

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861269

研究課題名(和文)腎移植拒絶反応における血中ケモカインの動態解析と新規バイオマーカーへの応用

研究課題名(英文)The dynamic analysis of serum chemokines in the T-cell mediated rejection after renal transplantation and their application to new biomarker

研究代表者

山中 和明(Kazuaki, Yamanaka)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10648017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：臓器移植において、細胞性拒絶反応(TCMR)を非侵襲的に早期診断を行うことは重要である。我々はケモカインに注目し、ラット腎移植TCMRモデルを作成し、その移植腎でCCL2、CCL3、CCL5、CXCL9、CXCL10のmRNAがより早期から有意に上昇することを確認した。ヒト移植患者の移植腎生検で、TCMRと診断された患者では、非TCMR患者と比較し、flow cytometryで測定した血清CXCL9、CXCL10、CCL5が有意に上昇しており、ROC曲線からTCMRの診断予測には、血清CXCL10が最も適していた。血清CXCL10はTCMRの有効な診断ツールとなりうることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：In the organ transplantation, it is important that I make an early diagnosis of T-cell mediated rejection (TCMR) non-invasively. We paid attention to chemokines. We made rat allograft model of renal transplantation and quantitative real-time PCR revealed that the expression of CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9 and CXCL10 significantly was increased in the rat allograft from an early stage. In the human TCMR cases diagnosed by the graft biopsy, quantitative flow cytometry results showed that serum CXCL9, CXCL10 and CCL5 significantly elevated in comparison with the non-TCMR, and serum CXCL10 was suitable for a diagnosis prediction of TCMR by ROC curve. These results demonstrate that serum CXCL10 concentration may be a highly accurate biomarker for predicting TCMR.

研究分野：腎移植

キーワード：腎移植 急性細胞性拒絶反応 バイオマーカー ケモカイン

## 1. 研究開始当初の背景

免疫抑制剤が進歩した現在においても、移植腎機能廃絶の最大の原因は、拒絶反応であり、その内訳は、慢性拒絶反応(25.4%)、急性拒絶反応(7.9%)となっている(日本移植学会臓器移植ファクトブック 2011)。急性拒絶反応(AR)の特徴は、治療が遅れた場合、急速に腎機能障害が進行し不可逆的な障害につながる。慢性拒絶反応(CR)は、ARに比べ進行は緩やかであるが長期経過後の発症が多く、免疫抑制剤による腎障害・原疾患の再発・代謝性変化などが加わるため、移植腎病理からの診断が困難となる。また、移植腎生検による病理組織学的検査は侵襲的であり、出血や動静脈瘤などの合併症の危険性があること、組織採取の際の sampling error が生じること、組織採取から標本作成・診断までに時間を要すること、移植腎病理に精通した病理医が少ないことなど、多くの問題点を抱えている。これらの問題を解決するために、新たなアプローチで即座に結果が得られる簡便な検査法が求められている。

ケモカインは、リンパ球の体内移動と組織内局在を制御するサイトカインの一群であり、拒絶反応の際に尿細管上皮やリンパ球から分泌され、活性化したリンパ球を移植腎へと誘導し障害を引き起こす。またケモカインは、拒絶反応を生じた組織内への、リンパ球の誘導におけるあらゆる段階を調節するといわれている。腎移植における新規バイオマーカーとしてのケモカイン測定に関して、尿をサンプルとして用いた網羅的な検索により、拒絶反応を含む腎障害時に尿中のサイトカイン/ケモカインが上昇することが報告されている。しかし、尿中ケモカインは前立腺肥大症や慢性骨盤疼痛症候群などの影響を受けると、また尿の使用は腎移植以外の移植領域へ汎用性を欠くなどの欠点があり、血中ケモカインの検討が望ましいと考える。過去に血中ケモカインと拒絶反応や移植腎障害と

の関係についての報告が散見されるが、その測定方法などから正確性に欠け、臨床応用まで至っていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

これまでに、ARもしくはCR時の血中ケモカインの経時的変動を網羅的に検討した研究はない。免疫応答初期よりリンパ球の誘導に重要な役割を果たすケモカインを定量することで、移植腎の病態予測が可能となる。我々が蓄積保存してきた腎移植後患者の血清および移植腎生検の検体やラット細胞性拒絶反応(TCMR)モデルの検体を用いて、移植腎機能が悪化した際の血清中ケモカインを、フローサイトメトリー(FCM)を用いた多項目蛋白同時解析にて定量化し、移植腎生検の病理組織学的診断との相関関係を検討することで拒絶反応に関与する可能性があるケモカインを特定する。FCMを用いた多項目蛋白同時解析は数種類のケモカインを同時に定量・解析することができ、cut off 値の設定および数種類のケモカインの組み合わせによる臓器障害の診断能の向上が期待できる。ケモカインはリンパ球の誘導に関わるため、拒絶反応時にはケモカインの分泌が増加すると予想され、その変化を検討することで、拒絶反応の有無の鑑別および治療効果判定に有用な新規バイオマーカーになると考えられる。しかも、採血により検査が可能のため、低侵襲で簡便である。また血中ケモカインと移植腎障害との相関が明らかとなれば、腎移植以外の他臓器移植領域においても拒絶反応を診断するバイオマーカーとなりうる可能性を十分に持っている。特に隣移植などの組織採取困難な他臓器移植領域では、従来、拒絶反応の診断に難渋していたが、今後強力な診断ツールとなりうることを期待できる。

## 3. 研究の方法

DA ラットと LEWIS ラットを用いて、ラット腎移植 TCMR モデルの作成し、移植後 1 日目、3 日目、5 日目に移植腎を採取した。その比較として、同種移植モデルも作成した。移植腎の定量化 real-time PCR を行い、より早期から変化するケモカインを特定した。また、当院で腎移植手術が施行された患者のうち、移植腎生検が行われ、かつ生検前の血清が保存されている患者を抽出し、後ろ向き研究として行う。エピソード移植腎生検においては移植腎生検の 14 日以内に血清保存されたもの、プロトコール移植腎生検では移植腎生検決定時に血清保存がされているものを対象とした。

#### 4. 研究成果

ラット腎移植 TCMR モデルの移植腎とその同種移植モデルの移植腎を 1 日目、3 日目、5 日目に採取し、それぞれを急性細胞性拒絶反応の主体となるリンパ球に関するケモカイン 10 種類 (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCR2, CCR5, CXCR3, CXCL9, CXCL10, CXCL11) について、定量化 real-time PCR にて比較した (図 1)。

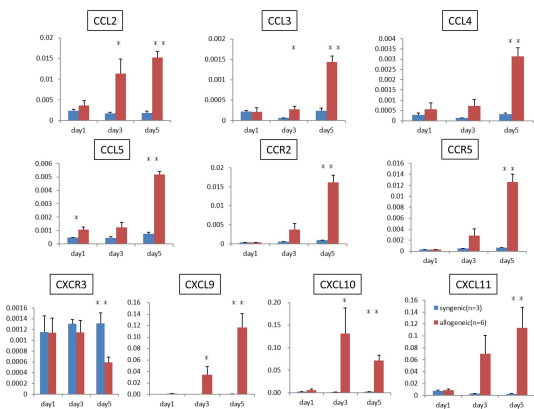


図 1: ラット移植腎におけるケモカイン mRNA の発現

移植後 5 日目になると CXCR3 以外のケモカインは有意な上昇を示したが、CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9, CXCL10 は移植後 3 日目以前から有意な上昇を示した。さらに移植腎生検にて、TCMR と診断された患者 19 例と、拒絶反応の

所見を認めなかった患者 69 例を対象とし、ケモカインの発現について検討した。両群の患者背景に有意な差は認めなかった (図 2)

		non TCMR n=69	TCMR n=19	p-value
<b>レシピエント</b>				
性別	女性/男性	29 / 40	8 / 11	0.99
年齢	中央値	44 (36 - 57.5)	42 (35 - 57)	0.9
<b>ドナー</b>				
生体 (%)		88.4	89.5	0.89
性別	女性/男性	48 / 20	10 / 8	0.23
年齢 (歳)	中央値	57 (47.5 - 61.5)	58 (46 - 63)	0.8
透析期間 (月)	中央値	23 (6 - 72)	23 (5 - 85)	0.92
移植後期間 (月)	中央値	16 (9.5 - 76.5)	11 (3 - 48)	0.17
ABO 不適合 (%)		21.7	15.8	0.57
HLA ミスマッチ	平均±標準偏差	2.5±1.6	3.1±1.29	0.06
血清Cr値 (mg/dl)	中央値	1.46(1.05-1.82)	1.60 (1.27-2.05)	0.07

図 2: 患者背景

FCM を利用する Cytometric Bead Array (CBA) を用いて、Chemokine (CCL2, CXCL9, CXCL10, CCL5) を測定し、移植腎病理組織診断と血清中の Chemokine 濃度を比較すると、CXCL9, CXCL10, CCL5 は TCMR 患者において有意な上昇を示した (図 3)。

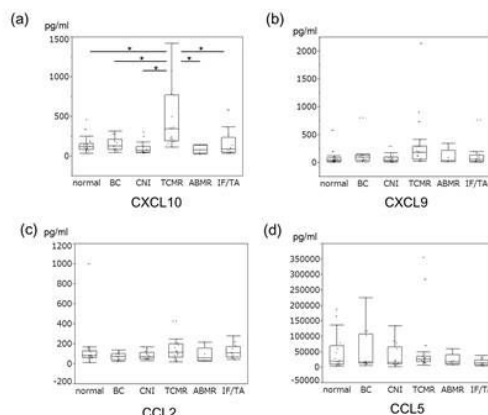
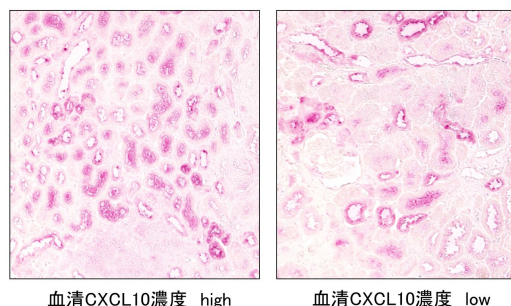


図 3: 病理組織結果と血清ケモカイン濃度  
免疫組織学染色において、血清ケモカイン濃度が高値を示すものは、移植腎の近位尿細管において、より強く発現していた (図 4)。

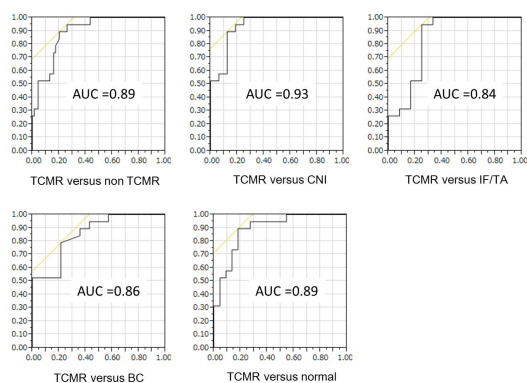


血清CXCL10濃度 high

血清CXCL10濃度 low

#### 図 4：移植腎における CXCL10 の発現

次にケモカインによる TCMR の予測能を ROC 曲線で検定すると、TCMR の予測には CXCL10 が最も適することがわかった（図 5）。



#### 図 5：ケモカインによる TCMR の予測能

また、2 度移植腎生検を施行された患者の血清 CXCL10 を比較するとボーダーラインチェンジの診断時に 96.03 mg/dl から TCMR の診断時には 1422.47 mg/dl へ上昇し、また TCMR の診断時に 344.4 mg/dl であった症例が治療後に 149.9 mg/dl に低下しており、病勢や治療効果判定に使用できる可能性が示された。以上の結果から、血清 CXCL10 濃度は TCMR の診断において良好な予測能を示し、有用なバイオマーカーになると考えられた。

#### 6．研究組織

(1)研究代表者 山中和明(YAMANAKA KAZUAKI)

大阪大学医学部附属病院・医員

研究者番号：10648017

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：