

Title	Identification of Novel and Noninvasive Biomarkers of Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation by Protein Microarray
Author(s)	大久保, 恵太
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61596
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	大久保 恵太
論文題名 Title	Identification of Novel and Noninvasive Biomarkers of Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation by Protein Microarray (タンパク質マイクロアレイによる肝移植後急性拒絶反応の非侵襲的な新規バイオマーカーの同定)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>免疫抑制剤の開発や手術手技の向上により、臓器移植は非可逆的臓器不全に対する治療法として確立されつつある。しかし肝移植手術の1年生存率は約80%といまだに低く、移植グラフト障害の主要因の一つである急性拒絶反応の発生頻度は30-70%と高率である。現在、肝移植において急性拒絶反応は肝生検によって診断されるが、肝生検は侵襲性が高い上に病理所見のみ確定診断することは難しいため、非侵襲的で的確かつ早期に拒絶反応を診断するバイオマーカーが望まれている。そこで我々は抗原抗体反応によって発現が増幅される自己抗体に着目し、タンパク質マイクロアレイの中で自己免疫疾患や癌の診断に有用な自己抗体の発見に近年使用されているヒト自己抗体マイクロアレイを用いて、肝移植後の急性拒絶反応に特異的なバイオマーカーを同定すること (seromics解析) を目的とした。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>まず急性拒絶反応に特異的なバイオマーカーのスクリーニングとして、対象を原因疾患として最多であるC型肝硬変に対する肝移植症例とした。肝生検により病理学的に急性拒絶反応 (Acute Cellular Rejection: ACR) と診断した3例をACR群とし、対照群として術前 (Pre-op群)、術後28日目 (no-ACR Day28群)、術後1年目 (no-ACR 1year群) および健常人のそれぞれ3例と比較した。これらの血清を用いて自己抗体マイクロアレイ: ProtoArray®(invitrogen社) にて網羅的に自己抗体の発現を解析した。9000種類の自己抗体の発現量をACR群と各対照群で比較したところ、ACR群で2倍以上に上昇していた自己抗体を、no-ACR Day28群で201個、no-ACR 1year群で188個、Pre-op群で185個、健常人で218個認めた。このうち、各対照群のいずれの群よりもACR群で2倍以上に発現量が上昇していた自己抗体は57種類であった。この57種類の自己抗体より急性拒絶反応の有用なバイオマーカーを選出するために、Fold Change (倍率比較) に加えて各抗体のシグナル強度を加味して解析するweighted average difference ranking法(WAD ranking法)を用いた。これにMann-Whitney U検定による比較検討を追加し、拒絶の診断に有効と考えられる自己抗体(chromatin modifying protein 2B (CHMP2B), potassium channel tetramerisation domain containing 14 (KCTD14), potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 3 (KCNA3), triosephosphate isomerase 1 (TPI1))を選出した。CHMP2Bはユビキチン関連反応に関わるとされ、KCTD14, KCNA3はカリウムチャネルに関与する酵素で、TPI1は解糖系酵素の一つとされている。これらの自己抗体の対象となる抗原が肝細胞内および血液中に存在することを、正常肝とリンパ球のcDNAを用いてqRT-PCR法により確認した。次にマイクロアレイの結果を検証するvalidationとして、肝移植後に肝生検による病理学的診断と臨床経過から急性拒絶反応と診断された20例を拒絶群とし、対照群として急性拒絶反応以外の原因で肝障害・肝機能低下を認めた20例、肝移植後安定期の20例および健常人20例の血清を用いて、候補となる自己抗体の発現をELISA法にて比較検討した。その結果CHMP2B, TPI1の自己抗体は、全ての対照群と比較して拒絶群で有意に上昇していた。次にROC曲線よりAUCを算出したところ、特にCHMP2Bは感度、特異度が高く急性拒絶反応を診断するバイオマーカーとして有用であると考えられた(AUC=0.8613, 95%CI=0.7496 to 0.9729)。最後に、急性拒絶反応と診断された症例のうち、拒絶反応前後の血清が時系列的に保存されている症例を用いてCHMP2BおよびTPI1の抗体価の推移を検討すると、それぞれの抗体価は急性拒絶反応時に上昇し治療後に低下を認めた。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>自己抗体マイクロアレイという新しい手法を用いて肝移植後の急性拒絶反応時に上昇する57種類の自己抗体を同定し、その中よりCHMP2BおよびTPI1が急性拒絶反応を非侵襲的に診断するバイオマーカーとなる可能性を見出した。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 大久保 恵太

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授 森 正 樹
	副 査	大阪大学教授 和田 尚
	副 査	大阪大学教授 竹原 敏 伸

論文審査の結果の要旨

本研究では、自己抗体マイクロアレイという新規的手法を用いて、肝移植後のグラフト機能不全に直結する急性細胞性拒絶反応を非侵襲的かつ的確に診断するバイオマーカーの同定を試みたものである。その結果、各対照群と比較して肝移植後の急性拒絶反応患者で有意に上昇する57種類の候補自己抗体を同定し、その中でCHMP2BおよびTPI1の自己抗体が有用なバイオマーカーとなりうることを検証実験にて明らかにした。本研究によって得られたバイオマーカーは感度・特異度ともに高く有用であると考えられた。現在急性拒絶反応の診断には、侵襲的で確定診断の難しい肝生検による病理検査が必要であるが、本研究で同定したバイオマーカーを用いることにより、肝移植後の急性拒絶反応を的確かつ早期に発見できる可能性が広がり、肝移植治療の成績向上に対して多大な貢献が期待できる。よって、本論文は学位の授与に値すると考えられる。