HOKKAIDO UNIVERSITY

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［全文の要約］
Author(s)	高田, 祐輔
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2540 他
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/2115/78290
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Takada_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

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)

2020 年 3 月

高田　祐輔

学位論文（要約）

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)

2020 年 3 月

高田　祐輔

【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 を享受することが可能である。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。その一方で、近年になってもなお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。DSA とは移植腎に特異的に反応する抗体であり、早期の微小な炎症を契機に出現すると考えられている。CAAMR の進行機構は、現在も不明であるために、有効なバイオマーカーが存在しなく、治療戦略も確立されていない。さらに、現在の診断基準では、患者にとって侵襲的な腎生検が必須である。以上から、CAAMR の病勢を鋭敏に反映する低侵襲バイオマーカーは、早期診断を可能として、移植腎への長期生着へ多大な貢献をもたらすと期待される。

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。実際に、関節リウマチや肺移植後拒絶反応において、実験モデルおよび患者検体で炎症アンプの関与が確認された。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（Synaputotagmin17）を候補とした。実際に、SYT17 を過剰発現させた HEK293T 細胞では NF κ B 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。検査値に異常を認めた際に行うエピソード腎生検の際の検体は、除外した。

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、$p<0.01$)。腎組織内での発現は、尿細管細胞に局在していた。

次に、SYT17 が CAAMR 診断のバイオマーカーとして有用であるのかを検討した。CAAMR の診断には尿・血液・腎生検サンプルが用いられる。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が、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 タンパク質の強い発現が確認された。CD9 をエクソソームの内在性コントロールとして用いた。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ってしまう。そこで、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】

SYT17 は、in vitro の実験から炎症アンプの正のレギュレーターの役割を持っていることが分かった。腎組織内では、CAAMR 患者の尿細管細胞に認められた。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バイオマーカーには、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。これらの中で、CAAMR 群と他群の間で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 であれば発見・診断できるという新規性があると考える。

【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。