

平成 21 年 4 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591480

研究課題名（和文）胆汁プロテオミクス解析による、肝移植後拒絶反応診断法の確立

研究課題名（英文）Diagnostic system for acute cellular rejection in liver transplantation using proteomic analysis of bile.

研究代表者

丸橋 繁（MARUHASHI SHIGERU）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20362725

研究成果の概要：肝移植におけるグラフト障害の診断は非常に重要である一方、正確な診断には肝生検が必要である。我々は肝移植後に採取される胆汁中の蛋白に着目した。本研究の結果、胆汁からの蛋白の抽出精製法および急性拒絶反応と関連のある蛋白の同定に成功した。今後の臨床応用が期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・移植外科学

キーワード：肝移植、グラフト肝障害、免疫抑制、急性拒絶反応

1. 研究開始当初の背景

(1) 欧米における臨床肝移植は末期肝硬変や劇症肝炎などを対象に過去20～30年の間に急速に発展した。本邦でも生体肝移植を中心に肝移植が創められてから15年以上が経過する。本邦における生体肝移植は当初小児への肝移植が中心であったが、技術的進歩のおかげで次第に対象がより大きなグラフトを必要とする成人間肝移植中心へと変遷してきた。これまでに我が国では3500例以上の生体部分肝移植が行われ、その数は年々増加している。これは、肝移植が特殊な医療から誰でもが受けられる医療へと変化しつつある表れである。

臓器移植である肝移植は、拒絶反応を抑えるために免疫抑制剤を使用する必要がある。しかしながら一方で免疫抑制剤による感染症に対抗する必要があり、免疫抑制剤の至適

コントロールは時に非常に困難な場合がある。肝移植後の拒絶反応と感染あるいはC型肝炎の再発との鑑別は肝生検による病理組織学的診断が必須である。ところがこの病理組織診断法は、侵襲的であるにもかかわらず、しばしば確定診断が非常に困難な場合に遭遇する。この、移植後の拒絶反応の鑑別法のジレンマは臓器移植すべてに当てはまる命題であり、より正確、低コストで、侵襲の少ない拒絶反応診断法を求めてこれまでに多くの研究が行われてきた。

腎移植では血清中の可溶性接着分子、サイトカイン、ウロキナーゼ・プラスミノゲン・アクチベーター・レセプター(uPAR)や、リンパ球におけるサイトカイン、perforin、Granzyme B、FAS ligandが拒絶反応のマーカーになり得ることが報告されてきた。また、腎移植における尿の蛋白分析では可溶性

IL-2 受容体 (sIL-2R) 補体 C4d の検出や尿中の granzyme B や CD103、T-cell マーカーなどの mRNA の検出が調べられてきた。さらに、尿の蛋白分析では拒絶反応で一定のパターンがあることが最近報告され注目を集めている (Am J Transplant. 2005 Oct;5(10):2479-88)。

一方、肝移植では腎移植における研究に比べ、ほとんど研究実績がない。肝移植患者における胆汁解析では、我々はいち早く胆汁中の IL-6 の上昇とも拒絶反応が関連することを報告 (Ann Surg. 1996 Feb;223(2):204-11.) してきた。その後の報告では、血中や胆汁中の sICAM-1、sIL-2R、TNF-R、IL-6、IL-8、IL-10 を測定したものの、拒絶反応と関連して上昇したのは血中の sICAM-1 だけであり (Transplantation. 2003 Jan 15;75(1):146-51) 具体的な拒絶反応のマーカーが見つかっていない現状にある。

2. 研究の目的

腎移植における尿を用いた蛋白解析の肝移植における analogue である、肝移植における胆汁を用いた蛋白解析を着想した。ラット肝移植を用いた動物実験と臨床肝移植における胆汁蛋白解析を行う。本研究の目的は、肝移植後における胆汁のプロテオミクス解析を行い、限られた微量蛋白質を効率よく分離するための方法とそれらの同定が確実にできる質量分析法の確立、拒絶反応のマーカー蛋白を同定し、臨床応用することである。

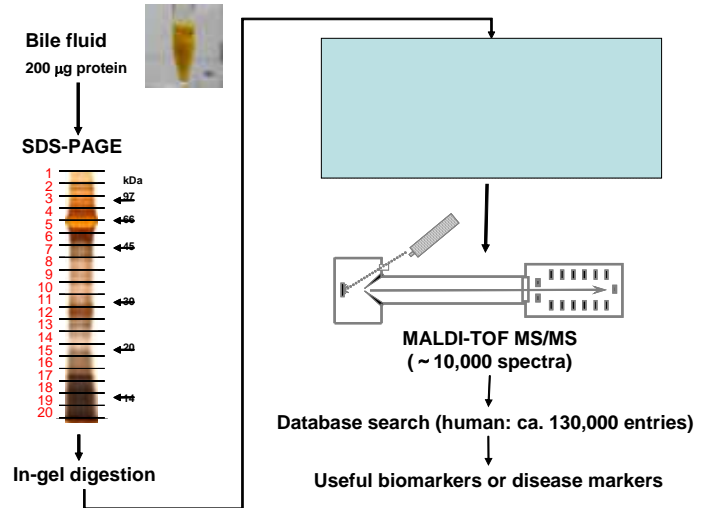
3. 研究の方法

(1) 胆汁の採取・保存。肝移植レシピエントの胆汁を術後 1~7 日、10、14、21、28 日にそれぞれ約 20ml 採取し、-80 で保存する。また術後肝機能値の上昇があり肝生検を行うときに胆汁を採取する。

(2) 胆汁に含まれる様々な共雑物を効率よく除去する方法を確立する。胆汁より得られる蛋白質画分を可溶化し、SDS ゲル電気泳動法により分子サイズにより粗分画を行う。この際、胆汁蛋白質の凍結融解等における安定性も合わせて評価する。

(3) 胆汁由来蛋白質混合物の効果的な分離法の確立。得られたゲルを一定の幅で裁断し、それぞれのゲル片に含まれる蛋白質をゲル内消化し、ロスなく高効率で消化ペプチドを抽出、回収する簡便な方法を開発する。これをナノフロー逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) にて分離する。

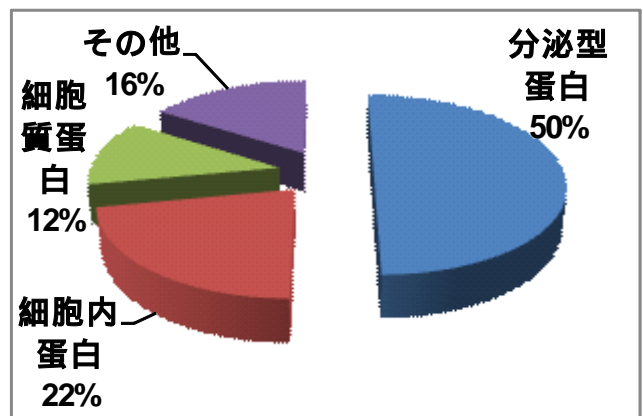
(4) 臨床データをデータベース化し、蛋白解析より得られる膨大なデータを確実かつ効率的に解析するソフトウェアを共同で開発する。これにより拒絶反応のマーカー探索を行う。



Workflow for proteomic analysis of bile

4. 研究成果

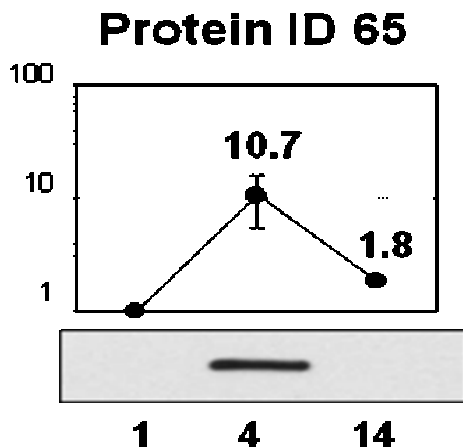
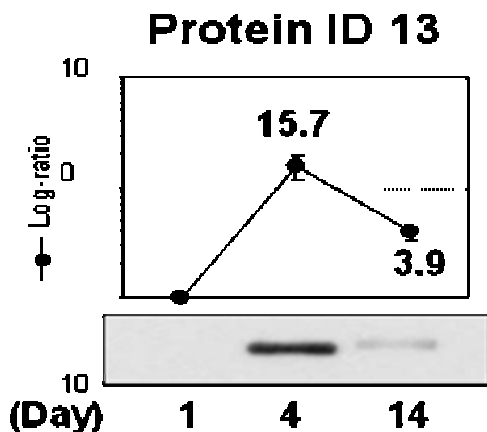
(1) 胆汁解析の基礎的研究としては、まず保存胆汁を用いて、胆汁に含まれる様々な共雑物 (胆汁酸、脂質、ビリルビン等は後の分析の妨げになる) を効率よく除去する方法を確立した。得られる蛋白質画分を可溶化し、SDS ゲル電気泳動法により分子サイズにより粗分画を行い、ナノフロー逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) と飛行時間型 (TOF: Time of Flight) タンデム質量分析計 (MS/MS) の組み合わせにより、蛋白同定を正確に行える質量分析法を確立した。これにより得られた MS/MS スペクトルから、蛋白質消化ペプチドの部分配列情報を利用し、蛋白の同定を行った。同定された胆汁中の蛋白は 221 であり、そのうち 50% が分泌型蛋白、22% が細胞内蛋白、12% が細胞膜タンパクなどとなっていた。



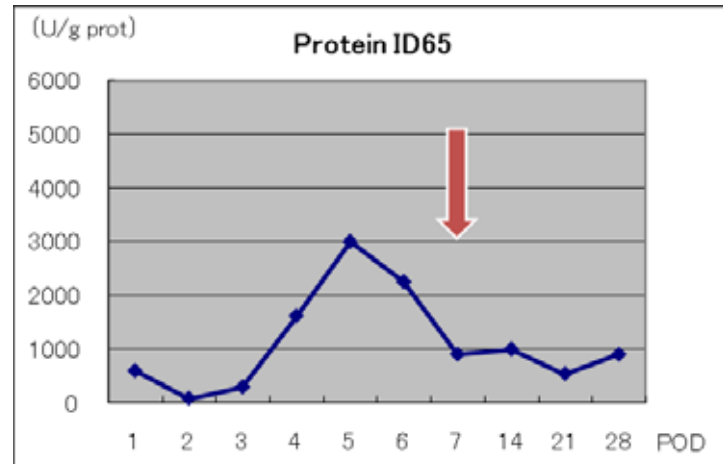
臨床サンプルとして、肝移植術中の肝提供者の胆管胆汁および肝移植レシピエントの胆汁を採取した。また、各症例におけるグラフト肝障害の有無、急性拒絶反応の有無や拒絶反応に対する治療の有無といった臨床データを相関させることにより、ドナー胆汁、グラフト肝障害のない胆汁、急性拒絶反応時の胆汁、急性拒絶反応治療後の改善時の胆汁、それぞれの群に分けることが可能であった。

(2) 急性拒絶反応が肝生検で確認された患者における、胆汁（術後1日目、4日目、14日目）を用いた変動解析では、合計78個の蛋白質が同定された。これらの3者間での変動を元に解析を行い、術後1日目から4日目に増加し、さらに14日目で減少した蛋白に注目した。蛋白ID13、ID65ではこの変化が顕著であり、拒絶反応のマーカー蛋白の候補と考えられた。

胆汁蛋白質 (Protein ID 13, 65) の¹⁸O標識による量変動解析とWestern Blotting



蛋白ID65に関してはさらに実際の肝移植後拒絶反応をきたした症例で胆汁中濃度の推移を調べた。この結果、拒絶反応の数日前に胆汁中蛋白濃度が上昇し、その後低下するという経過が認められた。



【まとめ】

本研究の成果から、急性拒絶反応時に胆汁中に増加する蛋白を同定することができた。また、同定された候補蛋白の胆汁検体中の量を測定することにより、急性拒絶反応を、非侵襲的かつ正確に診断することができる可能性が示された。

本研究では、プロテオーム解析を肝移植後の胆汁に応用し、胆汁の蛋白解析というこれまでにない新しい研究を行った。胆汁の蛋白を分離、同定することにより、肝移植後の胆汁中の蛋白の組成が驚くほど変化していることがわかった。また、胆汁解析の結果を臨床病理学データと相互解析することにより、急性拒絶反応におけるマーカー蛋白の候補を同定した (ProteinID65)。この蛋白の胆汁中の単位蛋白あたりの量を測定することにより、急性拒絶反応が起こることを臨床病理学的に診断できる数日前に診断することができる可能性がある。

今後、さらにマーカー蛋白の変動を多くの症例で行うことで、その有効性、重要性が確かめられるものと考えている。胆汁蛋白解析により、肝移植後の急性拒絶反応診断が可能となれば、非侵襲的で非常に有用な方法となると期待される。

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)

〔学会発表〕(計1件)

金致完、丸橋 繁、浅岡忠史、小林省吾、武田裕、種村匡弘、永野浩昭、堂野恵三、梅下浩司、門田守人、土岐祐一郎、森正樹.:成人間生体肝移植における胆汁中Alanine aminopeptidase(AAP)の意義.:日本外科学会第109回定期学術集会、2009.4.2(福岡)

6. 研究組織

(1)研究代表者

丸橋 繁 (MARUHASHI SHIGERU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 20362725

(2)研究分担者

永野 浩昭 (NAGANO HIROAKI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 10294050
武田 裕 (TAKEDA YUTAKA)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 90397696
小林 省吾 (KOBAYASHI SHOGO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 30452436
宮本敦史 (MIYAMATO ATUSHI)
大阪医療センター・臨床研究部・医師
研究者番号: 00362731

(3)連携研究者

高尾 敏文 (TAKAO TOSHIFUMI)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号: 10197048