

令和 5 年 4 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08942

研究課題名（和文）小腸移植拒絶反応の早期診断を目的としたドナー由来DNA断片の解析

研究課題名（英文）The utility of donor derived cell free DNA to diagnose acute rejection in intestinal transplantation

研究代表者

山田 洋平（Yamada, Yohei）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：60383816

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：小腸移植の長期グラフト生存率は不良である。成績不良の主因である拒絶反応の早期診断法として、採血でグラフト障害を判定する定量的バイオマーカーとしてドナー由来のcell free-DNA(以下cfDNA)を血中において測定し、臨床的拒絶反応の有無・程度との相関を観察する研究を行った。研究期間中に、5例の新規小腸移植とすでに小腸移植を受けられた方を含めて12例の対象患者さんに対して368サンプルを採取し、解析をおこなった。虚血再灌流障害の変化が鋭敏に捉えられ、急性期に発生した拒絶反応に相応してドナー由来cfDNAの上昇が確認され、ドナー由来cfDNAは有用なバイオマーカーとなることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非侵襲的な血液バイオマーカーであるドナー由来cell free DNAは、遺伝子の違いを逆手に取った移植臓器ならではの新しいバイオマーカーであり、本手法が確立することによって小腸移植のみならず、血液マーカーのない臓器移植（心臓・肺移植）においても現行のモニタリングに加えて新たな臨床情報をもたらすことが期待される。また、既存の血液マーカーが存在する臓器移植（肝臓・腎臓・膵臓）においても、拒絶反応診断においてddcfDNAは従来マーカーより鋭敏、かつ早期に検出することが期待され、主要臓器移植に共通する新たなバイオマーカー研究の発展につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The long term graft survival of intestinal transplant has been unsatisfactory due to an absence of sensitive biomarker to detect graft dysfunction. In this study, we assessed the diagnostic utility of donor derived cell free DNA to detect graft dysfunction secondary to various etiologies including acute cellular rejection. In the early after intestinal transplant, the large amount of ddcfDNA was detected in the recipient plasma which reflected the graft damage due to ischemic reperfusion injury. The rise in the level of ddcfDNA was observed in a patient with clinically diagnosed acute cellular rejection and the level was reversed to the baseline by the treatment for acute rejection. These findings indicate that ddcfDNA may serve as a sensitive biomarker to represent the graft integrity in intestinal transplantation.

研究分野：臓器移植

キーワード：小腸移植 ドナー由来cell free DNA 次世代シーケンサー 一塩基多型

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小腸移植は絶対的小腸長の欠損(短腸症候群)と機能的障害(腸管運動障害、吸収障害、免疫学的障害など)に分類される腸管不全の患者に対して行われる唯一の根治的治療である。我が国でも、2018年4月に小腸移植の医療技術が保険収載され、今後小腸移植の臨床件数は増加することが予測される。しかしながら小腸移植の成績は、移植後1年の短期成績こそ70-80%と改善しているものの、5年のグラフト生存の割合は未だに40-50%と低く、満足のいくものではない。(*比較として、肝臓移植の5年生存率は約70-80%、小児肝移植に限定すれば約80-90%。) 小腸移植の成績不良の主因は、他の臓器移植に比して、高頻度かつ進行が早い拒絶反応の存在が挙げられ、この拒絶反応をコントロールすることが重要である。拒絶反応コントロールのファーストステップはその早期診断であります。小腸グラフトの拒絶反応の診断には、内視鏡による肉眼的サーベイランスと組織学的評価がひつようであり、内視鏡による観察と組織の採取は粘膜のみに限られること、腎臓移植(血清Cr)や肝臓移植(血清AST/ALT)のように採血で判定可能な拒絶反応の定量的バイオマーカーが存在しないため、早期診断が時に困難であるのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の主目的は、小腸移植の成績改善において不可欠となる拒絶反応早期診断のための新しいバイオマーカーとしてドナー由来の cell free-DNA (以下 ddcfDNA) を血中において測定し、その値と臨床的拒絶反応の有無・程度の相関を観察することである。感度・特異度は臓器によって異なり、正常値との境界をどこに設けるかを決定する。小腸移植における世界的なデータは存在せず、ドナー由来の cfDNA 測定法も異なっております。従って、日本の小腸移植研究会参加施設が共同で本邦における全ての小腸移植患者のデータを蓄積し、臨床データと付き合わせ、ddcfDNA のグラフト障害診断の有用性について検証する。

3. 研究の方法

小腸移植を受けられた患者さんから以下の基準で採血 5ml を行った。採血は各施設で Veritas の cell-Free BCT チューブで採血し、そのサンプルを事務局である慶應大学に送付した。採血チューブは、事務局からあらかじめ共同研究機関に送付された。

(1) 検体処理方法

専用の採血チューブで採血し、遠心分離したのち、血漿をエッペンドルフチューブで高速遠心し血球成分を完全に除いた。その後、市販のキットを用い 1.8ml の血漿から 10-30ng の DNA を採取した。日本人データベースから日本人で多型性の高い SNP を 300 箇所選定したプラットフォームはすでに確立しているため、それらを用いてシーケンシングをおこなった。データ解析は quality control を行って、これらのデータからドナー由来 DNA 比率を推定した。得られた値と組織学的な拒絶反応の程度との相関や治療前後での変化を分析した。

(2) 拒絶反応の診断

小腸移植患者は、以下のプロトコールで内視鏡的粘膜生検を行った。

0-1 month: 2-3 times / week

1-3 month: 1-2 times / week

4-6 month: 1-2 times/ 2 weeks

小腸移植細胞性拒絶反応診断基準

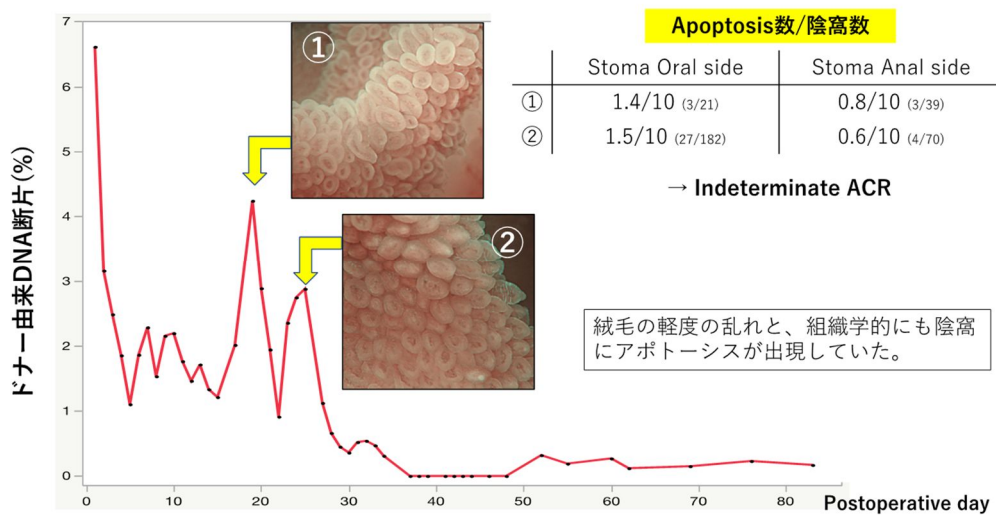
拒絶反応の程度	アポトーシスの数	混在する炎症の程度
0 (no ACR)	<2/10	なし
IND for ACR	<6/10	Focal minimal
1 (mild ACR)	>6/10	Mild to focal moderate
2 (moderate ACR)	アポトーシスの集簇、クリプトの脱落	Moderate to severe
3 (severe ACR)	アポトーシスの集簇、広範囲クリプトの脱落	Moderate to severe

4. 研究成果

研究期間内に 12 名の登録があり、368 のサンプルを採取した。新規移植症例は 5 例であった。(慶應義塾大学・国立生育医療研究センター・九州大学から検体が提供された)

急性拒絶反応を認めた 1 例の臨床経過と ddcfDNA の推移を示す。移植後の適時サンプリングの過程で、ddcfDNA の上昇が見られた。この上昇と一致して、内視鏡所見における絨毛所見の変化とクリプトにアポトーシスが出現したことより、ddcfDNA が小腸移植における拒絶反応の診断に有用であることが示唆された。

非侵襲的な血液バイオマーカーであるドナー由来 cell free DNA は、遺伝子の違いを逆手に取った移植臓器ならではの新しいバイオマーカーであり、本手法が確立することによって小腸移植のみならず、血液マーカーのない臓器移植(心臓・肺移植)においても現行のモニタリングに加えて新たな臨床情報をもたらすことが期待される。また、既存の血液マーカーが存在する臓器移植(肝臓・腎臓・膵臓)においても、拒絶反応診断において ddcfDNA は従来マーカーより鋭敏、かつ早期に検出することが期待され、主要臓器移植に共通する新たなバイオマーカー研究の発展につながることを期待される。



< 拒絶反応を認めた個体における ddcfDNA の推移 >

臨床的に拒絶反応を認めた時の内視鏡所見と組織学的所見

の所見後に拒絶反応治療を行なって、その後再び ddcfDNA が上昇した時の所見とも絨毛の極性に乱れがあり、組織学的にも陰窩にアポトーシスを認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 梅山 知成(慶応義塾大学 医学部外科学教室(小児)), 山田 洋平, 城崎 浩司, 山岸 徳子, 工藤 裕実, 金森 洋樹, 高橋 信博, 加藤 源俊, 黒田 達夫	4. 巻 54
2. 論文標題 【短腸症候群の診療における問題点】中心静脈アクセスの消失した短腸症候群に対して行った脳死小腸移植術(原著論文)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 小児外科	6. 最初と最後の頁 280-284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 山田洋平	4. 巻 54
2. 論文標題 【短腸症候群の診療における問題点】短腸症候群と小腸移植(解説)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 小児外科	6. 最初と最後の頁 318-321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 金森洋樹, 山田洋平, 黒田達夫, Nguyen, Phuong Thanh, 光永滋樹, 井ノ上逸朗	4. 巻 54
2. 論文標題 移植領域におけるliquid biopsy(ドナー由来遊離 DNA 断片測定)の可能性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 小児外科	6. 最初と最後の頁 1028-1031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金森洋樹, 山田洋平, 長谷川康, 篠田昌宏, 井ノ上逸朗, 尾原秀明, 北川雄光, 黒田達夫
2. 発表標題 肝移植と小腸移植におけるドナー由来cell free DNA解析の試みと展望
3. 学会等名 第57回日本移植学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田洋平, 梅山知成, 工藤裕実, 金森洋樹, 高橋信博, 加藤源俊, 黒田達夫
2. 発表標題 小児移植の問題点と今後の展開
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田洋平
2. 発表標題 腸管不全治療のoptimization- 小腸移植の適応について -
3. 学会等名 第33回日本腸管リハビリテーション・小腸移植研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金森洋樹, 山田洋平, 長谷川康, 篠田昌宏, 井ノ上逸朗, 尾原秀明, 黒田達夫
2. 発表標題 小腸移植におけるドナー由来遊離DNA断片 (donor derived cell free DNA:ddcfDNA)の測定
3. 学会等名 第34回腸管リハビリテーション・小腸移植研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城崎 浩司(慶応義塾大学 医学部外科学(小児)), 山田 洋平, 前田 悠太郎, 山岸 徳子, 工藤 裕実, 金森 洋樹, 高橋 信博, 加藤 源俊, 長谷川 康, 松原 健太郎, 岡林 剛史, 尾原 秀明, 黒田 達夫
2. 発表標題 脳死小腸移植後の高EBV血症に対してリツキシマブでの治療を行った一例
3. 学会等名 第58回日本移植学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 工藤 裕実(慶応義塾大学 医学部外科学), 筋野 智久, 山田 洋平, 東條 杏奈, 金森 洋樹, 高橋 信博, 加藤 源俊, 長谷川 康, 松原 健太郎, 岡林 剛史, 高林 馨, 細江 直樹, 尾原 秀明, 黒田 達夫
2. 発表標題 小腸移植後の腸管免疫再構築の検討
3. 学会等名 第58回日本移植学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 工藤 裕実(慶応義塾大学 医学部外科学教室(小児)), 山田 洋平, 高橋 信博, 黒田 達夫
2. 発表標題 3 小児腸内細菌叢の基礎と臨床 小腸移植の急性拒絶反応における腸管免疫および腸内細菌叢の変化の検討
3. 学会等名 第49回日本小児栄養消化器肝臓学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田 洋平(慶応義塾大学 医学部外科学(小児)), 山岸 徳子, 城崎 浩司, 梅山 知成, 工藤 裕実, 金森 洋樹, 高橋 信博, 加藤 源俊, 長谷川 康, 松原 健太郎, 岡林 剛史, 尾原 秀明, 北川 雄光, 黒田 達夫
2. 発表標題 臓器移植医療の実際 小腸移植を軸とした腸管機能リハビリテーションセンターの構築
3. 学会等名 第47回外科連合会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金森 洋樹(慶応義塾大学 外科学教室(小児)), 山田 洋平, 梅山 知成, 高橋 信博, 加藤 源俊, 長谷川 康, 尾原 秀明, 篠田 昌宏, 入江 理恵, 辻川 華子, 大喜多 肇, 西郷 健一, 光永 滋樹, 井ノ上 逸朗, 黒田 達夫
2. 発表標題 肝移植と小腸移植におけるドナー由来cell free DNA解析の試みと展望
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 工藤 裕実(慶応義塾大学医学部附属病院 外科学教室(小児)), 筋野 智久, 山田 洋平, 城崎 浩司, 山岸 徳子, 東篠 杏奈, 梅山 知成, 金森 洋樹, 高橋 信博, 加藤 源俊, 高林 馨, 細江 直樹, 安藤 吉成, ジョナサン・ムディ, チャン・チョ・ホン, ジェイシン, 緒方 晴彦, 黒田 達夫
2. 発表標題 小腸移植の急性拒絶反応における腸管免疫再構築のダイナミズム
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>腸管機能リハビリセンター https://kompas.hosp.keio.ac.jp/contents/medical_info/presentation/202203.html 慶應義塾大学小児外科 研究紹介 http://www.ped-surg.med.keio.ac.jp/basicresearch.html#umap</p>
--

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	井ノ上 逸朗 (Inoue Itsuro) (00192500)	国立遺伝学研究所・ゲノム・進化研究系・教授 (63801)	
研究分担者	阪本 靖介 (Sakamoto Seisuke) (00378689)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・臓器移植センター・医長 (82612)	
研究分担者	日比 泰造 (Hibi Taizo) (10338072)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	上野 豪久 (Ueno Takehisa) (10456957)	大阪大学・医学部附属病院・特任准教授（常勤） (14401)	
研究分担者	松浦 俊治 (Matsuura Toshiharu) (10532856)	九州大学・大学病院・准教授 (17102)	
研究分担者	岡島 英明 (Okajima Hideaki) (20308604)	京都大学・医学研究科・客員研究員 (14301)	
研究分担者	和田 基 (Wada Motoshi) (80372291)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	

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