



Title	Gene Expression Profiling of Acute Cellular Rejection in Rat Liver Transplantation Using DNA Microarrays
Author(s)	濱, 直樹
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58244
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【9】

氏 名	濱 直 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 1 0 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 4 月 19 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学 位 論 文 名	Gene Expression Profiling of Acute Cellular Rejection in Rat Liver Transplantation Using DNA Microarrays (DNAマイクロアレイを用いたラット肝移植モデルにおける急性拒絶反応の遺伝子発現プロファイル解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 森 正樹 (副査) 教 授 林 紀夫 教 授 土岐祐一郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

手術手技の向上や免疫抑制剤の進歩に伴い、肝移植は末期肝不全患者に対する標準的な治療法として確立してきた。しかしながら、非特異的免疫抑制剤を投与しても約半数の患者に生じる拒絶反応は、グラフト喪失に関する重大な原因の一つであり、移植医療成功のためには迅速かつ正確な診断を要する。拒絶診断は一般的に肝生検組織の病理学的検索によってなされるが、それだけで全ての病態を鑑別することは困難である。したがって、さらなる診断能力向上のためには、分子生物学的手法を応用した新規の客観的診断方法の確立が望まれる。近年、DNAマイクロアレイは遺伝子発現プロファイル解析ツールとして、様々な研究分野において急速な発展を遂げ、網羅的に多数の遺伝子発現解析を一時期に施行し得る。そこで我々は、ラット肝移植モデルを用い、拒絶反応に関与している可能性が示唆される遺伝子プロファイルを同定することで、急性拒絶反応診断への応用の可能性について検討した。

〔 方 法 〕

1) ラット肝移植モデルの作成とマイクロアレイによる候補遺伝子の抽出
同系 (Lewis-Lewis) および異系 (DA-Lewis) ラット肝移植モデルを作成し、まず移植肝の拒絶反応の成立を組織学的に確認した。同モデルの術後1・3・5・7日目に移植肝および末梢血

を採取し、約11000遺伝子が搭載されたマイクロアレイを用いて、移植肝の遺伝子発現プロファイル解析を行い、両群間で遺伝子発現の異なる遺伝子を抽出した。

2) 移植肝および末梢血における遺伝子発現の評価

移植肝でのマイクロアレイで抽出した遺伝子 (Irf-1, Gbp2, Ly6c, Cd74, Corola) の発現を定量的RT-PCRで確認した。さらに、末梢血での同遺伝子の発現に関しても検討を行った。

3) 障害モデルでの遺伝子発現の検討

これらの拒絶時に上昇する遺伝子は、他の障害モデルでも上昇している可能性がある。LPS投与による敗血症モデルや四塩化炭素投与による薬剤性肝障害モデル、胆管結紮による胆汁鬱滞などの障害モデルを作成し、定量的RT-PCRにて肝および末梢血での遺伝子の発現変動を検証した。

〔 成 績 〕

1) 同系肝移植モデルの全標本および異系肝移植モデルの術後1日目では、明らかな細胞浸潤を認めないが、異系モデルの術後3日目より炎症細胞浸潤や血管内肺炎が出現し、その後経時的に拒絶反応が成立したと考えられた。

移植肝のDNAマイクロアレイによる階層的クラスター解析での検討にて、サンプルは大きく二つのクラスター、すなわち異系モデルの術後3・5・7日目のサンプルとそれ以外に大別された。以上より、病理学的に肝内へ炎症細胞浸潤が生じる拒絶早期の術後3日目での遺伝子変化は、その後の拒絶反応による遺伝子発現の変化を反映している可能性が示唆された。また、同検討により遺伝子発現レベルが3倍以上かつt検定にて $p < 0.01$ を満たす89遺伝子 (高発現39, 低発現50) を同定した。

2) 異系モデルにて低発現となる50遺伝子は、主にアルコール脱水素酵素などの肝細胞で発現する遺伝子が多く含まれた。一方、高発現となる39遺伝子は多くが白血球を発現部位とする免疫応答に関連する遺伝子であった。

高発現群の39遺伝子から選択した、免疫応答やT細胞の分化に関連する5遺伝子 (Irf-1, Gbp2, Ly6c, Cd74, Corola) の移植肝での遺伝子発現は、マイクロアレイでの変化と同様に、異系肝移植モデルで有意に上昇していた。さらに、末梢血でCd74を除いた4遺伝子 (Irf-1, Gbp2, Ly6c, Corola) において、移植肝と同様に高発現となることを確認した。

3) 5遺伝子のうち、3遺伝子 (Corola, Ly6c, Cd74) は他の障害モデルでも肝または末梢血で遺伝子発現の上昇が認められた。他の障害モデルでは上昇が認められず、拒絶反応時にのみ高発現を示した遺伝子はIrf-1とGbp2であった。

〔 総 括 〕

ラット異系肝移植モデルにおいて、DNAマイクロアレイを用いることで、新しく拒絶反応に関与している可能性のあるIrf-1およびGbp2の2遺伝子を同定できた。それらは移植肝のみならず末梢血においても上昇し、biomarkerとして拒絶反応診断の一助になることが期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、異系ラット肝移植モデルにおいて、遺伝子発現変化が拒絶反応の早期段階より始まり、同時期に発現パターンが異なる遺伝子群が、その後の遺伝子発現プロファイルを反映していることを示した。さらにその結果に基づき、グラフト肝のみならず末梢血においてもIrf-1とGbp2の2遺伝子が拒絶反応に強く関与している可能性を示した。現在までに、ラット肝移植モデルにおける移植肝をマイクロアレイを用いて網羅的に発現解析した報告は無く、その功績は非常に高い。現在、急性拒絶反応の診断は、肝生検という侵襲的な方法でなされるが、しばしば鑑別診断困難なことも多く、その診断の一助としてIrf-1とGbp2がbiomarkerとして有用である可能性を示した本研究は、学位の授与に値すると考えられる。