

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 絵野沢 伸

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 小松孝義

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、動物実験及び生体部分肝移植や腎移植後の臨床症例からの検体を用い、細胞生物学及び分子生物学的手法により解析し、免疫寛容の成立に関わる細胞集団及び関連遺伝子発現情報の解析並びに新規免疫抑制遺伝子の探索を目指す。

1. 研究目的

ヒトゲノムプロジェクトの進展によって、ヒト遺伝子の完全配列の決定がなされようとしている現在、遺伝子配列情報を病気の予防や診断、新規治療法の開発につなげることが次の課題である。臓器移植の基礎ならびに臨床分野では、移植後一定期間免疫抑制剤を使用した後に宿主に移植臓器に対する免疫寛容が成立する場合が知られている。この寛容状態を誘導、維持する機序を細胞免疫学の観点から解明し、近年飛躍的に発展している分子生物学的手法 (Differential Display 法 (DD 法)、DNA チップ法等) を取り入れ、寛容状態成立に関連する遺伝子の発現を解析することが本研究の目的である。最終的には拒絶反応の抑制や、免疫寛容成立に関わる遺伝子を集積した DNA チップを作成し、移植患者個々の遺伝子発現の状況を把握し、免疫抑制剤の減量や中止を的確に行い、症状に応じた薬剤の再投与、増量を安全にできるようにしたい。すなわち、個々の患者の免疫系の反応性に合わせたオーダーメイドの移植後療法の確立を目指すものである。

2. 研究方法

1) 臓器移植免疫寛容動物の作製及び解析

同種異系ラット間で肝臓移植を行い、術後一定期間の免疫抑制剤 (FK506) 投与により、あるいは自然寛容誘導系の近交系ラット間で移植臓器に対する免疫寛容動物を作成し、FACS 等の細胞免疫学的方法を用いて解析、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、mRNA 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調べた。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した。また、サブトラクション法によって移植後に変動する遺伝子群の抽出を行った。

2) 生体部分肝移植後の免疫抑制剤離脱レシピエントの末梢血リンパ球の細胞免疫学的解析

京都大学移植外科で実施された生体部分肝移植症例の中で免疫抑制剤を離脱して免疫寛容状態に至った症例を現在まで19例有している。当施設の協力の基に、離脱症例において、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、mRNA 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調べた。

3) 予後良好な腎移植長期安定レシピエントの末梢血リンパ球の遺伝子発現解析

国立佐倉病院にて生体または死体腎移植を受けた患者のなかから長期間 (10 年以上) 良好に移植腎が生着している症例 (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 例から末梢血 10~20ml を採取した。採血後速やかにリンパ球を分離凍結後 mRNA を抽出した。

症例の詳細は、男性 9 名、女性 5 名、年齢（採血時）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、腎移植直後から 30 年経過までの患者を対象として末梢血を採取し、DNA 抽出を行った。

4) 倫理的配慮

ヒト検体を利用する研究に際しては、国立成育医療センター（旧国立小児病院）及び研究協力機関各施設の倫理委員会への申請手続きを行い、機関長の承認を受け、承認条件を厳格に守りながら説明と同意（インフォームドコンセント）を行った。検体及び診療情報の研究利用に際しては匿名化を行い、提供者（患者）のプライバシーに十分配慮し管理した。

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 14 日間の免疫抑制剤 FK506 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、CD4CD25 共陽性細胞集団が Naive のラットより増加していることがわかった。すなわち 2 匹の寛容ラットの末梢血リンパ球表面の CD4CD25 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。対照群における移植心の生着期間が 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。養子移植した細胞の中に免疫調節機能を持つリンパ球の存在が示された。

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、EST 3、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、同系移植 (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。

d. サブトラクション法による移植後変動遺伝子の抽出: 拒絶反応と免疫寛容成立の分岐点である移植後 20 日のラット肝の cDNA ライブラリーと移植前のドナー肝の cDNA ライブラリーを比較し、前者にのみ発現する遺伝子を抽出した。発現の高い方から 192 クローンを選び出し、配列を決定し BLAST によるデータベース検索を行い重複を除いたところ、120 の遺伝子が抽出できた。うち 3 遺伝子が未知遺伝子である。

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 80 人の患者の内、完全離脱 19 人、減量中 53 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 50 人では、完全離脱 34 人、減量中 4 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、これまでに20例に生体肝移植が行われた。3名に対してEBウイルス感染症のために非計画的に減量が進められたが、2名は拒絶反応をきたして減量は中止された。1名は離脱後6ヶ月を経過しているが拒絶反応をきてしていない。また、三重大学医学部倫理委員会においても、新規遺伝子探索研究が平成14年10月に承認された。

3) 上記の完全離脱19人の中から、本研究の遂行にあたっては、京都大学及び国立成育医療センターの倫理委員会の承認を得た上、11人の患者、家族および正常人から遺伝子検査を含めたインフォームドコンセントを得た。採取された患者(No.1~11 n=11)と正常人(No.1~11 n=11)の末梢血リンパ球より、それぞれtotal RNAを抽出し、T1(No.1~5 n=5)、T2(No.6~11 n=6)、C1(No.1~5 n=5)、C2(No.6~11 n=6)の要領で4種類の混合total RNAサンプルを調整した。各混合total RNAサンプル5 μ gに対し、T7プロモーター配列を付加したオリゴ(dT)プライマーをアニールさせ、First strand DNA合成を行った。次に、このFirst strand DNAを鋳型にして、T7プロモーター配列を有するSecond strand DNAを合成した。最後にSecond strand DNAを鋳型にして、T7 RNA polymeraseによるRNA合成を行った。In vitro増幅RNAに対し、ランダムヘキサマーをアニールさせた後 aminoallyl-dUTP 存在下で逆転写酵素反応を行い aminoallyl-dUTP が導入されたcDNAを作製した。Human1 cDNA Microarray(Agilent 社)に、T1とC1及びT2とC2を競合ハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション条件は、65°C/17時間で行った。ハイブリダイゼーション後の蛍光シグナルのスキヤニングはScan Array5000(GSL Lumonoids 社)を用いて行った。画像データから数値データへの変換は専用ソフトQuant Array(GSL Lumonoids 社)を用いて行った。スキヤニング時のフォトマルのゲインについては、全てのチップでhigh(cy5は55、cy3は85)とlow(cy5は45、cy3は65)の2種類で取得した。得られた数値データの採用および補正については、蛍光強度が飽和していないものはhigh値を採用し、蛍光強度が飽和していたものは、low取得時のデータのT/C値(Ratio)を参考にhigh値に補正を行った値を採用した。各スポットの蛍光値からバックグラウンドとしてnegative controlの蛍光値を差し引き、サンプル・コントロール間のノーマライゼーションは、グローバルノーマライゼーション法(全体の有効スポットを用いて正規化する方法)を用いた。さらに値が500に満たないものは排除した。その後T1とC1およびT2とC2でそれぞれ比較し、T1/C1値およびT2/C2値が2以上の変動を「Up Regulation」、0.5以下の変動を「Down Regulation」として抽出した。それぞれの中で重複がある遺伝子については、より変動の大きい結果を採用し、重複のないリストとしてまとめた。また、分類できるものについてはカテゴリーに分類した。「Up Regulation」として、T1/C1では287クローン、T2/C2では657クローンが抽出され、「Down Regulation」として、T1/C1では398クローン、T2/C2では575クローンが抽出された。また、T1/C1とT2/C2の結果を併せて、遺伝子名として重複するものについては変動度上位のもののみを採用したところ、「Up Regulation」は679遺伝子、「Down Regulation」は676遺伝子となった。可能なものについてカテゴリーごとに分類したところ、それぞれUp RegulationとDown Regulationの数は、「Apoptosis」16/14、「Cell Cycle」23/18、「Cytokine」13/23、「DNA metabolism」10/8、「Heat shock protein」1/0、「Growth Factor」5/10、「Metabolism」109/89、「Nuclear Receptor」0/3、「Oncogene」11/14、「P450」1/1、「Receptor」36/35、「Signal Transduction」69/65、「Stress」48/31、「Transcription Factor」26/34、「Transporter」59/35であった。また、以上の15カテゴリーに分類できなかったものは、432/482であった(表示:Up数/Down数)。現在抽出された各遺伝子について検討を行っている。また、ほぼ同様の方法で、Atlas Glass Human 3.8 I Microarray および Atlas Glass Human 3.8 II Microarray (Clontech 社)を用いた検討も行っている。

4) 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。また遺伝子そのものを直接治療に利用しようという試みもほとんど行われていない。臓器移植後は原則として免疫抑制剤を一

生服用しなければならない。また、単に服用するだけでなく、拒絶反応と薬剤の副作用の出現を見極めながら投与量や種類の増減することも必要である。一方で京都大学移植外科においては積極的な免疫抑制剤の離脱療法確立に取り組んでいる。同施設では生体肝移植の実施数が800例を超え、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。さらに40例以上もの症例で免疫抑制剤を離脱できた。本研究ではこの優れた成績に科学的な裏付けをし、広く移植後療法に応用することをめざしている。

実験的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。免疫抑制剤 FK506 投与により、同種異系ラット肝移植モデルにおいて作成した免疫寛容ラットでは、末梢血リンパ球の CD4CD25 共陽性細胞集団が Naive のラットに比べて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とされるリンパ球集団であり、養子移植実験により機能的にも免疫調節機能を持つことが確認できた。

次いで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調べた。DD 法とは発現の見られる mRNA を電気泳動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、未知遺伝子の発見にも威力を有する。今回の研究では、174 のバンドで有意に変動が見られた。そのうちの16バンドのクローニングを行い、NCBI にて BLAST 検索を行った結果、既知遺伝子11、EST3、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も 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ことが確実である。この数字は、移植免疫寛容この数字は、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。前述のように倫理委員会の許可が遅れたため、臨床肝移植後に寛容が成立した患者の検体解析は完全にできなかったが、動物実験から貴重な遺伝子発現プロファイルのデータが得られている。これら遺伝子は相同性検討によってヒトの寛容誘導や拒絶の診断に有用な遺伝子を探索することが可能である。特に、移植肝内で変動する遺伝子を検索するにはヒト検体で行うことは倫理的に難しく、今回サブトラクション法で抽出した候補遺伝子120の情報は今後非常に有用なものとなろう。このように基礎的研究から得られた結果と臨床データを融合することによって、移植後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。現在医師の経験に頼る部分が大きい免疫抑制剤の増減や種類の変更にも科学的な裏付けを与えることによって患者毎のオーダーメイド治療の実現と、さらには免疫寛容を誘導する遺伝子を積極的に誘導あるいは導入することにより寛容状態の成立も可能になると考えられる。

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、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継続されている。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た。一年間で20例の生体肝移植が行われ、すでに1例は6ヶ月以上の免疫抑制剤からの離脱が継続している。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) 腎移植長期安定レシピエントの末梢血の網羅的遺伝子発現解析により、変動のある遺伝子群の抽出が完了した。

6. 研究発表

1) L Guo, M. Fujino, H. Kimura, N. Funeshima, Y. Kitazawa, Y. Harihara, K. Tezuka, M. Makuuchi, S. Suzuki and X-K. Li Simultaneous Blockade of Co-stimulatory Signals, CD28 and ICOS, Induced a Stable Tolerance in Rat Heart Transplantation. *Transpl Immunol* (In press)

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

3) M. Fujino, M. Kawasaki, N. Funeshima, Y. Kitazawa, M. Kosuga, K. Okabe, M. Hashimoto, H. Yaginuma, K. Mikoshiba, T. Okuyama, S. Suzuki, X-K. Li. CrmA gene expression protects mice against concanavalin-A induced hepatitis by inhibiting IL-18 secretion and hepatocyte apoptosis. *Gene Ther* (In press)

4) M. Fujino, K. Adachi, M. Kawasaki, Y. Kitazawa, N. Funeshima, T. Okuyama, H. Kimura, S. Suzuki, X-K. Li. Prolonged Survival of Rat Liver Allograft with Adenoviral Gene Transfection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) nef. *Liver Transplant* (In press)

5) Zhang HQ, Lu H, Enosawa S, Takahara S, Sakamoto K, Nakajima T, Saito H, Suzuki S. Microarray analysis of gene expression in peripheral blood mononuclear cells in long-surviving renal recipients. *Transplant Proc* 34(5): 1757-1759, 2002

6) Zhang HQ, Lu H, Enosawa S, Amemiya H, Takahara S, Sakamoto K, Suzuki S. Identification of novel genes associated with immune suppression in renal transplant patients. *Transplant Proc* 34; 2733-2735, 2002

7) Lu H, Zhang HQ, Enosawa S, Suzuki S. Identification of the alterations in genes expression in rat recipients with long-term surviving cardiac grafts. *Transplant Proc* 34; 2729-2731, 2002.

8) M. Fujino, X-K. Li, Y. Kitazawa, L. Guo, M. Kawasaki, N. Funeshima, T. Amano, S. Suzuki. Distinct Pathways of Apoptosis Triggered by FY720, Etoposide and Anti-Fas Antibody in Human T-Lymphoma Cell Line (Jurkat Cells). *J Pharmacol Exp Ther* 300: 939-945, 2002.

9) L Guo, X-K. Li, N. Funeshima, M. Fujino, Y. Nagata, H. Kimura, H. Amemiya, S. Enosawa, T. Tsuji, Y. Harihara, M. Makuuchi, S. Suzuki. Prolonged survival in rat liver transplantation with mouse monoclonal antibody against an inducible co-stimulator (ICOS). *Transplantation* 73(7): 1027-1032, 2002

7. 知的所有権の取得状況 特になし。