

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08594

研究課題名(和文) ペプチド探索による腎移植後抗体関連型拒絶反応に対する新規バイオマーカーの確立

研究課題名(英文) Establishment of novel biomarkers with peptide for antibody-mediated rejection after kidney transplantation

研究代表者

今村 亮一 (Imamura, Ryoichi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40456976

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)：腎移植において抗体関連型拒絶反応は難治性拒絶反応であり、早期診断できなければ不可逆的となり、移植腎機能廃絶にいたる。現在のところ、診断方法は腎生検しかない。腎生検は侵襲的であるがゆえ短期間で頻回に施行することは難しい。本拒絶反応をモニタリングできるバイオマーカーの発見が求められている。

本研究ではBLOTCHIP-MS法という、従来の質量分析法では解析することができなかった低分子量レベルのペプチドも解析しうる手法を用いて、抗体関連型拒絶反応発症患者の血液中のバイオマーカー候補を探索した。その結果Kininogen1とFibrinogenが拒絶反応発症時に特異的に変化することが同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎移植後抗体関連型拒絶反応は、診断や治療が遅れると腎廃絶にいたる。廃絶により再び末期腎不全に陥り、最終的に患者生命予後に大きく影響する。本拒絶反応の治療のためには可能な限り早期に診断することが大変重要であり、そうすることは腎移植患者のみならず医療経済上も医療費削減に大きく貢献できるため、早期診断法の探索は重要研究事項であった。残念ながらこれまで優れたバイオマーカーを発見できず、腎移植後生存率や生着率の向上に貢献できなかった。新たなバイオマーカーの候補が同定しえたことは、非侵襲的モニタリングという意味で学術的に、患者生命予後や医療経済という面で社会的に大変意義深いと考えている。

研究成果の概要(英文)：In renal transplantation, antibody-mediated rejection is a refractory rejection, and it becomes irreversible, leading to the graft loss if it cannot be diagnosed early. Currently, the only diagnostic method is renal biopsy. Renal biopsy is invasive and therefore difficult to perform frequently in a short period of time for diagnosing earlier. There is a need to discover new biomarkers that can monitor this rejection easily. In this study, we used the BLOTCHIP-MS method, a method that can analyze peptides at low molecular weight levels that could not be analyzed by conventional mass spectrometry. With this new generation mass spectrometry, we looked for biomarker candidates in the blood of patients with antibody-mediated rejection. It was identified that Kininogen1 and Fibrinogen change specifically at the onset of the rejection. It was suggested that the rejection could be detected earlier by monitoring the changes of these two biomarkers.

研究分野：臓器移植学

キーワード：腎移植 抗体関連型拒絶反応 バイオマーカー 質量分析 BLOTCHIP-MS

1. 研究開始当初の背景

腎移植後腎廃絶の最も大きな原因は慢性拒絶反応及び急性拒絶反応であることが報告されている。それぞれには細胞性拒絶反応と抗体関連型拒絶反応があり、前者は治療方法が確立されているものの、後者は簡便な診断方法だけではなく、明確な治療方法が確立されていない。

腎移植後抗体関連型拒絶反応を診断するためには、現在のところ腎生検あるいは血清を用いた抗ドナー抗体を捕捉する抗体同定検査しかない。しかしながら前者は侵襲性が高く頻回に施行することが難しいことに加え、出血や腎動静脈瘻等、少なからず合併症も存在する。後者は採血のみで簡便であるが、結果が出るまで時間がかかり、検査自体が高価である。また検査結果が出たところには、すでに拒絶反応が不可逆の状態まで進行している可能性もある。抗体関連型拒絶反応は早期診断しなければいかなる治療を行っても改善することはなく、簡便な早期診断方法の確立が望まれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、繰り返し簡便に施行でき、かつ侵襲性が少ない抗体関連型拒絶反応に対する診断方法を確立することにある。採血等の軽微な侵襲で施行可能な診断方法を確立することで、早期介入が不可欠な抗体関連型拒絶反応に対する治療を通じて、さらなる長期の生存率及び移植腎生着率の成績向上を目指す事である。

3. 研究の方法

抗体関連型拒絶反応は抗ドナー抗体が血清中に出現し、本抗体が移植腎血管内皮組織で抗原抗体反応を発症することから進行するといわれている。一方で抗ドナー抗体が出現しているにもかかわらず、全く抗体関連型拒絶反応が発症しない場合もある。我々は(1)抗ドナー抗体陰性/拒絶反応(-)、(2)抗ドナー抗体陽性/拒絶反応(-)、(3)抗ドナー抗体陽性/拒絶反応(+)の3群間で、特異的な蛋白が出現していないか、質量分析器を用いて解析することとした。これまでも比較的高分子な物質に対して同手法を用い解析が行われてはいるが、明らかなマーカーとなりうる候補蛋白は同定できていない。本研究ではこれまでの手法では前処置にて処理されてしまっていた比較的低分子量のペプチドに注目し、低分子ペプチドを処理することなく解析、同定できる質量分析法(BLOTCHIP-MS法)を用いて、後方視的に候補蛋白の解析を施行することとした。

まず(1)~(3)群に該当し、かつ診断前後3か月以内に血清および移植腎生検組織の両方を採取している症例を、各群20例抽出した。血清サンプルは上記のごとく質量分析器により解析を施行し、3群間で発現状態が異なる、マーカー候補として有用性が高いと考えられるペプチドを同定した。

次にその血清サンプルを採取した日付の前後3か月以内、かつ拒絶反応に対する治療無介入状態の生検腎組織を用いて、免疫組織染色上ペプチドの発現の有無、発現部位の同定を施行した。同時に、この移植腎組織から抽出した蛋白を用いて、ウエスタンブロットを施行し、発現量の定量を行った。

4. 研究成果

抗ドナー抗体出現時と抗体関連型拒絶反応発現時に変動する2種類のペプチドを同定した。一方がKininogen1であり、もう一方がFibrinogenである。抗ドナー抗体陰性かつ拒絶反応(-)群にはこれら2ペプチドの発現は認めないものの、抗ドナー抗体出現かつ拒絶反応(-)時には両ペプチドともに発現が上昇、抗ドナー抗体陽性かつ抗体関連型拒絶反応発現時にはKininogen1は上昇せず、fibrinogenのみが上昇することが確認できた。つまり、血清を用いて抗体関連型拒絶反応の診断法が確立できる可能性が認められた。

次に我々はこの結果から、それぞれの腎生検サンプルに対し、2ペプチドの免疫組織染色およびWestern blotによる定量を試みた。各群では質量分析の結果と同様に、病理組織検査上も両ペプチドともに尿細管上皮細胞および尿細管間質に発現していた。その結果は質量分析の結果を補強する内容であったが、一方でその発現量には個体差があり、ウエスタンブロットの定量結果では3群間に有意差を認めなかった。層別解析を施行したところ、ドナー年齢、ドナー術前高血圧の有無、糖尿病の有無等の患者背景により発現量に影響を受けることが確認できた。

今回のサンプル中偶然同一個体が3群に含まれている症例があった。(つまり偶然経時的に各群の状態となり、サンプルが抽出されていた。)その結果、固体内ではその時点の病態により、2ペプチドの発現上昇及び低下が質量分析とウエスタンブロット間で相関していた。

したがって本試験を各病態の評価法として使用するためには、手術直後の採血による2ペ

チドの質量分析での定量を施行し、それを標準値としてその後の変動を測定することにより、診断法として使用しうる可能性が示唆された。引き続き検討が必要であるとおもわれる。

本研究はさらなる患者データを採取蓄積し検証していく必要があるものの、臓器移植分野において有望な結果を示した可能性が高い。移植後腎廃絶すると患者は再度末期腎不全に至る。末期腎不全は生命予後が著明に低下し、海外のデータによると腹膜透析および血液透析患者の5年生存率は約50%程度と、一部の悪性疾患よりも格段に予後不良である。また多方面から報告されているように、透析療法は腎移植療法よりも医療費が高額となる。腎移植後は10年生存率および生着率がそれぞれ90%、80%を超え、患者に対するメリットが非常に大きい医療であることは言うまでもない。抗体関連型拒絶反応を克服することはさらなる生存率および腎生着率の改善につながる。これらの医療を通じて末期腎不全、および透析状態を極力回避することは、患者に対する貢献のみならず、医療経済上も大きく貢献しうると考えている。

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〕

〔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
研究分担者	高原 史郎 (Takahara Shiro) (70179547)	大阪大学・医学系研究科・招へい教授 (14401)	
研究分担者	加藤 大悟 (Kato Taigo) (70648021)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	中澤 成晃 (Nakazawa Shigeaki) (80759530)	大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤) (14401)	
研究分担者	阿部 豊文 (Abe Toyofumi) (90750894)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	

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
---------	---------