総 説

特集：遺伝子チップを用いた臨床免疫研究の最前線

マイクロアレイの臓器移植への応用

松井郁一^{*1,*3}, 斎浦明夫^{*2}, 菅原寧彦^{*1}, 児玉龍彦^{*3}, 幕内雅敏^{*1}

Appliance of microarray technology to clinical organ transplantation

Yuichi MATSUI^{*1,*3}, Akio SAIURA^{*2}, Yasuhiko SUGAWARA^{*1}, Tatsuhiko KODAMA^{*3} and Masatoshi MAKUUCHI^{*1}^{*1}Department of Transplantation Surgery, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan^{*2}Department of Surgery, the Cancer Institute Ariake Hospital^{*3}Department of Molecular Biology and Medicine, Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo

(Received March 29, 2005)

summary

Although recent advances in immunosuppressive therapy have dramatically enhanced the early survival of solid organ transplant recipients, acute rejection still occurs in some recipients. Long-term immunosuppressive drug administration, furthermore, entails a number of potentially significant problems such as infection, spontaneous neoplasm and drug toxicity. Alloantigen specific tolerance induction is the ultimate goal in transplant immunology, and can be induced in a rodent model; however, the precise mechanism by which specific tolerance is affected are not clearly understood, and the current immunosuppression regimens have all failed to achieve this goal in a clinical setting.

DNA microarray technology has made it possible to analyze the expression of a large number of genes and revolutionized many areas of biology and medicine. This new technology can provide non-biased, global expressions of tens of thousands of genes simultaneously. Recent studies on gene expression profiles in various diseases, including allograft rejection, have successfully provided important information and new insights into the biological mechanisms of these diseases. In this article, we reviewed these insights, especially with the viewpoint of appliance of microarray technology to clinical solid organ transplantation.

Key words——microarray; transplantation; rejection; tolerance

抄 録

免疫抑制剤の進歩により臓器移植は対象臓器の非可逆的臓器不全に対する確立した治療法の一つとなっている。しかし種々の合併症を併発する危険性も内包しており、急性・慢性拒絶反応もその一つである。臓器移植における拒絶反応ではアロ主要組織抗原 (MHC) 抗原に対しての特異的免疫反応が主たる原因であるが、現在用いられているステロイド、サイクロスポリン A、タクロリムスなどの薬剤はすべて抗原非特異的に作用する。そのため長期服用による発癌率の増加、ウイルス・真菌などへの易感染性など多くの問題を抱えている。現在の移植医療の問題点の一つはこのような抗原非特異的な免疫抑制であり、グラフト抗原特異的な免疫寛容の誘導は移植免疫における究極の目標である。近年、分子生物学の進歩により全遺伝子を網羅的に解析できる DNA マイクロアレイ技術が普及した。我々はこれまで、DNA マイクロアレイを用いてマウス心移植モデルにおける急性拒絶や免疫寛容の網羅的遺伝子発現を解析してきた。本稿では、これらのマイクロアレイ技術と今後の移植医療との融合に向けての課題を検討した。

平成 9 年 10 月に「臓器の移植に関する法律」が制定施行され、平成 17 年 3 月末まで、日本において 35 例の脳死からの臓器提供による移植が行われた。このように臓器移植は対象臓器の非可逆的臓器

不全に対する確立した治療法の一つとなっている。治療手段として確立し得たのはサイクロスポリン A、タクロリムスといったカルシニューリン阻害剤である免疫抑制剤の登場によるところが大きい。しかしながら現在においても臓器移植術後の急性・慢性の拒絶反応は最も多く起こりえる合併症の一つである。臓器移植における拒絶反応ではアロ主要組織抗

^{*1}東京大学人工臓器移植外科, ^{*2}癌研究会癌研有明病院消化器外科, ^{*3}東京大学先端科学技術センター分子生物医学部門

原 (MHC) 抗原に対しての特異的免疫反応が主たる原因であるが、現在用いられているステロイド、サイクロスポリン A、タクロリムスなどの薬剤はすべて抗原非特異的に作用する。そのため長期服用による発癌率の増加、ウイルス・真菌などへの易感染性など多くの問題を抱えている。現在の移植医療の問題点の一つはこのように移植臓器 (グラフト) を拒絶から守るために抗原非特異的に免疫抑制を行っていることであり、グラフト特異的な免疫寛容の誘導は移植免疫での究極目標である。そこで、これまでに行われてきた、DNA マイクロアレイや遺伝子改変マウスを用いた急性拒絶や免疫寛容の網羅的遺伝子発現を解析し、今後の臨床との融合に向けての課題を検討した。

移植免疫における DNA マイクロアレイ技術の応用は、斎浦らがマウス異所性心移植モデルにおいて急性拒絶反応時の網羅的遺伝子発現解析を行ったのが最初である¹⁾。マウスでは、同じストレイン間で移植された心臓は拒絶されず、生着し拍動を続ける (isograft 群)。一方主要組織抗原 (MHC) が異なる場合速やかに拒絶され、拍動は停止する (allograft 群)。このような実験系において、移植心から total RNA を抽出し、逆転写酵素により cDNA を合成、Ambion 社 in vitro transcription によりビオチンラベルされた cRNA に増幅する。フラグメンテーションの後、Affymetrix 社 GeneChip® にハイブリダイズし、専用スキャナーで発現強度を読みとることで、expressed sequence tag (EST) を含め約 11000 個の遺伝子発現解析が可能である。これまで取られていた仮説に基づいた遺伝子解析 (hypothesis-based gene analysis) から網羅的な発現解析より仮説を導くという新たな解析手法の登場でもある。斎浦らの研究で Balb/c (H2-d) マウス心臓を C3H/He (H2-k) マウス腹部に異所性に移植する allograft 群の移植心は術後 8 日~14 日の間に完全に拒絶された。一方、C3H/He マウス心臓を C3H/He マウスに移植した isograft 群では、全例術後 100 日以上拍動を続けた。各群の術後第 1, 3, 5 病日の移植心から total RNA を抽出し、isograft 群および C3H/He naive 心をコントロールに急性拒絶モデルである allograft 群の網羅的遺伝子発現解析を行った。急性拒絶群で発現が上昇している遺伝子として、MIG, RANTES, IP-10 といったケモカインが同定された。興味深いことに、これらの急性拒

Figure 1
Upregulated chemokine genes in acute rejection of wild-type and in IFN-gamma $-/-$ mice.

絶群において発現上昇している遺伝子は、共通して IFN-gamma によって誘導されるという特徴を有していた。次に、IFN-gamma 欠損マウスにおいて急性拒絶は起こるかどうか、また IFN-gamma 欠損マウスに移植した場合での遺伝子発現はどうなっているのかを検討した²⁾。その結果、IFN-gamma 欠損マウスにおいても急性拒絶が起こり、むしろグラフト生存期間は IFN-gamma 欠損マウスの方がやや短い傾向にあった。また IFN-gamma 欠損マウスに植えた移植心では IFN-gamma に依存しない C10, PF-4, SDF-1, CXCR-4 といったサイトカイン・ケモカインの遺伝子発現が上昇していることが同定され、急性拒絶反応での redundancy の一部が解明された。(Figure. 1)

実験動物ではさまざまな免疫寛容誘導の系が確立されている。T 細胞が移植抗原を認識する際の co-stimulatory シグナルを阻害する方法はその一つである。

ここで免疫寛容とは、1. 特定の抗原に対して免疫反応が起こらない。2. 継続的に免疫抑制剤を投与する必要がない。3. その他の抗原に対しては免疫反応が正常に起こる。という 3 点を満たすものとして定義する³⁾。

我々は、CD80/86 抗体により、co-stimulatory シグナルを阻害して得た免疫寛容誘導時における網羅的遺伝子発現解析を DNA マイクロアレイで行った⁴⁾。グラフト平均生存期間は、寛容群、isograft 群では 100 日以上、急性拒絶群で 8.0 ± 0.7 日であった ($p < 0.05$)。興味深いことに寛容群でも組織学

的に、冠動脈周囲および心筋間に単核球の炎症細胞浸潤が見られた。急性拒絶群ではより激しい浸潤が観察され、isograft 群では単核球浸潤はほぼ見られなかった。(Figure. 2)

遺伝子発現解析は、術後 7 日、28 日、70 日目の

Figure 2

Histology of transplanted heart (A-C). On day 7, transplanted grafts were harvested and processed for hematoxylin and eosin staining.

Interestingly, on day 7, tolerizing allografts exhibited a slightly diffuse, perivascular, or interstitial infiltration of mononuclear cells.

グラフトより total RNA を抽出し、Affymetrix 社 GeneChip® U74AV2 を用い斎浦らと同様の方法で行った。その結果、寛容群では、64 遺伝子が isograft 群より、16 遺伝子が拒絶群より発現が上昇し、2 遺伝子が免疫寛容特異的遺伝子として同定された。また、興味深いことに斎浦らによって同定された急性拒絶群で上昇が見られる IFN-gamma によって誘導される Mig, RANTES といった炎症性ケモカイン遺伝子の発現は急性拒絶群だけでなく寛容群でも上昇しており、しかもこれらは、術後 7 日目のみならず免疫寛容誘導後 70 日目においても発現上昇が持続していた。(Figure. 3) つまりこれら炎症性ケモカインの遺伝子発現上昇があっても、免疫寛容の導入および維持は保たれることが in vivo で示された。病理学的所見および遺伝子発現解析では上記のように急性拒絶群と免疫寛容群で類似しているところはあるものの、一方でグラフトは拒絶され拍動を停止し、他方で移植心は拍動を続けている。その結果の差を生んでいるメカニズムの一つとして、T 細胞の Activation-induced cell death (AICD) の役割が重要と思われる。AICD とは、抗原が T 細胞に提示され刺激を受け続けた場合に起こる、いわゆるリンパ球の homeostasis を保つ機構で、大部分が Fas-FasL により開始される細胞死である。Lenardo らによると⁵⁾、T 細胞の AICD が免疫寛容誘導には必要であり、一方 IL-2 や IFN-gamma は AICD を亢進させる^{6,7)}との報告もある。どのように免疫寛

Figure 3

Values of the average difference of representative chemokine genes, MIG and RANTES. The average difference of not only the tolerizing but also rejecting cardiac allografts on day 7 was three times more than that of the syngeneic isografts on day 7. MIG, monokine induced by IFN- γ ; RANTES, regulated on activation normal T cell expressed and secreted.

容群で AICD が graft acceptance に作用しているかは今後の課題である。

human を対象に比較的大規模に臓器移植の遺伝子発現解析を行った研究としては、2003 年 Sarwal らにより行われた、59 例の小児腎移植患者の遺伝子発現解析がある⁸⁾。解析された 59 例の内訳は、急性拒絶 21 例、慢性拒絶 (chronic allograft nephropathy : CAN) 16 例、薬剤性腎障害 15 例であった。急性拒絶群で NF- κ B や IFN γ により誘導される Apoptosis 関連遺伝子、CD20, CD74, immunoglobulin heavy and light chain といった B 細胞関連遺伝子の発現上昇が見られた。一方、CAN 群では、cyclinA2 や cyclinB1, cell division cycle といった細胞増殖や細胞周期に関連する遺伝子の発現上昇が見られた。薬剤性腎障害の患者では、annexin V や TGF β といった自然免疫関連遺伝子の発現が上昇していた。Sarwal らは、組織中の total RNA を linear に amplify することで、ヒト腎移植後の急性拒絶 (acute rejection : AR) および慢性拒絶 (chronic allograft nephropathy : CAN) の生検の一部である微量組織より gene profile を解析する方法を確立した。組織所見では同じ急性拒絶反応に診断される中にも、遺伝子発現上は 3 つのサブタイプに分別されることを示し、この中で CD20 陽性の B 細胞の浸潤が見られる群が有意にステロイド治療に対しての抵抗性を示し、より高率に移植片廃絶に結びつくとしており、DNA マイクロアレイが急性拒絶反応をより治療効果を予測しうる診断に寄与する可能性があることを示唆した。

ケモカインの局在に関して 2001 年 Goddard らは⁹⁾、human の肝移植患者を対象に興味深い研究を行っている。肝移植術後少なくとも 2 回以上ステロイド治療に対し抵抗を示した慢性拒絶患者を対象に、末梢血単核球から単離したリンパ球および再移植の際摘出されたグラフト肝を解析している。flow cytometry および免疫染色によりケモカイン CXCR3 のライガンドである IP-10, MIG は拒絶患者の肝類洞内皮での発現が上昇しており、門脈内皮では ITAC の発現上昇がみられた。また胆管上皮では CXCR4 のライガンドである SDF-1 の発現上昇がみられることを同定し、各部位で発現上昇しているケモカインがリンパ球リクルートに関与していることを示した。

2003 年 Scherer らは¹⁰⁾、human 腎移植患者の慢性拒絶の早期診断に遺伝子チップが有用である可能性を示唆した。糸球体腎炎、腎盂腎炎などの end-stage 腎疾患に腎移植を施行した患者すべてに、プロトコールバイオプシーとして移植手術時、術後 6 ヶ月、術後 12 ヶ月の計 3 回腎生検を施行している。研究対象は術後 6 ヶ月の時点で拒絶反応は起こっていない患者 17 名で、その後術後 12 ヶ月の段階で慢性拒絶を起こした患者と起こしていない患者の 2 群に分け、両群の術後 6 ヶ月の拒絶が起こっていない時点での腎生検検体から RNA を抽出し、遺伝子発現プロファイルを用いて pre CR (chronic rejection) 群と Control 群として網羅的に比較解析している。慢性拒絶群で発現上昇している遺伝子として、cytokeratin 15, hoxB7, NPRL2, OS9, G-protein gamma 7, OBCML (opiate-binding protein-cell adhesion molecule-like), および EST2 種の計 8 遺伝子を、発現下降している遺伝子として、hoxA7, prolactin receptor (PRLR) の 2 遺伝子を挙げている。これら 10 遺伝子の組み合わせパターンから 88% の特異度で慢性拒絶の発生が予測できるとし、Prognostic marker としての有用性を示唆した。

2002 年 Stegall らは¹¹⁾、ラット異所性心移植モデルにて Affymetrix 社 GeneChip U34A を用い、急性拒絶反応の解析を行っている。術後第 3, 第 5, 第 7 日の遺伝子プロファイル調べ、発現上昇遺伝子として、Allograft inflammatory factor-1, Interferon regulatory factor-1, TGF- β 1 を同定し、発現が抑制されている遺伝子として、Decorin, SC1 を同定した。Decorin は TGF- β 1 のアンタゴニストで、Decorin が抑制されることで TGF- β 1 による炎症や繊維化の反応が亢進するのではと考察している。また、SC1 は SPARC と homology を有し、接着因子を阻害する作用をしているとし、この発現が抑制されることでグラフトへの接着因子の作用が強化されるのではと推察している。

カルシニューリン阻害剤の作用機序に関し、2003 年 Erickson らは¹²⁾、ラット異所性心移植モデルにおいて、遺伝子チップを用い網羅的に解析している。同系移植である isograft 群をコントロールとして、1. 無治療 allograft 群 (通常の急性拒絶モデル)、2. タクロリムス投与群、3. サイクロスポリン投与群の 3 つの群で遺伝子発現を解析している。こ

の研究では、無治療 allograft 群で上昇し、タクロリムス群、シクロスポリン群両群で発現が低下している遺伝子群をカルシニュリン阻害の免疫抑制剤が作用していると遺伝子群とし、8 遺伝子を同定した。これら 8 遺伝子には、IL-2 receptor alpha, Inducible nitric oxide synthase (iNOS2), TGF-beta receptor 3, interferon regulatory factor 1 (IRF-1), Interferon (IFN) gamma などがあった。これらはマクロファージ、ナチュラル・キラー細胞、cytotoxic T 細胞活性に必要な遺伝子であり、急性拒絶反応は宿主の T 細胞で媒介されるカスケードより起こり、カルシニュリン阻害剤はこれらのカスケードのいくつかを阻害することで拒絶反応を抑制しているという機序を証明した。

DNA マイクロアレイは一度に何千もの遺伝子発現を解析しえるという点で、大変強力な手段であるが、結果を解釈するにあたり留意すべき事項がある。まず第 1 に、費用の面で実験および研究施行回数が限定されてしまうことが多く、偽陽性の結果が出てしまう可能性を含んでいる。第 2 に、マイクロアレイで解析している mRNA の発現と対応するタンパクの相関が必ずしも直線的でない場合がある、ということである。ただし、Celis らによると細胞内に mRNA が存在しない場合、対応するタンパク量もそれほど多くないレベルである¹³⁾。最後に遺伝子には DNA マイクロアレイの結果で発現量が少なくても、biological には影響の強いものが存在する可能性がある。このような遺伝子では、変化の幅が小さくても十分意義のある反応である場合があり、このような変化は他の強力な反応にマスキングされ、DNA マイクロアレイによる発現解析では detect されない可能性がある。

今後の課題としては、グラフトに浸潤しているリンパ球 (graft infiltrating cell : GIC) に絞っての遺伝子発現解析から拒絶発症、寛容誘導・維持のメカニズムの考察、GFP マウスやノックアウトマウスを用いたアレイデータの集積およびそこからのメカニズムの検討などが考えられる。

まとめると、DNA マイクロアレイは臓器移植の臨床分野では、1. 診断：急性または慢性拒絶反応の分子生物学的診断、2. 新規治療薬：メカニズムを解明し、分子標的分子を同定するといった、診断および治療の面で応用の可能性を備えている。

文 献

- 1) Saiura, A., et al. : A comparison of gene expression in murine cardiac allografts and isografts by means DNA microarray analysis. *Transplantation*, **72** : 320–329, 2001.
- 2) Saiura, A., et al. : Detection of an up-regulation of a group of chemokine genes in murine cardiac allograft in the absence of interferon-gamma by means of DNA microarray. *Transplantation*, **73** : 1480–1486, 2002.
- 3) Li, X.C., et al. : T cell death and transplantation tolerance. *Immunity*, **14** : 407–416, 2001.
- 4) Matsui, Y., et al. : Identification of gene expression profile in tolerizing murine cardiac allograft by costimulatory blockade. *Physiol Genomics*, **15** : 199–208, 2003.
- 5) Lenardo, M. J. : Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature*, **353** : 858–861, 1991.
- 6) Dalton, D. K., et al. : Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *J Exp Med*, **192** : 117–122, 2000.
- 7) Badovinac, V. P. and J. T. Harty : Adaptive immunity and enhanced CD8+ T cell response to *Listeria monocytogenes* in the absence of perforin and IFN-gamma. *J Immunol*, **164** : 6444–6452, 2000.
- 8) Sarwal, M., et al. : Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med*, **349** : 125–138, 2003.
- 9) Goddard, S., et al. : Differential expression of chemokines and chemokine receptors shapes the inflammatory response in rejecting human liver transplants. *Transplantation*, **72** : 1957–1967, 2001.
- 10) Scherer, A., et al. : Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. *Transplantation*, **75** : 1323–1330, 2003.
- 11) Stegall, M., et al. : Gene expression during acute allograft rejection : novel statistical analysis of microarray data. *Am J Transplant*, **2** : 913–925, 2002.
- 12) Erickson, L. M., et al. : Microarray-based gene expression profiles of allograft rejection and immunosuppression in the rat heart transplanta-

- tion model. *Transplantation*, **76** : 582–588, 2003.
- 13) Celis, J. E., et al. : Gene expression profiling : monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Lett*, **480** : 2–16, 2000.