

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20088

研究課題名(和文)末梢血リンパ球の遺伝子プロファイルによる腎移植後免疫モニタリングの試み

研究課題名(英文)Gene profiling of lymphocyte during acute rejection after kidney transplantation

研究代表者

角田 洋一 (KAKUTA, YOICHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40710116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：腎移植レシピエントのリンパ球プロファイルとして、リンパ球におけるCEACAM6、CEACAM8、CCR3の発現をスコア化した。Validationを検討した結果、感度、特異度ともに満足のいく結果ではなかった。原因としては症例数が少ないことと、免疫抑制剤の効果の個体差が考えられた。ラット急性拒絶反応モデルの確立には成功したが、ヒトと遺伝子発現のプロファイルは異なっていた。

研究成果の概要(英文)：We selected three genes from DNA array, CEACAM6, CEACAM8, and CCR3, to profile the immunosuppressive state after kidney transplantation, and established the original scoring. When we validated this scoring in the other kidney transplant recipient group, both sensitivity and specificity was low. This is because few recipient suffered acute rejection, and variation of effects of immunosuppressive drug. We established rat model of acute T cell mediated rejection. Gene profiling was different between rat and human.

研究分野：泌尿器科

キーワード：腎移植

## 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)。免疫抑制剤の投与量を増やし免疫抑制を強化すれば拒絶反応の発症を防ぐことは可能であるが、投与量を増やすと腎毒性や糖尿病、高血圧、高脂血症といった有害事象が発生し、慢性移植腎症という病態につながり長期生着率を低下させてしまう。そのため適度な免疫抑制剤の投与量を維持することが重要であり、現在は血中濃度と移植腎生検の病理所見から投与量を調節している。しかし、同じ血中濃度であっても拒絶反応の発生率や有害事象の発生率は個体によって様々であり、その個人にあった至適投与量を見出す方法は現在のところない。近年 mTOR 阻害薬など新規免疫抑制剤が登場し、多剤併用免疫抑制療法が中心となったため、さらに血中濃度だけでのコントロールが困難となっている。移植腎生検を施行すれば、免疫抑制剤の効果を推測することは可能であるが、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り頻回に測定することはリスクが高く(Transplantation. 2003; 76: 969)、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。そのため長期生着率の改善のためには、新たなアプローチで即座に結果が得られ、繰り返し測定可能なバイオマーカーを用いた免疫モニタリング法が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究では免疫抑制剤が作用する末梢血リンパ球の遺伝子プロファイルを行い、in vitro での免疫抑制の程度との関連、また臨床的予後との関連を解析することによって、新規バイオマーカーの開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### 遺伝子プロファイルの候補遺伝子の特定

DNA array を行いプロファイルとして使用可能な遺伝子を選別する。方法としては、これまでに蓄積保存してきた腎移植後患者の末梢血リンパ球から抽出した cDNA を用いて経時的な発現量の変化を評価し、in vitro 拒絶反応モデルを用いて免疫抑制の程度と発現量(タンパク濃度)を評価することによって、候補となる遺伝子を特定する。

### 遺伝子プロファイルと臨床的予後との関連についての検討

作成した末梢血リンパ球遺伝子プロファイルが臨床的に有用であるかを腎移植患者で前向きに検討する。臨床的予後は免疫抑制不十分の指標として拒絶反応の発生率を用い、過剰免疫抑制の指標として腎毒性の発生率、感染症の発生率、移植後糖尿病の発生率を用いて評価する。診断には腎移植後3カ月後、12カ月後にプロトコール移植腎生検を施行し、臨床経過から拒絶反応が疑われる場合にはそのつど移植腎生検を施行する。

### ラット腎移植モデルを用いた各遺伝子のメカニズム解明

我々のグループでは腎移植関連のラットモデルとして、急性拒絶反応モデル、慢性拒絶反応モデルを確立している。このモデルにおいて遺伝子プロファイルに用いた遺伝子の発現および機能を評価しプロファイルの有用性を再評価する。さらに実臨床で

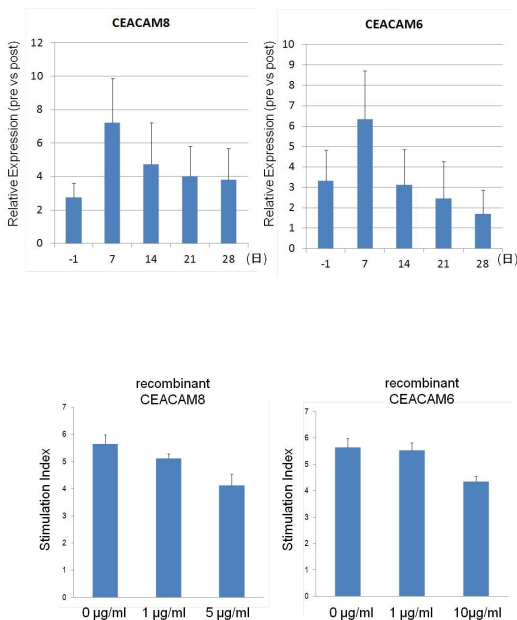
は確認しづらい、拒絶反応発症時の血中もしくは組織内での遺伝子の継時的変化を検討することで、拒絶反応時の予測因子となりうるかを検討する。

#### 4. 研究成果

腎移植レシピエントのリンパ球から採取した遺伝子発現の変化を DNA array で網羅的に解析したところ 31 遺伝子の発現上昇と 21 遺伝子の発現低下を確認した。

発現上昇が認められた遺伝子	発現低下が認められた遺伝子
DEFA3,DEFA1,DEFA1B,MMP8,DEF A4,MS4A3,CEACAM8,BPI,LCN2,TC N1,CRISP3,LTH,OLR1,CEACAM6, その他17遺伝子	KIR2DL3,KIR2DL1,KIR2DL2,CLC,KL RF1,SH2D1B,IL5RA,SMPD3,ALOX1 5,FGFBP2,EMR1,CCR3,HRH4, その他8遺伝子

これらの中で発現するタンパクが分かっているものと移植後に 2.0 倍以上の発現上昇または発現低下を認めたものを選び、腎移植後の経時的な変化を RT-PCR で評価し、臨床的な免疫抑制状態とよく関連していた遺伝子を候補遺伝子として選択した。発現上昇を認めた遺伝子は CEACAM6 と CEACAM8 であり、発現低下を認めた遺伝子は CCR3 であった。



これらの遺伝子を用いて免疫抑制状態をスコア化した。

解析に用いた生体腎移植レシピエントとは別の生体腎移植レシピエント 20 例 (うち拒絶反応発生 2 例) を用いて遺伝子プロファイルを行った。

拒絶反応発生例のうち 1 例は予想通りに CEACAM6 と CEACAM8 の発現低下と CCR3 の発現上昇を認めたが、のこりの 1 例は CCR3 の発現上昇は認められなかった。拒絶反応非発生例においても数例は CEACAM6 と CEACAM8 の発現低下と CCR3 の発現上昇を認め、プロファイルの感度、特異度はそれほど高くなかった。

この原因として CEACAM6 と CEACAM8 の発現は免疫抑制剤の影響を受け、免疫抑制剤の効果に個人差があった可能性が考えられた。また拒絶反応以外の薬剤性腎毒性や術後の炎症などによって発現が影響されている可能性も示唆された。

その他の遺伝子の発現も検討したが、同様に拒絶反応に特異性が高い遺伝子は認められなかった。

ラット T 細胞性拒絶反応モデルのリンパ球を用いて 3 つの遺伝子の発現を評価した。最初に免疫抑制剤を用いないモデルの解析を行った。免疫抑制剤を使用しなければ 7 日前後で移植腎廃絶となる。移植後 1 日目、3 日目、5 日目の遺伝子発現を評価したところ、3 日目で発現上昇を認めたが、5 日目には発現は低下していた。

次にシクロスポリンを投与したモデルを用いて遺伝子の発現を評価した。シクロスポリンの投与量を調節し 14 日前後で移植腎廃絶となるモデルを作成し、1 日目、5 日目、7 日目、9 日目、11 日目で遺伝子発現を評価したが、発現はほぼ一定であり変化は認められなかった。

原因としてラットにおける拒絶反応の発生様式がヒトと異なっている可能性や、免疫

抑制剤はラットにはシクロスポリンしか用いていなかったが、ヒトは多剤免疫抑制療法であることが考えられた。

## 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)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

角田 洋一 (KAKUTA Yoichi)

大阪大学大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40710116