

平成15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

目 次

課題番号

<p>20030895A KH21009</p>	リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	西島正弘 …… 1
<p>896A KH21010</p>	低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発	芝崎 太 …… 6
<p>897A KH21011</p>	細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発	松田道行 …… 19
<p>898A KH21012</p>	抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構	新井洋由 …… 25
<p>899A KH21013</p>	ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究	葛西正孝 …… 33
<p>900A KH21014</p>	難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用	井上和秀 …… 39
<p>901A KH21015</p>	動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発	望月直樹 …… 47
<p>902A KH21016</p>	天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究	上原至雅 …… 51
<p>903A KH21017</p>	肥満／糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発	江崎 治 …… 55
<p>904A KH21018</p>	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	絵野沢 伸 …… 59
<p>905A KH21019</p>	神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬	田平 武 …… 62
<p>906A KH21020</p>	レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 67
<p>907A KH21021</p>	感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発	鈴木和男 …… 74
<p>908A KH21022</p>	自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発	川 茂幸 …… 84
<p>909A KH21024</p>	動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用	北川隆之 …… 89
<p>910A KH21025</p>	新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用	山越 智 …… 95
<p>911A KH21026</p>	マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析	辻本豪三 …… 104
<p>912A KH21027</p>	細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明	桃井 隆 …… 111
<p>913A KH22071</p>	ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発	鈴木康夫 …… 118
<p>914A KH22072</p>	サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発	吉村昭彦 …… 121
<p>915A KH22073</p>	T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立	宮武昌一郎 …… 125
<p>916A KH22082</p>	変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析	目加田英輔 …… 133

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

研究要旨 移植後免疫寛容状態を作り出す遺伝子の発現について、動物実験及び生体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を行った。

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 剣持 敬
- (4) 藤沢薬品工業株式会社 小松孝義

A. 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、DNA チップ法を取り入れ、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。

B. 研究方法

1) 生体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

京都大学移植外科と三重大学医学部附属病院の協力の基に、それぞれの施設における生体部分肝移植症例より、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のうち、免疫寛容状態に至った症例より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。

2) 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、市販DNAチップを用いて解析した。

(倫理面への配慮)

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 Consent)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。

C. 研究成果

1) 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68人の患者の内、完全離脱17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。三重大学医学部附属病院では平成14年3月5日から生体肝移植が開始され、これまでに40人の生体肝移植が行われ、すでに3人が計画的減量を開始している。また、3人に非計画的減量が開始され、1人が免疫抑制剤からの離脱を1年6ヶ月維持しているが、2人は拒絶反応をきたした。三重大学医学部附属病院でも免疫抑制剤減量中の患者における新規遺伝子探索研究の申請が行われ、平成15年9月に三重大学医学部倫理委員会から承認され、免疫抑制剤を離脱した患者および減量中の患者からの採血が開始された。

2) 本研究の遂行にあたっては、京都大学、三重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、上記の免疫寛容状態に至った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 11 人(T 群 : t1~t11)と正常人 11 人(C 群 : c1~c11)の末梢血リンパ球より、それぞれ total RNA を抽出し、これらの一部から、T1(t1~t5 n=5)、T2(t6~t11 n=6)、C1(c1~c5 n=5)、C2(c6~c11 n=6)の要領で、T1 T2 C1 C2 の 4 種類の混合 total RNA サンプル(各約 10 μg)を調整した。各混合 total RNA サンプル 5 μg 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 Lumonics 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 Lumonics 社)を用いて行った。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。その後 T1 と T2 および C1 と C2 でそれぞれ比較し、値に 2 倍以上の差があるクローンを不安定な結果を有するとみなし棄却した。それら以外のクローンに関して、T1・T2 の平均 (T Ave.) と C1・C2 の平均 (C Ave.) を比較し、T Ave./C Ave. 値が 2 以上のクローンを「Up Regulation」、0.5 以下のクローンを「Down Regulation」として抽出した。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、635 クローンが抽出され、「Down Regulation」として、2005 クローンが抽出された。可能なものについてキーワードを用いてカテゴリーごとに分類したところ、各カテゴリーごとの Up Regulation 数 : Down Regulation 数は、「Apoptosis」8 : 5、「Calcium」8 : 40、「Cell Cycle」5 : 8、「Chemokine」2 : 13、「Cytokine」7 : 20、「Immunity」40 : 11、「Kinase」18 : 65、「Membrane」49 : 109、「Metabolism」9 : 17、「Phosphatase」11 : 24、「Receptor」55 : 213、「Signal Transduction」11 : 35、「Transcription」20 : 88 であった。また、以上の 13 カテゴリーに分類できなかったものは、461 : 1519 であった(表示 : Up 数/Down 数)。この結果から、T Ave./C Ave. 値、シグナル値等を考慮しながら、Up Regulation から CCND2、CXCL9、CXCL10、IFIT2、CD68、C3、TLR4、TLR7、DATF1、TNFSF10、STAT1、MAPK6、ID6、CBL、Down Regulation から GOS2、DUSP1、IL-1α、IL-1β、IL-8、IL-18RAP、CCL3、CCL3L1、CXCL1、CXCL3、CXCR4、CD31、CD44、

CD61、CD83、CD87、EREG、KLRF1、TNFAIP3、AATK、NFTC3、FOS、COX-2、STAT2、SOCS3、FKBP9、Glucocorticoid receptor-α を、候補遺伝子として選抜した。t1~t11、c1~c11 のうち混合せずに ID 別に残しておいた Total RNA より cDNA をそれぞれ合成し、これらを用いて、上記の選抜された候補遺伝子のうち、CBL、ID3、TNFSF10、SOCS3、Glucocorticoid receptor-α について、RT-PCR を行った。同時に行った GAPDH の発現レベルにて補正を行い、T 群と C 群の発現レベルの平均を比較検討した結果、SOCS3 と Glucocorticoid receptor-α について、その発現が C 群より T 群において低下している事が確認された。さらに SOCS3 の発現については、定量 PCR および FACS を用いた検討によっても、C 群より T 群において低下している事が確認された。現在他の候補遺伝子についても同様の検討を行っている。

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 を実験に使い、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。また、大阪大学において遺伝子治療臨床研究のデータ管理と保存システムの構築を終了し、ゲノム情報にもとづいた広い意味での免疫抑制療法の実施の準備を終了した。

D. 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の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。

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。

E. 結論

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) 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。DNAチップを用いた解析では、分類したカテゴリーのうち「Immunity」のみで、圧倒的にDown数よりUp数のほうが多いという結果を得た。これは、免疫関連の遺伝子が、健常人より免疫寛容状態の人において発現が相対的に上昇しているという事を端的に表しており、能動的作用を以て免疫寛容を誘導する遺伝子の確かな存在を示唆すると考えられ、大変興味深い。また、パスウェイ等を考慮することにより、使用したDNAチップに搭載されていない遺伝子についてまで考察を深めることも可能である。免疫寛容状態に至ったヒトのサンプルは大変貴重であり、このように網羅的に解析できる手技は大変有用であると考えられる。2) 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。大阪大学において遺伝子治療臨床研究のデータ管理と保存システムの構築を終了し、ゲノム情報にもとづいた広い意味での免疫抑制療法の実施の準備を終了した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) M. Fujino, Y. Kitazawa, M. Kawasaki, N. Funeshima, H. Kimura, T. Nakajima, H. Saito, X-K. Li. Differences in lymphocyte gene expression between tolerant and syngeneic liver grafted rats. *Liver Transpl* 10(3):379-91; 2004.

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

Transpl Immunol 12(1): 41-48; 2003.

3) 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 Transpl* 9(8):805-813; 2003.

4) S. Kobayashi, K. Dono, T. Tanaka, S. Takahara, Y. Isaka, E. Imai, H. Nagano, T. Kato, K. Umeshita, S. Nakamori, M. Sakon and M. Monden. Gene transfer into the liver by plasmid injection into the portal vein combined with electroporation. *J Gene Med* 5: 201-208; 2003.

5) S. Kobayashi, K. Dono, T. Tanaka, S. Takahara, Y. Isaka, E. Imai, H. Nagano, T. Kato, K. Umeshita, S. Nakamori, M. Sakon and M. Monden. Electroporation-mediated ex vivo gene transfer into graft not requiring injection pressure in orthotopic liver transplantation *J Gene Med* 5: 510-517; 2003.

6) F. Xue, T. Takahara, Y. Yata, Y. Kuwabara, E. Shinno, K. Nonome, M. Minemura, S. Takahara, X-K. Li, E. Yamato, A. Watanabe. Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy. *Gut*, 52:694-700, 2003

7) K. Yazawa, Y. Isaka, S. Takahara, E. Imai, N. Ichimaru, Y. Shi, Y. Namba and A. Okuyama Direct HGF gene transfer into kidney suppressed cyclosporine A nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* (In press)

2. 学会発表

Funeshima N, Fujino M, Kitazawa Y, Hara Y, Okuyama T, Kimura H, Li X-K. Inhibition of T cell proliferation by Indoleamine 2,3-dioxygenase cDNA-transfected dendritic cells tryptophan catabolism. The 11th Congress of the European Society for Organ Transplantation. Venice, 9/20-24, 2003

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

平成15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16年9月30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