

平成22年5月20日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790929

研究課題名(和文) 移植免疫寛容における miRNA の探索および RNAi 医薬を用いた免疫制御法の開発

研究課題名(英文) To search the novel miRNAs related with immune rejection and tolerance after mice liver transplantation

研究代表者

北沢 祐介 (KITAZAWA YUSUKE)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：00467581

研究成果の概要(和文)：

同種異系肝移植自然免疫寛容モデルを用い、移植後5、8、14、30、100日各ポイントにて、血液および肝臓、脾臓組織を採取し、病理組織学および免疫染色的検討を行った。また、肝移植後各ポイントの肝臓組織より miRNA を含む mRNA を抽出して、遺伝子発現プロファイルを解析した。急性拒絶反応期及び寛容期でそれぞれ有意に変化した候補遺伝子を多数見つけ、定量 RT-PCR とアレイでの両解析法による相関性が確認できた。現在、mRNA および miRNA 発現プロファイルの相関性およびその意義について検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：

To specifically monitor and predict the alloimmune response and tolerance, we studied transcriptional patterns in mouse hepatic allografts, a unique spontaneous tolerance model by mRNA and miRNA array, and simultaneously confirmed results by real time quantitative RT-PCR. Furthermore, we assessed histological changes of the allografts by HE staining. These results suggest that the expression profiles of the graft mRNA and miRNA may have the sensitivity and specificity to distinguish allograft rejection and tolerance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学臨床医学・外科学一般

キーワード：肝移植、免疫寛容、遺伝子、mRNA、miRNA

1. 研究開始当初の背景

1902年に行われたイヌの腎臓移植に始ま

る臓器移植は、1972年に発見された免疫抑制剤「サイクロスポリン」の応用を契機として、

臓器不全の究極的な治療法として今日確立されるに至っている。しかしながら、多くの臓器不全患者の需要に応えるだけの移植臓器の確保は難しく、移植を待たずに亡くなっていく患者が大きな問題となっている。また、移植後の長期に渡る免疫抑制剤の投与はレシピエントに副作用をもたらす、免疫抑制剤による非特異的な免疫抑制をもたらす感染症も問題となっている。

2. 研究の目的

免疫抑制（制御）は、非自己の組織をドナーとして用いる現在の移植医療において、必須の技術であり、移植医療の歴史は免疫抑制剤の歴史であるとも言える。特に現在でも用いられている免疫抑制剤であるサイクロスポリンは、移植を医療として確立させるに至ったと言っても過言ではない。しかし当初より免疫抑制剤は、標的以外の細胞へ非特異的に作用するため、その薬剤による副作用および過剰な免疫抑制による感染症が問題となっている。これを防ぐためには、より特異的に免疫を制御する薬剤の開発が急務である。従来の薬剤開発においては、機能（表現系）を元にスクリーニングが行われてきたため、たとえある表現系を抑える事が可能な薬剤をスクリーニングした場合でも、どの分子に作用して起きた結果なのかを解明するまでには多くの時間を要した。従って、高い特異性を持って狙い通りに標的とする分子に効果を発揮する薬剤を開発する事は容易ではなかった。一方、今までのスクリーニングとは逆の手法で、あらかじめ思い通りの分子を標的とする事で、特異性を高め、副作用を抑えた薬剤の代表が抗体医薬である。抗体医薬は既存の薬剤とは異なり、高い特異性を持つため非特異的な反応を極めて少なくする事が可能である。また、本来生物が元々持っている分子を使用するため、分子自体に生体に対する副作用は殆ど生じない。しかしながら、抗体医薬は細胞外に存在する分子しか標的とする事が出来ないため、標的とする分子は非常に限られたものとなる。また、抗体は培養した抗体産生細胞から調製するため、医薬品としての価格が高くなってしまいう問題点を内包している。

従って、この研究では、標的とする分子特異的に作用する新たな医薬品を開発するため、移植免疫寛容状態に関与する mRNA、micro(mi) RNA の探索に重点をおき、全く新しい機構による免疫制御方法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、2年間で動物移植モデルを用いて移植免疫寛容状態にあるレシピエントと、拒絶反応を起こしているレシピエントとに発現し、移植免疫寛容に関与する mRNA、miRNA の探索を行い、見いだされた mRNA、miRNA の標的分子の同定を試みた。

(1) 移植免疫寛容および移植免疫寛容破綻モデルの作製

① マウス同種異系（アロ）肝移植自然免疫寛容モデルの樹立には、C57BR/cd (BR) マウスの肝臓を DBA/2 (D2) マウスへ同所性に肝移植を行い、100日後に、寛容モデルとして供した。

② 上記自然正着寛容モデルに、免疫寛容の破綻を誘導する抗 PD-L1 (B7-H1) 抗体を用い、抗体を肝移植後投与し、レシピエントの生存（肝移植片の拒絶）を検討した。レシピエントの生存を観察すると共に、経時的に血液および肝臓の採取を行い、AST、ALT 等の生化学的検査および病理組織学的検討を行った。

(2) mRNA、miRNA マイクロアレイを用いた網羅的 mRNA、miRNA 発現解析

① アロ肝移植モデルから経時的に回収した臓器および末梢血より RNA を抽出し、蛍光物質で標識しプローブを作製した。作製したプローブを mRNA、miRNA マイクロアレイにハイブリし、肝臓および末梢血における mRNA、miRNA 発現プロファイルを検討した。

② mRNA、miRNA の発現プロファイルを検証するため、定量 RT-PCR による mRNA、miRNA 発現プロファイルの検証を行った。

③ miRNA の発現プロファイルを整理し、抗体投与によるマウスの生存変化、病理学的変化および生化学マーカーの変化との関連性について解析を行った。

4. 研究成果

H20 年度の研究では、我々がまず同種異系肝移植自然免疫寛容モデル樹立及び検討において B10. BR (H-2k) をドナー、B10. D2 (H-2d) をレシピエントとして、カフ法によるマウス同所性肝移植を行い、移植後 5、8、14、30、100 日各ポイント (n=3-5) にて、経時的に血液および肝臓、脾臓組織を採取し、病理組織学および免疫染色の検討を行った。移植後 5 日から肝臓門脈、中心静脈周辺に大量のリンパ球浸潤が見られ、8、14 日の時点でピークに達し、その後、徐々に浸潤リンパ球数が減少し、30 日の時点では、かなり少なくなったことが分かった。また、浸潤細胞が CD4 陽性、CD8 陽性細胞であることも確認できた。一方、リンパ球と思われる浸潤細胞のアポト

ーシスが増加した。移植肝臓内に何らかの機序によって、肝移植後の自然生着に関わっていることが示唆された。また、100 日以上の生存のマウスを寛容モデルとして供した。つぎ、マウス肝移植モデルを用いた免疫寛容誘導における B7-H1 の必要性の検討において：免疫補助シグナルである PD-1/PD-L1 経路は免疫反応において抑制的な調節をしていることが示唆されている。以上と同様の組み合わせでマウス同所性肝移植を行い、移植当日より抗 PD-L1 抗体を週 2 回腹腔内投与し、その生存日数を検討した。抗体非投与群ではすべて長期生存が得られたのに対し（100 日以上）、抗 PD-L1 抗体投与群では移植後 12 日以内にマウスがすべて死亡した。病理学的所見では重篤なリンパ球浸潤や出血が観察された。また抗 PD-L1 抗体投与例におけるアログラフトでは非投与例と比較して IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、iNOS、そして OPN が上昇していた。同種異系組み合わせにおける肝臓の生着においてグラフトへの浸潤細胞上の B7-H1 発現は重要な役割をもっていることを明らかにした。さらに、mRNA、miRNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子および miRNA 発現解析において：移植後各ポイントの肝臓組織よりトータル RNA を抽出して、アジレント 2100 バイオアナライザを用いての検定及び NanoDrop を用いての濃度測定を行い、mRNA および miRNA 発現プロファイル用の検討の準備ができた。

H21 年度の研究では、昨年度で樹立した同種異系肝移植自然免疫寛容モデルにて、mRNA、miRNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。アレイの解析においては、移植後 5、8、14、30、100 日各ポイント (n=3) にて、経時的に採取した肝臓組織より miRNA を含む mRNA を抽出して、アジレント社の Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイを用いて、遺伝子発現プロファイルを解析した。発現データの二次元クラスター解析を行い、同系肝移植マウスの遺伝子発現プロファイルと比較し、さらに肝臓病理組織学、免疫染色所見、血清中生化学指標およびサイトカイン測定の結果との関連について検討した。同種異系肝移植後肝臓組織遺伝子発現のパターンは主に移植後 5、8、14 日での急性拒絶反応期と移植後 30、100 日での自然寛容成立後、二つのクラスターにより構成されることがわかった。急性拒絶反応期では 100 数個の統計学的に有意 ($p < 0.05$) に変化した候補遺伝子を見つけ、既存の免疫活性に関わる遺伝子の高発現が認められた。一方、自然寛

容成立後では、200 以上の遺伝子発現変化が確認出来た。既存の免疫抑制または免疫調整遺伝子の高い発現が認められた。また、同じ組織由来のマイクロ RNA の解析においては、アジレント社の 8x15K mouse miRNA マイクロアレイにて、その発現パターンを解析したところ、50 数個の miRNA の発現が有意に ($p < 0.05$) 変化し、mRNA 発現パターンと同様に二つのクラスター形成ができ、同系肝移植と比較して拒絶期 (mir-15b, 34a, 451, 223) 或は寛容期 (mir-101, 101b) のみ高い発現が認められた遺伝子があった。その中からより有意な変化を示した 10 個の miRNA を選択し、定量 RT-PCR にて、その発現をアレイでの結果の相関性を確認できた。さらに、マウスの心移植後拒絶期及び寛容期のサンプルを用いて、その発現について検討したところ、約半分の miRNA の発現がほぼ同様な変化が示された。現在、mRNA および miRNA 発現プロファイルの相関性およびその意義について検討を進めている。

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 4 件)

1. Kitazawa Y, Li XK, Liu Z, Kimura H, Isaka Y, Hünig T, Takahara S. Prevention of graft-versus-host diseases by *in vivo* supCD28mAb-expanded antigen-specific nTreg cells. Cell Transplant. 査読有. 2010. in press.

2. Morita M, Fujino M, Jiang GP, Kitazawa Y, Xie L, Azuma M, Yagita H, Nagao S, Sugioka A, Kurosawa Y, Takahara S, Fung J, Qian S, Lu L, Li X-K. PD1/B7-H1 interaction contribute to the spontaneous acceptance of mouse liver allograft. Am J Transplant 査読有. 10(1):40-46; 2010.

3. Kitazawa Y, Fujino M, Li XK, Xie L, Ichimaru N, Okumi M, Nonomura N, Tsujimura A, Isaka Y, Kimura H, Hünig T, Takahara S. Superagonist CD28 antibody preferentially expanded Foxp3-expressing nTreg cells and prevented graft-versus-host diseases. Cell Transplant. 査読有. 18(5):627-37. 2009.

4. Kitazawa Y, Fujino M, Sakai T, Azuma M, Kimura H, Isaka Y, Takahara S, Hünig T, Abe

R, Li XK. Foxp3-expressing regulatory T cells expanded with CD28 superagonist antibody can prevent rat cardiac allograft rejection. J Heart Lung Transplant. 査読有. 27(4). 362-71. 2008.

[学会発表] (計4件)

①北沢祐介、Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation and prevent rat graft-versus-host disease but cloned MSCs are failed Category. 第36回日本臓器保存生物医学会定期学術集会. 2009年4月21日. 岡山

②北沢祐介、Superagonist CD28 antibody expand antigen-specific Foxp3-expressing nTreg cells to prevent graft-versus-host disease. 第38回日本免疫学会総会・学術集会. 2008年12月1-3日. 京都

③北沢祐介、Superagonist CD28 抗体で増殖された FoxP3 陽性 Treg 細胞の抗原特異性について. 第35回日本臓器保存生物医学会定期学術集会. 2008年11月22-23日. 東京

④北沢祐介、Superagonist CD28 antibody preferentially expanded functional Foxp3-expressing nTreg cells to prevents the graft-versus-host disease. 国際移植学会. 2008年8月10-14日. オーストラリア (シドニー)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北沢 祐介 (KITAZAWA YUSUKE)
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号：00467581

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：