



Title	SYT17(Synaptotagmin17)の腎移植後慢性拒絶反応に対する新規尿中バイオマーカーとしての研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	高田, 祐輔
Description	配架番号 : 2540
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14075号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78289
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Takada_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 高田 祐輔

学 位 論 文 題 名

SYT17(Synaptotagmin17)の腎移植後慢性拒絶反応に対する新規尿中バイオマーカーとしての研究
(Study on SYT17 <Synaptotagmin 17> as a novel urinary biomarker in chronic rejection after kidney transplantation)

【背景と目的】

腎移植は、他人から提供された腎臓を末期腎不全患者へ移植することで腎機能を回復させる唯一の根治療法である。腎移植患者は、透析療法にくらべて高い QOL (Quality of life) を享受することができる。免疫抑制剤や医療技術の発達によって、今日の移植腎生着率は飛躍的に改善している。しかし、近年においても移植腎機能廃絶の原因の 25%が、慢性拒絶反応である。このうち、ドナー特異的抗体 (Donor Specific Antigen : DSA) が新規に出現することで発症する、慢性活動性抗体関連型拒絶反応 (Chronic Active Antibody Mediated Rejection : CAAMR) が特に問題である。だが進行機構が不明であるために、有効なバイオマーカー・治療方法が存在しない。

分子神経免疫学教室は、非免疫細胞における NFκB (Nuclear Factor-kappa B) と STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) の同時活性化により、炎症性サイトカインが相乗的に発現される機構を報告している。この機構は炎症アンプ (Inflammation Amplifier) と命名され、炎症疾患の形成に重要であると考えられる。CAAMR は、DSA に端を発する移植腎で起きる炎症性疾患と予想される。

そこで、本研究では炎症アンプに関わる遺伝子の中から、CAAMR にも関与する遺伝子を同定し、新規バイオマーカーおよび治療ターゲットの発見を目的とした。

【方法と結果】

候補遺伝子の選定として、3 種類のヒト腎細胞株を用いて RNA シーケンスを行った。IL-6 と、IL-17 またはより強力に NFκB を誘導する TNFα によって、「炎症アンプ」を刺激し、反応が高く、腎疾患との関連が報告されていない 5 遺伝子を対象とした。それぞれの 5 遺伝子を siRNA (small interfering RNA) によりノックダウンして、炎症性サイトカインの発現抑制の程度をリアルタイム PCR で評価した。炎症性サイトカインの抑制効果が強ければ、その遺伝子は炎症アンプをより強く抑制する力を持つことを間接的に測定可能である。この結果、最も強い抑制効果を示した SYT17 (Synaptotagmin17) を候補とした。実際に、SYT17 を過剰発現させた HEK293T 細胞では NFκB と IL-6 の発現活性が高まった。これらのデータは、SYT17 が炎症アンプの正のレギュレーターとして働いていることを示す。

SYT17 と CAAMR の関連を、北海道大学病院泌尿器科に通院中の腎移植患者および健常ボランティアからサンプルを採取して評価した。腎移植患者からは定期腎生検の際にサンプルを採取し、腎生検の結果をもとに 4 群 (NED=normal histology : 正常病理組織群、IF/TA=Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy : 線維化群、CNI-T=Calcineurin Inhibitors Toxicity : 薬物毒性群、CAAMR) に分け検討を行った。

はじめに、移植腎での SYT17 の発現を確認するために、移植腎生検サンプルを用いて免疫染色を行った。各群 6 例ずつ染色して、発光強度を ImageJ により数値化して統計解析を行った。CAAMR 群のみで、統計学的有意差をもって、SYT17 が強く発現していることが分かった (NED:0.08±0.07, IF/TA:0.83±0.39, CNI-T:0.80±0.93, CAAMR:8.85±2.09, $p<0.01$)。

次に、SYT17 が CAAMR 診断のバイオマーカーとして使用できるのかを検討した。CAAMR の診断には尿・血液・腎生検検体が有用なサンプルである。このうち尿が、最も低侵襲に採取できるため、尿中バイオマーカーとなる可能性を検討した。まず、尿サンプルに何も処理を加えずに Whole urine の状態で評価を行った。Whole urine の状態では、SYT17 タンパク質の測定が困難であった。その一方で、尿中エクソソームを抽出して評価したところ、CAAMR 症例のサンプルで SYT17 タンパク質の強発現が確認された。エクソソームの内在性コントロールとして CD9 を用いた。尿の希釈などの影響のためサンプル毎でエクソソームの回収量は異なるため、1 つのエクソソーム当たりの CD9 の発現量が一定であるという仮定のもとで、SYT17 の発現量の比較には SYT17/CD9 比を用いた。検討症例数を増やした結果、CAAMR 群のみで、統計学的有意差をもって、SYT17/CD9 比の高値を認めた (healthy:0.12±0.09, NED:0.13±0.17, IF/TA:0.22±0.35, CNI-T:0.40±0.35, CAAMR:1.34±1.05, $p<0.01$)。ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線では、AUC (area under the curve) は 0.82 の結果であった。

【考察】

炎症アンプに関連する遺伝子から SYT17 を候補とした。尿中エクソソームを抽出することで、実際の腎移植患者サンプルを用いて、CAAMR 群と他群の区別を行うことが可能であった。

現在臨床で使用している検査値には、NAG (N-acetyl- β -D-glucosaminidase)、尿蛋白、eGFR (estimated glomerular filtration rate : 推算糸球体濾過量) がある。これらの検査の中で、CAAMR 群と他群の有意差を示すことができるものはなかった。加えて、SYT17 との間で、有意な相関関係を認めるものもなかった。これらの結果から、現在の検査では診断ができない CAAMR を、SYT17 による検査であれば発見できるという新規性があると考ええる。

【結論】

尿中エクソソーム内の SYT17 蛋白質は CAAMR の新規診断バイオマーカーとなる可能性を持つ。