

氏 名 まつなみ まさとし
松波 昌寿

学位論文題目

混合キメラによる移植腎の免疫寛容における免疫学的
動態と予後予測バイオマーカーに関する研究

学位論文内容の要旨

研究目的

移植臓器の短期生着率は飛躍的に向上したが、慢性拒絶反応に対する効果的な予防や治療方法は存在せず、免疫抑制剤の副作用により、長期成績は未だ満足できるものではない。このため免疫寛容の誘導が、移植医療の究極の目標として捉えられている。

免疫寛容とは個体の免疫抑制を行うことなく、移植片だけが特異的に拒絶されず、感染症などに対する生体の防御機能は正常に保たれている状態をさす。これまで、マサチューセッツ総合病院 (MGH) の臨床治験において、長期の安定した免疫寛容がヒトでも誘導できることが明らかとなったが、移植後の安全に免疫抑制剤を軽減し中止するための拒絶反応や免疫寛容を予測する有効なバイオマーカーの発見が課題となっている。

本研究では、過去 25 年間に MGH で行われたカニクイザルを使った腎骨髄同時移植モデルにおける 256 移植腎検体の messenger RNA (mRNA) を、NanoString 遺伝子発現解析を用いて分析し、混合キメラによる免疫寛容の免疫学的機序および免疫寛容や拒絶反応を予測するバイオマーカーについて検討した。

実験方法

1) 免疫寛容導入プロトコール

4~7kg のカニクイザルを低線量全身照射 (1.5Gy×2)、胸腺への局所照射 (7Gy) および抗 T 細胞抗体 (equine ATG) で前処置後、腎骨髄同時移植を施行した。術後短期間の抗 CD154 抗体もしくは Belatacept 投与による副刺激経路ブロックと 28 日間のシクロスポリン投与後に、すべての薬剤を中止し、一時的な混合キメラを誘導した。

また、先行して 4 ヶ月前に腎移植した例では、骨髄移植まで 3 種類の免疫抑制剤を投与した。なお、骨髄移植後に、抗 CD8 抗体もしくは Alefacept を追加した。

2) 移植腎検体と RNA 解析

1993 年から 2016 年に実験した腎骨髄同時移植モデルのうち、長期経過観察により完全な免疫寛容状態と確定された免疫寛容群 (TOL 群, 平均生存日数 1736 ± 454 日) 14 例、慢性拒絶群 (CAMR 群, 899 ± 152 日) 13 例、急性拒絶群 (TCMR 群, 130 ± 17 日) 15 例の移植腎プロトコール生検あるいは剖検によって得られたホルマリン固定パラフィン包埋 256 検体を対象とした。

これらサンプルから、mRNA を抽出した後、NanoString 遺伝子発現解析を用いて遺伝子発現を定量化した。遺伝子発現量は、nSolver Analysis Software version 3.0 を用いて、

4 つの異なるハウスキーピング遺伝子の発現量に正規化して得られた相対的 mRNA レベルとして表記した。今回、主だった免疫反応に関連する遺伝子、血管内皮細胞増殖因子、炎症反応関連遺伝子などを含む 53 種類の mRNA セットを解析した。

実験成績

1) mRNA 発現の経時的変化

移植腎の各種 mRNA は、移植後の時期によって発現レベルの変化が観察された。特に TOL 群において、*FOXP3* や *GATA3* などの転写因子あるいは *IL2*, *IL10*, *TGFβ* などのサイトカイン mRNA は、CAMR と TCMR の両群と比較して、移植後早期に非常に高い発現を示したが、その後徐々に低下し、3~4 年後にはほとんど術前レベルに復する傾向を示した。

一方、CAMR 群では、*CAV1*, *MALL*, *VWF*, *TEK*, *ROBO4*, *SOX7*, *PECAM1* などの血管内皮細胞増殖因子の mRNA 発現が移植後 1 年以内の段階から高く、腎機能不全に至るまで高いレベルで維持される傾向にあった。

移植腎における各種 mRNA 発現は経時的に変化し、移植後の時間的要素を考慮した解釈の必要性が示された。

2) 移植後早期（1 年以内）および 1 年以降での mRNA 発現

TOL 群、CAMR 群、TCMR 群の 3 群間における移植後 1 年以内および 1 年以降における移植腎の各種 mRNA 発現を比較すると、TOL 群において *FOXP3* は CAMR と TCMR の両群に比して、移植後 1 年以内、1 年以降のいずれも著しく高い発現を示した。さらに *IL10* や *TGFβ* などの Treg に関連するサイトカイン mRNA も高く、移植腎内の Treg が免疫寛容誘導の機序に大きく関わっていることを示唆した。

一方、TCMR 群では *IL1RL1*, *IL4*, *IFNG*, *CXCL11*, *GZMB*, *FCGR3A* などの炎症反応に関連した mRNA 発現が高い特徴を示した。また、CAMR 群では *CAV1*, *MALL*, *VWF*, *TEK*, *ROBO4*, *SOX7*, *PECAM1* などの血管内皮細胞増殖因子が移植後 1 年以内の早期から有意に高値を示した。

3) ROC 曲線を用いたバイオマーカーの評価

移植予後を見極めるためのバイオマーカーとしての妥当性を検討するため、術後早期（1 年以内）の段階の遺伝子発現で有意差のあったものを、ROC 解析を用いて評価した。TOL 群の *FOXP3* は、CAMR 群と比較して AUC 0.83 と適度な精度であり、*FOXP3* は免疫寛容を予測する上で優れたバイオマーカーであることが示された。

一方、CAMR 群における *CAV1*, *VWF* は、TOL 群と比較し AUC はそれぞれ 0.74, 0.71 であり、*CAV1*, *VWF* は慢性拒絶反応を予測する上で *FOXP3* を補完する有用なバイオマーカーになりうることを示唆された。

総括および結論

今回の研究により、一時的な混合キメラによる移植腎免疫寛容に、移植腎内の Foxp3 陽性 Treg の関与が強く示唆された。また、TCMR には炎症性サイトカイン、CAMR においては血管炎としての免疫反応がそれぞれ特徴的であった。また、移植後早期の移植腎における

FOXP3 の発現は，混合キメラによる免疫寛容誘導を予測するに有効なバイオマーカーとなりうると考えられた。

今後，免疫寛容特有のバイオマーカーをさらに確立していくことにより，臓器移植の治療成績の更なる向上へ繋がっていくことが期待される。