

論文の内容の要旨

論文題目

DNA マイクロアレイを用いたマウス心移植モデルにおける急性拒絶反応時の網羅的遺伝子解析

Gene expression analysis during acute rejection in murine cardiac transplant model by means of DNA microarray

指導教官

幕内 雅敏 教授

東京大学医学系研究科外科学専攻

平成10年4月入学 医学博士課程

氏名

齋浦 明夫

臓器移植はいまや日常的な医療になった。末期心、肝、肺疾患の患者にとって臓器移植は唯一の救命手段である。一方、移植の歴史において、臨床における臓器移植の成績の向上は、主に急性拒絶反応を制御する免疫抑制剤の進歩により成された。しかしながら、急性拒絶反応はいまだに50%近くの症例で経験され、临床上大きな問題として残っている。移植免疫においてCD4陽性T細胞は拒絶反応の開始に必須とされている。CD4陽性T細胞が同種異系移植片のアロ抗原を認識し、レシピエントは拒絶反応を開始する。急性拒絶反応はアロ抗原特異的なT細胞の移植片への浸潤により起こる。移植片に浸潤したあと、T細胞は活性化され炎症性サイトカインを放出し移植片を傷害する。しかし、病理学的には様々な型の拒絶反応があり、今日までアロ抗原により活性化されたT細胞が移植片を攻撃する正確な機序は不明のままである。

また、生物学的変化は遺伝子発現により調節されており、細胞内の mRNA の存在と量は細胞の生物学的活動性の指標となる。今日、DNA マイクロアレイの技術により、これらの遺伝子発現の変化をゲノムワイドに捉えることができるようになった。筆者は DNA マイクロアレイ技術 (GeneChip[®], Affymetrix 社製) を用いてマウス心移植における急性拒絶反応時の 13000 個を超える遺伝子および EST (expressed sequence tag) の網羅的遺伝子解析を行った。得られたデータは DNA マイクロアレイの有用性を示すとともに急性拒絶反応の機序解明に新たな知見を与えるものである。

(1) 野生型マウス心移植モデルにおける急性拒絶反応時の網羅的遺伝子解析

まず筆者は MHC のすべて異なる BALB/c H-2^d マウスと C3H/He H-2^k マウスを用い、この同種異系心移植片と C3H/He H-2^k どうしの同種同系移植片における遺伝子発現を比較した。マウス心移植は Corry and co-workers の方法に準じて行った。それぞれ移植前、移植後 1, 3, 5 日で心臓を摘出し RNA を抽出した。10 μ g の total RNA から first-strand cDNA、second-strand cDNA, cRNA を合成し、40 μ g の biotinylated RNA を Affymetrix (Santa Clara, CA) mouse11K arrays (Mu11KsubA, Mu11KsubB)での解析に使用した。

同種異系移植片 (BALB/c to C3H/He) は 8 日から 14 日で拒絶は完了し、拍動を停止した。同種同系移植片はすべて 100 日以上拍動を続けた。移植後 1, 3 日目においては拒絶心 (同種異系移植片) と非拒絶心 (同種同系移植片) との間に細胞浸潤の程度において差異は認められなかった。移植後 5 日目では拒絶心 (同種異系移植片) において血管周囲や間質への瀰漫性単核球浸潤と心筋障害を認めた。同種同系移植片においては拒絶反応の所見は認められなかった。

DNA マイクロアレイ解析において最初に術後 5 日拒絶心 (同種異系移植心) と非拒絶心 (同種同系移植心) における遺伝子発現を比較した (n=3)。発現の閾値を average difference が 50 以上、fold-change が 3.0 以上とした。非拒絶心と比較して 110 個の遺伝子がすべての拒絶心において発現が上昇していた。これらのデータに対しても検定を行い非拒絶

心に比較して拒絶心で有意に発現の上昇している遺伝子を84個同定した ($p < 0.05$)。興味あることに、上位20個の遺伝子の中で14個はIFN γ 誘導遺伝子であった。Migが最も強く発現されており、IGTP, Lmp-2, RANTES, JABの順となった。MHC class I、II遺伝子やその近傍に存在するLMP2, HAM1, 2などの遺伝子も大きく誘導されていた。IFN γ 自身も発現が上昇していた (fold change 68.1)が、IL-2 (fold change 1.1)の遺伝子発現は認められなかった。時系列の解析では、これらの遺伝子は術後3日より発現が上昇していることが示された。術後1、3日目において拒絶心と非拒絶心の遺伝子発現を比較した。術後1日目では免疫グロブリン関連遺伝子が誘導されていた。術後3日目にはIGTPやIrgなどのIFN γ 誘導遺伝子が見られるようになった。最後にDNAマイクロアレイのデータをコンピュータプログラム (*GENECLUSTER*)を使い遺伝子発現パターンを分類した。24個のクラスターに分類されたが、術後1または3日目に拒絶心で発現の上昇している遺伝子群はなかった。DNAマイクロアレイのデータの再現性をノーザンブロットにより確認したが、両者のデータは一致し、データの再現性が確認された。Mig, IGTP, IFN γ 、IP-10はノーザンブロットでも拒絶心において発現が確認されたが、IL-2は発現していなかった。

(2) IFN- γ 欠損マウス心移植モデルにおける網羅的遺伝子解析

野生型マウスにおけるDNAマイクロアレイ解析により多くのIFN- γ 関連遺伝子が急性拒絶反応時に発現が上昇していることが示された。そこで筆者はIFN- γ 欠損マウスにおける移植心での遺伝子発現を解析した。

面白いことに、野生型マウス、IFN- γ 欠損マウスにおける同種異系移植心とも約1週間 (WT: 8.0 ± 0.6 , GKO: 7.2 ± 0.4 , mean \pm SEM)で拒絶された。術後5日目の移植心の組織観察では野生型マウス、IFN- γ 欠損マウスにおける同種異系移植心ともに血管周囲と間質への瀰漫性単核球浸潤が認められ、中等度の急性拒絶反応と診断されたが、両群の組織所見に差異はなかった。前項で野生型マウスにおける拒絶心で非拒絶心と比較して84個の遺伝子が有意に発現が上昇していることを示した。これら84個の遺伝子中68個の遺伝子

は IFN- γ 欠損マウスにおいて発現していなかった。一方、IFN- γ 欠損マウスにおける拒絶心で発現の上昇していた 52 個の遺伝子群を同定した。MCP-1, MIP-1, platelet factor 4, C10 のケモカインを含む 52 個の遺伝子群が IFN- γ 欠損マウスにおける拒絶心で発現が上昇していた。その中で IFN- γ 欠損マウスの拒絶心でのみ発現の上昇している 8 個の遺伝子群が示された。IFN- γ 欠損マウスの拒絶心は多くのケモカイン遺伝子の関与が示されたので、ケモカイン関連遺伝子に注目し非拒絶心、野生型の拒絶心、IFN- γ 欠損マウスにおける拒絶心における発現パターンにより、これらケモカイン関連遺伝子を 3 つのクラスターに分類した。1 つは、IFN- γ 欠損マウスの拒絶心で特異的に発現の上昇している遺伝子群であり、platelet factor 4、C10、SDF-4 などのケモカインを含んでいた。2 つ目は、野生型および IFN- γ 欠損マウスにおける拒絶心で共通に発現の上昇している遺伝子群であり、MCP-1 や MIP1 の遺伝子は野生型および IFN- γ 欠損マウスの両方の拒絶心において強く発現されていた。最後は野生型マウスでの拒絶心でのみ発現の上昇しているケモカイン遺伝子群で、Mig, IP-10、RANTES などのケモカインが含まれていた。この結果は IFN- γ 欠損マウスにおける拒絶では独特のケモカインの遺伝子発現が見られることを示した。

本実験において野生型および IFN- γ 欠損マウスにおけるマウス心移植急性拒絶反応時の独特なトランスクリプトーム解析が示された。野生型においては INF γ が Mig、RANTES などのケモカインや MHC 分子を誘導することで急性拒絶反応と深く関わっていることが示された。IFN- γ 欠損マウスにおいては、IFN- γ 非依存経路による拒絶反応時の独特の遺伝子発現パターンが示され、MCP-1 や MIP-1 を含む一群の遺伝子群は IFN- γ 依存、非依存経路の両方で発現されていることを見出した。更に、DNA マイクロアレイにより従来拒絶との関連が報告されていない多くの新規拒絶関連遺伝子を同定した。急性拒絶反応のゲノムワイドな包括的解析により得た新たな知見は、新規拒絶治療薬開発における非常に重要な基礎的データであると考えられる。