship between autophagy and acute rejection after kidney transplant
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology(WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田島 壮一郎, 付 饒, 末次 王卓, 土本 晃裕, 岡部 安博, 増田 智先
2. 発表標題 腎移植患者の急性拒絶反応発現を検出するための新規尿中バイオマーカーの探索
3. 学会等名 第28回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	増田 智先  (MASUDA Satohiro)  (90303825)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------