

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10026

研究課題名(和文) Foxp3遺伝子多型と細胞内シグナル解析による臓器移植の制御性T細胞応答の解明

研究課題名(英文) Analysis of association between allo-immune response and FOXP3 polymorphism in organ transplantation

研究代表者

田中 友加 (TANAKA, Yuka)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・准教授

研究者番号：90432666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞は拒絶時の抗ドナー免疫応答の抑制に寄与する細胞で、FOXP3はその機能的マスター遺伝子でありpolymorphismが存在する。本研究では、Foxp3遺伝子多型の同種異系(アロ)T細胞応答への影響について解析を行った。成果として、Foxp3遺伝子多型は、肝臓移植における、急性拒絶反応発症に伴うステロイド治療への感受性との相関を認め、臓器移植における個別化医療を行う上での有用なゲノム情報となり得る可能性を得た。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells expressing the transcription factor Foxp3 are essential for immune homeostasis. This study investigated the impact of FOXP3 SNPs on the severity of ACR in liver transplant (LT) recipients. We did not find any statistical association between the FOXP3 SNPs genotype frequencies and the incidence of ACR. However, significantly higher incidence of SRAR was observed in LT patients with the FOXP3 rs3761548 A/C+A/A genotype than in those with C/C genotype. The total dose of intravenous methylprednisolone used for ACR treatment was significantly higher in the rs3761548 A/C+A/A genotype than that in the C/C genotype. This fact suggests that the immunosuppression regime and/or anti-ACR treatment regimen should be adjusted on an individual basis by identifying FOXP3 SNPs, implying a need for personalized medicine in the field.

研究分野：移植免疫、腫瘍免疫

キーワード：制御性T細胞 拒絶反応 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

マウスの研究により、転写因子 Forkhead box p3 (Foxp3)が制御性 T (regulatory T: Treg) 発生・機能のマスター制御因子であることが解明され、続いてヒトにおいても CD4⁺CD25^{high}T 細胞群に Foxp3 が特異的に発現し、分化や機能を司っていることが明らかとなった。最近、Foxp3 遺伝子の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism ; SNP) が同定され、自己免疫疾患の重症度やステロイド治療反応性に差を認めることが報告された。臓器移植におけるアロ応答にも、Treg 細胞が重要な役割を担う事が知られているが、寛容誘導や拒絶応答の個体差に Foxp3 遺伝子の SNP が関連するか否かは解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、臓器移植における Foxp3 SNP を解析し、T 細胞の抗アロおよびウイルス応答を経時分析し関連性を解明し、移植後の個別化免疫制御法を行う上で、Foxp3 SNP が重要なゲノム情報となり得るか否かを明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

①Foxp3 SNP と臓器移植術後早期における拒絶反応との関連： 肝移植患者の末梢血単核球を用いて FOXP3 SNPs -3499 A/G (rs3761547), -3279 A/C (rs3761548) and -924 A/G (rs2232365)のジェノタイプングを PCR-RFLP 法で解析した。ACR 発症程度 (移植後 6 週間以内の臨床診断において、拒絶なし、ステロイド感受性拒絶反応 (SSAR)、ステロイド抵抗性拒絶反応 (SRAR) に分類) および治療について解析した。

②Foxp3 SNP と末梢血 Treg 細胞存在率の関連評価： 健康人ボランティア末梢血および肝移植患者末梢血における Treg 細胞の存在比率をフローサイトメトリー法で解析し、FOXP3 遺伝子多型との関連について評価した。

③Foxp3 SNP と T 細胞アロ応答性との関連解析： 肝臓移植後の抗ドナー T 細胞アロ応答性について CFSE 色素染色法とフローサイトメトリー解析によるリンパ球混合試験を用いて経時的に観察し、Foxp3 SNP との関連性を解析した。

4. 研究成果

①Foxp3 SNP と臓器移植術後早期における拒絶反応との関連： 肝臓移植後 6 週間以内において、全 102 症例中 16 症例 (15.69%) に ACR の発症を認めた。ACR 発症 16 例における SRAR は 5 例で 31.25%であり、これまでの報告と同等の割合であった。また、SRAR 対し、OKT3 (1 例) や rATG (3 例) の追加治療を実施した。ACR のうち 6 例に対しステロイドパルス後における病態把握のための肝生検を行った。ステロイド反応性で臨床的に SSAR と診

断した 3 例は、組織学的に拒絶所見を認めなかった。一方で、ステロイドパルス後肝機能改善率が 50%未満で臨床的に SRAR と診断した 3 例は、ステロイドパルス後も mild/moderate の ACR の組織学的所見が残存していた。

今回の解析において、いずれの FOXP3 SNP とも ACR 発症率との関連性を見いだせなかった。しかしながら、FOXP3 rs3761548 において A/C+A/A genotype は、C/C genotype に比べ有意に SRAR の発症率が高いことがわかった (A/C+A/A vs. C/C; no rejection, SSAR, SRAR, 85.71%, 0%, 14.29% vs. 83.58%, 16.42%, 0%, respectively, P = 0.0005) (図 1)。

ACR の治療に要したステロイド総量は rs3761548 A/C+A/A genotype で 2037.5 ± 887.5mg で C/C genotype C/C genotype の 906.3 ± 377.4mg に比べ有意に多いことがわかった (P=0.005)。

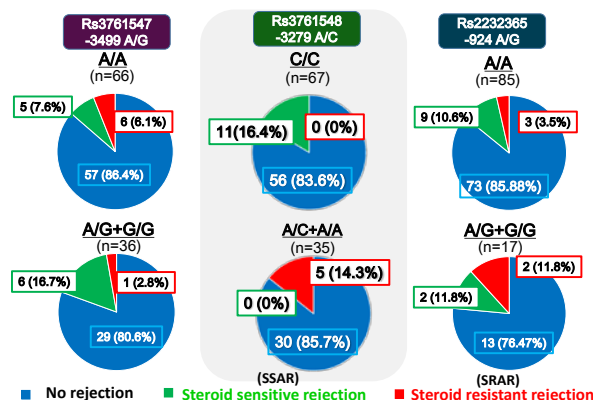


図 1. FOXP3-SNP と ACR 発症率および SSAR/SRAR の分布

②Foxp3 SNP と末梢血 Treg 細胞存在率の関連評価： FOXP3 SNP-3279 A/C (rs3761548) 別での健康人および肝移植患者での末梢血中の Treg 細胞存在比率について、CD3⁺CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺細胞をフローサイトメトリーで解析したが、C/C homozygote と A carrier との間に差はなく、今回の検討では Foxp3 SNP との関連性は見いだせなかった (図 2)。

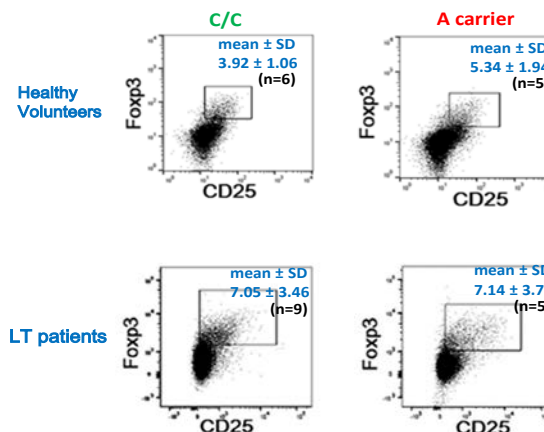


図 2. FOXP3 SNP Rs3761548 別での末梢血の Treg 細胞存在比率解析

③Foxp3 SNP と T 細胞アロ応答性との関連解析: FOXP3-SNP と同種異系免疫応答との関連を確認するため、CFSE 蛍光色素染色とフローサイトメトリーを用いたリンパ球混合試験によって抗ドナー応答性を経時的に評価した。ACR を発症していない症例では、CD4⁺および CD8⁺T 細胞の抗ドナー Stimulation Index (SI) は、rs3761548 A/C+A/A genotype が C/C genotype に比べ高い傾向を示したが、有意差には至らなかった(図 3)。そこで ACR 症例において発症時における抗ドナー SI を解析すると、rs3761548 A/C+A/A genotype の抗ドナー CD4⁺T 細胞の SI が C/C genotype に比べ有意に高いことを確認した。この有意差は抗サードパーティ SI では認めなかった。すなわち、肝臓移植後の ACR において rs3761548 A/C+A/A genotype の抗ドナー CD4⁺T 細胞応答は C/C genotype に対し高いことが確認された(図 4)。

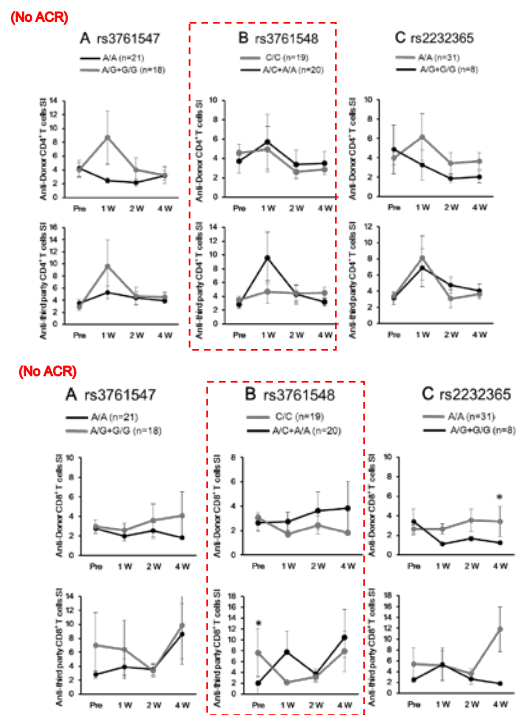


図 3. 非拒絶症例における移植前後での T 細胞アロ応答の経時解析 (上段: CD4⁺T 細胞、下段: CD8⁺T 細胞)。

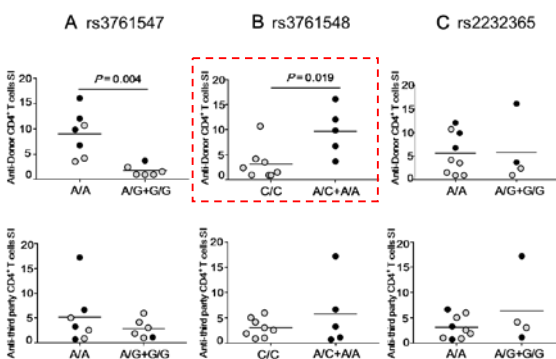


図 4. 拒絶発症時における CD4⁺T 細胞アロ応

答 Stimulation Index 解析

以上の成果は、肝臓移植における FOXP3 遺伝子の rs3761548 SNP が術後 SRAR 発症と有意な相関があることが示唆され、移植領域における免疫抑制および拒絶治療法の選択において FOXP3 SNP に基づく個別化療法を行ううえで有益な情報となり得る可能性が得られた。

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 1 件)

1. Verma S, Tanaka Y, Shimizu S, Tanimine N, Ohdan H. Significant association between FOXP3 gene polymorphism and steroid-resistant acute rejection in living donor liver transplantation. *Hepatol Commun*. 査読有.(1):406-420. 2017.

[学会発表] (計 12 件)

1. 田中友加, 井手健太郎, 大段秀樹. FOXP3 遺伝子多型に基づく急性細胞性拒絶反応診断と治療戦略. 第 44 回日本臓器保存生物医学会学術集会. 2017.

2. 田中友加, 尾上隆司, 井手健太郎, 田原裕之, 大平真裕, 石山宏平, 小林剛, 大段秀樹. 肝臓移植における抗ドナー低応答性獲得のメカニズムと遺伝学的関連因子. 第 53 回日本移植学会総会. 2017.

3. 田中友加, Verma Sapana, 清水誠一, 田原裕之, 大平真裕, 黒田慎太郎, 井手健太郎, 小林剛, 大段秀樹. FOXP3 遺伝子多型に基づくステロイド抵抗性拒絶反応の早期診断と治療選択. 第 53 回日本移植学会総会. 2017.

4. 田中友加, Verma Sapana, 清水誠一, 田原裕之, 大平真裕, 黒田慎太郎, 井手健太郎, 石山宏平, 小林剛, 大段秀樹. ステロイド抵抗性拒絶反応早期診断における FOXP3=SNP の意義. 第 35 回日本肝移植研究会. 2017.

5. Tanaka Y, Verma S, Ohdan H. FOXP3 rs3761548 A/C+A/A genotype is a risk factor for steroid resistant rejection after liver transplantation. *American Transplant Congress 2017*. 2017.

6. Tanaka Y, Verma S, Ohdan H. The significant association between FOXP3 gene polymorphism and severity of acute cellular rejection in liver transplantation. *Asian Transplantation Week 2016*. 2016.

7. Tanaka Y, Ohdan H. Impact of immunosuppressants on inducing regulatory T cells in human allo-immune responses. *American Transplant Congress 2016*. 2016.

8. 田中友加, 石山宏平, 田原裕之, 大平真裕, 清水誠一, 井手健太郎, 小林剛, 大段秀

樹. 細胞生物学とゲノム解析による T 細胞応答の個別モニタリングの実践. 第 52 回日本移植学会総会. 2016.

9. 田中友加, Verma Sapana, 大段秀樹. Foxp3 遺伝子多型が肝移植後アロ免疫応答に与える影響. 第 3 4 回日本肝移植研究会. 2016.

10. 田中友加, Verma Sapana, 清水誠一, 谷峰直樹, Das Lalit Kumar, 田原裕之, 大平真裕, 井手健太郎, 石山宏平, 小林剛, 田代裕尊, 大段秀樹. Foxp3 遺伝子多型から見た HBV 性肝硬変レシピエントの免疫学的特性. 第 5 1 回日本移植学会総会. 2015.

11. Verma S, Tanaka Y, Shimizu S, Das LK, Ohdan H. The significant association between the functional polymorphism (Rs3761548) of Foxp3 gene and the severity of acute cellular rejection in liver transplantation. American Transplant Congress 2015. 2015.

12. Tanaka Y, Verma S, Ohdan H. Significant association between Foxp3 gene polymorphism and outcome in HBV-related liver transplant patients. American Transplant Congress 2015. 2015.

〔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

田中 友加 (TANAKA, Yuka)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・准教授

研究者番号 : 9 0 4 3 2 6 6 6

(2) 研究分担者

大段 秀樹 (OHDAN, Hideki)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・教授
研究者番号 : 1 0 3 6 3 0 6 1

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()