

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基礎研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591488
 研究課題名（和文） FOXP3 遺伝子モニタリングによる、肝移植後の新たな免疫抑制療法の開拓
 研究課題名（英文） Development of a new immunosuppressive therapy after liver transplantation by monitoring of FOXP3⁺ regulatory T cells
 研究代表者
 阿曾沼 克弘（ASONUMA KATSUHIRO）
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授
 研究者番号：40202626

研究成果の概要：

生体肝移植術後 2 週間目以降の FOXP3mRNA の発現は拒絶群で低い傾向にあり、移植後長期経過後の FOXP3mRNA の発現は拒絶群で有意に低値であった。また、術後 1 ヶ月目の FoxP3⁺細胞のポピュレーションは非拒絶群に比べ、拒絶群で有意に低下していた。

以上より、FOXP3 陽性制御性 T 細胞のポピュレーションは肝移植後の免疫応答状態を反映していると考えられ、そのモニタリングは免疫抑制療法の調節の指標となる可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植外科学

1. 研究開始当初の背景

臓器移植後には原則として免疫抑制剤の投与が終生必要不可欠であるが、免疫抑制剤の大幅な減量あるいは、中止が可能である症例が少なからず存在している。

臓器移植後の免疫抑制機構(免疫寛容)には制御性 T 細胞が強く関与していると考えられ

ており、制御性 T 細胞の基礎研究において、FOXP3 遺伝子が制御性 T 細胞のマスター遺伝子であることが発見された。

我々はこの FOXP3 遺伝子に着目し、肝移植臨床症例における FOXP3 遺伝子の発現とレシピエントの免疫抑制状態の解析に基づいて、FOXP3 遺伝子の発現、ポピュレーションのモ

ニタリングによって免疫抑制剤療法の新たな治療戦略の確立が可能となるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

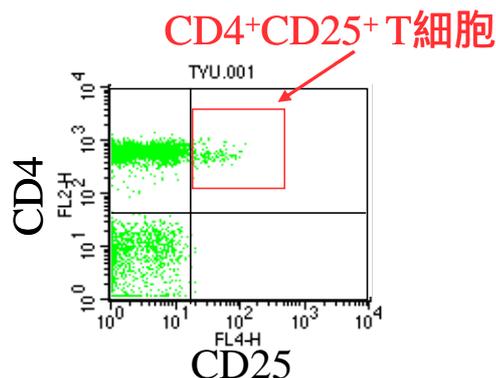
肝移植症例における CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞のポピュレーションと FOXP3 遺伝子の発現性の解析を行い、FOXP3 遺伝子の発現性やポピュレーションをモニタリングすることにより、より安全性の高い新たな免疫抑制剤療法の治療戦略、特に安全な免疫抑制剤の減量、中止プロトコルの確立を目的とした。

3. 研究の方法

CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞のポピュレーション：生体肝移植患者において、移植前後で末梢血を採血し、末梢血単核球を比重分離法にて分離した。肝機能異常症例、拒絶反応発症症例、免疫抑制剤減量、中止症例などについてはその状況に応じて適宜採血を行った。蛍光色素にて標識された抗体を用いて細胞表面抗原 CD4、CD25 の染色を行い、フローサイトメーターにて分析した。

FOXP3 遺伝子の発現性：単核球から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を作成した。FOXP3 及び 18s rRNA のプライマー、プローブ、PCR 用の試薬を用いて real time PCR を行った。FOXP3 の mRNA 量の評価として Ct 法を用いて fold induction を求めた。

移植後一度も拒絶のなかった群を非拒絶群、一度でも拒絶のあった群を拒絶群とし、患者を拒絶群と非拒絶群に分け、FOXP3 mRNA の発現、CD4⁺CD25⁺陽性制御性 T 細胞のポピュレーションについて比較検討した。



なお、2008 年度からは細胞内染色により FOXP3 陽性細胞のポピュレーションの測定が可能となったため、測定方法を FOXP3 mRNA からフローサイトメーターによる FOXP3 陽性細胞のポピュレーション測定に変更した。

FOXP3 陽性制御性 T 細胞のポピュレーション：生体肝移植患者において、移植前、移植後 1 ヶ月、移植後 6 ヶ月で末梢血を採血し、末梢血単核球を比重分離法にて分離した。

蛍光色素にて標識された抗体を用いて細胞表面抗原 CD4、CD25 の染色を行い、続いて、核内蛋白 FOXP3 を細胞内染色法にて測定し、フローサイトメーターにて分析した。

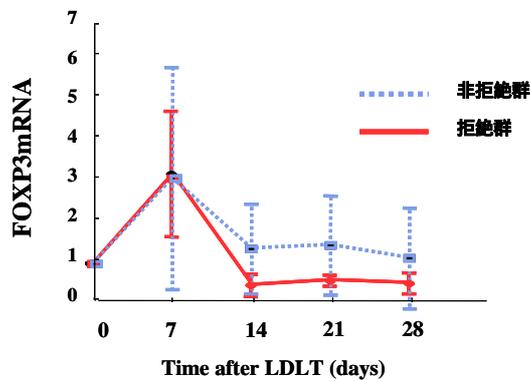
FOXP3 陽性制御性 T 細胞のポピュレーションについても、移植後一度も拒絶のなかった群を非拒絶群、一度でも拒絶のあった群を拒絶群とし、患者を拒絶群と非拒絶群に分け、比較検討をおこなった。

4. 研究成果

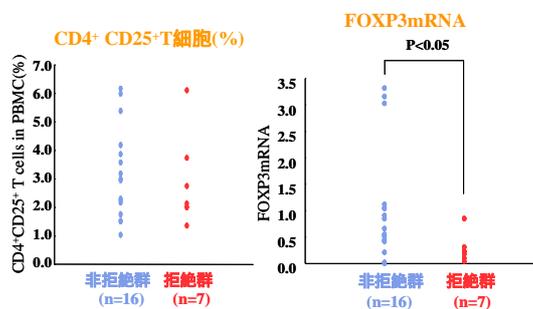
生体肝移植術後早期の患者における FOXP3 mRNA の発現の経時的変化では、非拒絶群、拒絶群ともに術後 1 週目に一過性の上昇がみられ、術後 2 週間目以降は拒絶群で非拒

絶群より低い傾向にあった。

CD4⁺CD25⁺制御性T細胞のポピュレーションではそのような傾向はみられなかった。

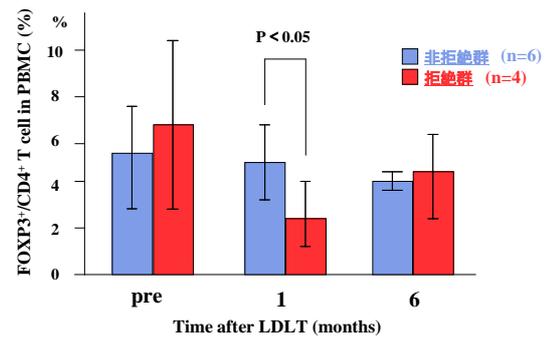


移植後長期経過症例において、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞のポピュレーションと FOXP3mRNA の発現を非拒絶群と拒絶群で比較すると、FOXP3mRNA の発現は拒絶群で有意に低値であった。CD4⁺CD25⁺制御性T細胞のポピュレーションでは両群に差はみられなかった。



次に測定方法を細胞内染色による FOXP3⁺制御性T細胞のポピュレーションに変更し、移植後長期の経時的変化を観察した。

FOXP3⁺制御性T細胞のポピュレーションを非拒絶群、拒絶群で比較すると、移植術後1ヶ月目の FOXP3⁺細胞のポピュレーションは非拒絶群に比べ、拒絶群で有意に低下していた。



FOXP3mRNA 又は蛋白は活性化した CD4⁺CD25⁺T 細胞や CD8⁺T 細胞でも一過性に発現し、この発現は制御機能と無関係と報告されており、移植後1週間目の FOXP3mRNA の一過性の上昇は、移植手術の侵襲によるリンパ球の活性化を反映していると思われる、この一過性の上昇は免疫抑制状態を反映しているのではないと考えられた。

術後2週間目以降の FOXP3mRNA の発現は非拒絶群に比べ、拒絶群で低い傾向にあり、移植後長期経過後の FOXP3mRNA の発現は拒絶群で有意に低値であった。

術後の安定した状態での測定は個々人の免疫状態を反映している可能性があり、FOXP3mRNA は移植後急性拒絶の予測因子となり得る可能性が考えられた。

FOXP3⁺制御性T細胞のポピュレーションでは術後1ヶ月目において、非拒絶群に比べ拒絶群で有意に低下していた。この要因として、拒絶反応に対する反応として末梢血中の制御性T細胞が組織へ移行したため、結果として末梢血中の制御性T細胞が低下した可能性や、逆に末梢血中の制御性T細胞の低下が拒絶反応を惹起した可能性も考えられた。

以上より、FOXP3mRNA の発現や FOXP3⁺制御性 T 細胞のポピュレーションは肝移植後の免疫応答状態を反映していると考えられ、そのモニタリングは免疫抑制療法の調節の指標となる可能性が示唆された。

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)

Sakamoto R, Asonuma K, Zeledon Ramirez ME, Yoshimoto K, Nishimori A, Inomata Y
Fork head Box P3 (FOXP3) mRNA expression, immediately after living-donor liver transplant. Exp Clin Transplant. 7: 8-12, 2009 (査読あり)

6. 研究組織

(1)研究代表者

阿曾沼 克弘 (ASONUMA KATSUHIRO)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授
研究者番号：40202626

(2)研究分担者

武市 卒之 (TAKEICHI TAKAYUKI) (2007 年度のみ)

熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00380999

(3)連携研究者

猪股 裕紀洋 (INOMATA YUKIHIRO) (2007 年度は研究分担者)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号：50193628

岡島 英明 (OKAJIMA HIDEAKI) (2007 年度は研究分担者)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・講師
研究者番号：20308604