

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究

所 属 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部
研究者 鈴木 盛一

分担研究者

- (1) 三重大学医学部第一外科 上本伸二
- (2) 大阪大学医学部泌尿器科 高原史郎
- (3) 国立佐倉病院外科 坂本 薫
- (4) 藤沢薬品工業株式会社 丸澤 宏

要 旨

移植免疫寛容状態を作り出す一連の遺伝子の発現について、実験動物ならびに生体肝移植、腎移植後の臨床症例の材料を用い、細胞及び分子生物学の手法より解析し、移植後寛容に関わる細胞集団及び関連遺伝子発現情報の整理ができ、新しい免疫抑制遺伝子の発見を期待する。

1. 研究目的

ヒトゲノムプロジェクトの進展によって、ヒト遺伝子の完全な配列の解明が現実のものとなろうとしている現在、遺伝子配列情報を病気の予防や診断、治療法の開発につなげる道を切り開くことが次の課題として浮き上がりつつある。

臓器移植の基礎ならびに臨床の分野では、移植後一定期間免疫抑制剤を使用した後、宿主に移植免疫寛容が成立する例があることを認めている。臨床症例及び動物実験で免疫寛容状態を誘導し、維持する機序を細胞免疫学の観点から解明するとともに、近年飛躍的な発展を見せている分子生物学の手法を取り入れ、寛容状態を作り出す関連遺伝子の発現を解明することをこの研究の目的としている。そのために、最近さまざまな分野で応用されている PCR を用いた mRNA の Differential Display 法 (DD 法) と急速に発展してきた DNA チップ法などの最先端技術を用いて移植免疫寛容関連遺伝子を解明していく。

動物実験で得られた寛容動物と生体肝移植、腎移植後の臨床症例から、新しい移植免疫寛容誘導又は維持に関連した遺伝子の発現を探索することは極めて重要である。最終的には免疫反応を抑制したり、免疫寛容を成立させる遺伝子の DNA チップを作成することを目標としている。これにより、移植患者の個々の遺伝子発現の状況に応じて、免疫抑制剤を減量したり、中止したりすることが的確にできるようになり、また薬剤の再投与、増量なども安全にできるようになる。すなわち、個々の患者ニーズに合わせた遺伝子薬物療法が行えるようになるわけである。

2. 研究方法

本研究では実験動物ならびに臨床症例からの材料を用い、細胞生物学的な検討すると同時に DD 法、DNA チップ法をなどにより拒絶反応を抑制する関係遺伝子の発現を解析する。

1) 臓器移植免疫寛容動物の作製及び解析

同種異系ラットの肝臓移植を行い、一定期間の免疫抑制療法によって免疫寛容動物を作成し、従来の細胞免疫学の方法を用いてそれらを解析する。同時に寛容動物から経時的に末梢血液、リンパ節およびグラフトなどからリンパ球を分離し、それから RNA を抽出後、市販の DNA チップを用い、既知遺伝子の発現プロファイルを明らかにする。また、DD 法、DNA チップにて、新規遺伝子配列決定に至る実験プロセスを確立する。配列決定された遺伝子については、発現の再現性を確認し、cDNA ライブラリから全長遺伝子の解明を行う。

2) 臨床生体肝移植後の免疫抑制剤離脱症例での解析

京都大学移植外科においての生体肝移植の症例数は 600 例となり、生存率は約 80% で、本邦のみなら

ず世界的にも単一の施設として最多の経験と良好な成績を蓄積しつつある。それらの症例の中には免疫抑制剤を完全離脱して免疫寛容状態に至った重要な症例を現在まで20数例有している。当施設の協力の基に、移植後免疫抑制剤離脱症例に関して、合併症などのやむを得ない理由で免疫抑制剤をやめたケースと計画的に免疫抑制剤を離脱したケースを分け、末梢血液の提供を受ける。さらに臨床上必要な時に施行された肝生検組織の一部の提供も受ける。得られた試料を用いて RNA を抽出後、DD 法、DNA チップによる遺伝子発現の解析を行う。以上より、臓器移植後に拒絶反応を抑制する関連遺伝子の情報データベースの設計開発、及びデータ解析システムの作成を行なう。

3) 腎移植において予後の長期間良好な患者の遺伝子発現の検討

国立佐倉病院にて生体(106例)または死体(100例)腎移植を受けた患者のなかから長期間(5年以上)良好に移植腎を生着させている症例(腎移植後一定期間の免疫抑制剤使用によって臨床的に拒絶反応が消失したレシピエント)14例を選び書面による説明と同意の後、末梢血10~20mlを採取した。採血後速やかにリンパ球を分離(凍結搬送)しRNAを抽出した。症例の詳細は、表に示すように、男9名、女5名、(採血時)年齢は31~78(平均46±12)才、移植後年数が5~21(13.4±5.4)年、免疫抑制剤としてステロイドを(プレドニン換算で)5~10(5.36±1.66)mgとシクロスポリン100~275mg(198±52、11名)、アザチオプリン12.5~50mg(5名)、プレディジニン50または100mg(2名)などを服用している。蛋白尿などの拒絶反応の兆候は見られず、血清クレアチニン値0.75~2.85(1.39±0.495)mg/dl、尿素窒素値11~48(27.6±9.7)mg/dlと安定かつ良好な移植腎機能を有している。また、大阪大学付属病院において、今年度(平成13年度)は、第一段階の研究を行った。腎移植直後から30年までの患者(約300人)を対象として、インフォームド・コンセントを取得した上で、末梢血を採取し、DNA抽出を行った。同時に血清採取も行った。

4) 倫理委員会への申請

人からの試料の採取に関しては、申請者が所属する国立成育医療センター(旧国立小児病院)及び研究協力機関である各施設の倫理委員会への申請手続きを行う。また、患者の臨床所見、治療歴、検査データなどの全ての情報は匿名化した上で、プライバシーに十分配慮しながら管理する。

3. 研究成果

1) 臓器移植免疫寛容動物の作製及び解析:

a. 細胞生物学による解析: 今回、臓器移植後に免疫抑制剤FK506を投与することにより同種異系ラット肝移植モデルにおいて、免疫寛容を誘導したラットを作成した。本作製ラットの移植片が100日を超えた後、従来の細胞免疫学的手法を用いて末梢血のリンパ球を分離した。その後FACSにて細胞表面の分子について解析を行い、CD4⁺、CD25⁺細胞集団がNaiveのラットより有意に増加していることを明らかにした。2匹の寛容ラットの末梢血リンパ球表面のCD4⁺、CD25⁺共陽性細胞はそれぞれ28.3%、15.8%なのに対して、Naiveのラットでは10.8%であった。一方、免疫寛容動物から得られたリンパ球の養子移植実験を行った。control群における心移植片の生着期間が2、9日であるのに対して、免疫寛容を誘導したラットから分離したリンパ球を養子移植した群の心移植片の生着期間は14、17、20、25、30日であり、心移植片の顕著な延長が見られた。これにより免疫調節機能を持つリンパ球の存在が確認できた。

b. Differential Display (DD)法による遺伝子発現の解析: 寛容動物の末梢血から分離したリンパ球を用いてRNAの抽出をした後、アンカープライマーにより逆転写反応させ、PCRを行った。変性アクリルアミドゲルによってPCR産物の電気泳動を行った。その結果から、有意に変動があった174バンドのクローニングを実施した。そのうち16バンドの108クローンの塩基配列決定を行い、NCBIのBLAST検索後、既知遺伝子11、EST3、未知遺伝子2であることが分かった。それら遺伝子の塩基配列を基に、現在プライマー及びプローブを設定し、定量RT-PCRを行い、遺伝子発現の再確認を進めているところである。

c. DNAチップによる遺伝子発現の解析: 寛容動物の末梢血から分離したリンパ球を用いてRNAを抽出した後、Affymetrix社のRat Genome U34Aアレイ(7000種のラット全長遺伝子を含む)を用いて、遺伝子発現プロファイルを解析した。発現データの二次元クラスター解析を行い、異系肝移植モデルによる寛容ラットと同系移植ラットのプロファイルを比較し、さらにFACSによる解析結果及びリンパ球養子移植実験の結果との関連について検討した。寛容ラットの末梢血リンパ球では、既存の免疫抑制または免疫調整遺伝子の高い発現が認められた。また、isograftのそれと比較したところ、464個の有意に変化した遺伝子を見いだした。その中から統計学的な処理(t-test)を行い、211個(p<0.05)の候補遺伝子を見つけた。そ

の内訳は既知遺伝子 135 個、EST からなる未知の遺伝子 76 個である。既知遺伝子について、免疫調節リンパ球において上昇した遺伝子は 58 個、isograft において上昇した遺伝子は 80 個。未知遺伝子について免疫調節リンパ球において上昇した遺伝子は 41 個、isograft において上昇した遺伝子は 35 個であった。その意義について、現在検討を進めている。さらに、免疫寛容との関連性が考えられる非同定遺伝子のクローニングも進めている。

2) 京都大学医学部附属病院において、計画的減量を行っている 67 人の患者の内、完全離脱 16 人、減量中 43 人、拒絶反応をきたした者 8 人であった。非計画的減量を行っている 48 人では、完全離脱 33 人、減量中 3 人、拒絶反応をきたした者 12 人であった。申請中であった免疫抑制剤減量中の患者における新規遺伝子探索研究は、平成 13 年 9 月に京都大学医学部倫理委員会から承認され、減量中の患者からの採血が開始された。また、研究分担者が平成 13 年 12 月に三重大学へ移動となったが、三重大学医学部附属病院においても平成 14 年 3 月 5 日から生体肝移植が開始された。

3) 腎移植において予後の長期間良好な患者の遺伝子発現の検討においては、Affymetrix 社の HG-U95Av2 GeneChip を実験に用い、Gene Spring にてデータ解析を行った。健常人と比較して、Welch t-test で有意差がある遺伝子は 599 でした。また、599 のうちレシピエントにおいて発現増加した遺伝子は 470、発現減少した遺伝子は 129 でした。さらに、2 倍以上発現変化した 237 遺伝子のうち、Up-regulated gene が 191、down regulated gene は 46 個でした。特に転写因子とシグナル伝達因子に増加した遺伝子が多く見受けられた。一方、免疫関連遺伝子に発現減少したものが多かった。

4. 考察

ヒトゲノムプロジェクトの成果は、遺伝病や一部の癌に関する遺伝子治療として応用されつつある。しかしながら、臓器移植分野においては免疫寛容遺伝子の発見が他の分野に比べ遅れている。また発見された遺伝子そのものも未だ直接治療に利用しようという試みは現在ほとんど行われていない。臓器移植後は免疫抑制剤を原則として一生飲み続けなければならない。一方、京都大学移植外科において、生体肝移植症例 800 例のうち生存率は約 80% で、さらに 40 例以上もの症例で免疫抑制剤を離脱できた。この実績は本邦のみならず世界的にも単一の施設として最多の経験と良好な成績である。

臓器移植の分野では、移植後一定期間免疫抑制剤を使用した後、宿主に移植免疫寛容が成立する例が確認されている。今回は臨床症例及び動物実験で免疫寛容状態を誘導し、維持する機序を細胞免疫学の観点から解析することを目的とした。免疫抑制剤 FK506 の投与により、同種異系ラット肝移植モデルにおいて免疫寛容ラットを作製した。寛容ラットの末梢血からリンパ球を分離し解析を行った。その結果、CD4+、CD25+ の細胞集団が Naive のラットに比べて有意に増加していることを明らかにした。この細胞集団は、最近文献で報告された免疫反応を調節するリンパ球集団と一致した。また、このリンパ球集団の養子移植実験を行ったところ、免疫調節機能を持つリンパ球の存在が確認された。これらの細胞生物学的解析から得られた結果を踏まえ、近年飛躍的な発展を見せている分子生物学の手法を取り入れ、寛容状態に関与のある遺伝子集団の発現を解明した。

DD 法とは発現の見られる mRNA をポリアクリルアミドゲル上のバンドとして表示する方法である。この方法は、異なった細胞間、あるいは異なった条件下の細胞間で発現している遺伝子の違い (differentially expressed gene) を同定する事ができる。このように異なった細胞間で直接 mRNA を比較する事によって、細胞集団間の mRNA の発現の差 (特徴) を明らかにすることができる。DD 法の特徴は、安価かつ簡便に少量の sample から mRNA を増幅することにより、多数の mRNA を比較できるところである。よって、細胞の mRNA 発現の変化を全体的に観察したいとき、また免疫寛容マーカーなど変化の指標になるマーカー探索には特に有用と思われる。今回の研究では DD 法による遺伝子発現の解析を行った結果、174 の有意に変動が見られたバンドが見つかった。それらのクローニングを実施し、そのうちの 16 バンドから 108 クーロンの塩基配列決定を行った。NCBI にて BLAST 検索を行った結果、既知遺伝子 11、EST 3、未知遺伝子 2 であった。現在、それらの遺伝子配列をもとに、プライマー及びプローブを作製し、定量 RT-PCR による遺伝子発現の再確認を進めている。

一方、高密度オリゴヌクレオチドアレイによる遺伝子発現解析は細胞あるいは組織における網羅的な発現プロファイルの探索を可能とし、その定量性については SAGE 法との比較などから実証されている。移植後宿主が寛容状態になるには、リンパ球による調整機構が働いていることが予測される。免疫寛容個体から

分離したリンパ球の遺伝子発現プロファイルを解析し、特徴的な遺伝子発現パターンを同定する事により、診断や個別の治療計画を選択することが可能となる。今回の研究では、DNA チップを用いて遺伝子発現の解析を行うと共に、FACS の解析結果及びリンパ球養子移植実験の結果との関連について検討した。既知の免疫抑制、または免疫調整遺伝子の高い発現が寛容ラットの末梢血リンパ球で認められた。また、これまで免疫寛容との関連が示されていない遺伝子が多数見つかった。その遺伝子の免疫抑制に及ぼす機能および発現の再確認について検討を進めている。さらに、未だ同定されていない遺伝子を新たに同定する作業を進めている。

生体肝移植後臨床症例の解析については、免疫抑制剤から完全離脱している患者は現時点で49人となり、移植後に生存している患者数の約10%に達する。さらに、現在減量中の患者の中には2週間に1回の服用など、今後の完全離脱の可能性が高い患者も多く存在し、完全離脱患者の割合は今後増大するものと予測される。この数字は、移植免疫寛容が得られやすいとされる通常の脳死肝移植における今までの報告をはるかに凌駕するものであり、生体肝移植の特徴と推測される。この貴重なヒトからのサンプル解析によるヒトにおける移植免疫寛容のメカニズム解明が期待される。

今回、動物実験で得られた寛容ラットの移植免疫寛容誘導および維持に関連した遺伝子の解析から得られた研究結果は、生体肝移植後の臨床症例から得られる関連遺伝子の発現解析の基礎的データとして極めて重要である。倫理委員会の許可が遅れたため、生体肝移植後寛容誘導できた患者からの解析ができなかった。しかし、本研究計画では最終的に寛容動物と生体肝移植後の臨床症例から関連遺伝子を探索し、その結果から移植免疫反応の抑制、あるいは免疫寛容を成立させる遺伝子を簡便に診断することができうる DNA チップ作成を目標としている。臨床及び基礎的研究から得られた結果を用い、臨床的には移植患者の遺伝子発現情報の解析と整理を行うことにより、病態及び拒絶反応の診断、また基礎的には新しい免疫抑制遺伝子の発見が期待できる。そのような遺伝子を解明することにより、移植患者において免疫抑制剤を中止あるいは減量することが可能になり、さらには免疫寛容を誘導する遺伝子を導入することにより免疫寛容状態を成立させることも可能になると考えられる。さらにこれにより、移植患者の遺伝子発現の状況に応じた、免疫抑制剤の増減、中止や再投与が的確かつ安全にできるようになり、個々の患者ニーズに合わせた遺伝子薬物療法が行えると考えられる。

5. まとめ

臓器移植分野における移植免疫寛容状態を作り出す一連の遺伝子の発現について、1) 寛容ラットの末梢血リンパ球を用い、細胞免疫学及び分子生物学的手法により解析した。研究結果から移植後寛容に関わる細胞集団及び関連遺伝子の同定を行った。今後新たな免疫抑制遺伝子の発見が期待される。2) 京都大学医学部附属病院において、生体肝移植を受けて移植後2年以上を経過して肝機能が安定している患者を対象に、免疫抑制剤の減量プロトコールを行っている。現在までに49人(生存患者の約10%)が免疫抑制剤からの完全離脱に成功している。移植免疫寛容のメカニズム解明のために、離脱患者からの遺伝子探索のための採血が開始された。三重大学医学部附属病院においても生体肝移植が開始され、今後は京都大学と三重大学で移植を受けた患者をフォローアップしていく。3) 腎移植患者については、平成13年度は十分なサンプルを収集できただけでなく、データベースを完成させることができた。

6. 研究発表

1) S.Takahara, K.Ota, K.Takahashi, K.Uchida, K.Morozumi, J.D.Wang and M.Kyo. Chronic cyclosporin-induced nephropathy. Clin Nephrol 55: 69-72, 2001

2) M.Kitamura, N.Tsuboniwa, H.Azuma, J.D.Wang, K.Matsumiya, K.Matsumoto, Y.Kaneda, S.Takahara and A.Okuyama Gene therapy of ischemic damaged kidney in the rat using hepatocyte growth factor gene. Transplant Proc 33: 2865-2867, 2001

3) A.Kawauchi, S.Takahara, M.Sada, R.Goto, T.Nakatani and T.Miki Susceptibility to vesico-ureteral reflux in Japanese is linked to HLA DR antigen. Urology 58: 1036-1039, 2001

4) F.Xue, T.Takahara, Y.Yata, M.Minemura, C.Y.Morioka, S.Takahara, E.Yamato, K.Dono and A.Watanabe. Attenuated acute liver injury in mice by naked HGF gene transfer into skeletal muscle

with electroporation. GUT (in press)

5)A.Tsujimura, M.Ota, Y.Katsuyama, M.Sada, H.Miura, K.Matsumiya, R.Goto, T.Nakatani, A.Okuyama and S.Takahara. Susceptibility gene for non-obstructive azoospermia located near HLA-DR and DQ loci in the HLA class_III region. Hum Genet (in press)

6)Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, Sakamoto S, Hayashi M, Ueda M, Kanematsu T, Tanaka K. Analysis of alloreactivity and intragraft cytokine profiles in living donor liver transplant recipients with graft acceptance. Transplant Immunol 8, 279-286 (2001)

7)Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, Egawa H, Kiuchi T, Fujita S, Hayashi M, Kanematsu T, Tanaka K. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. Transplantation 72, 449-454 (2001)

7. 知的所有権の取得状況 特になし。

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社