



Title	腎移植の慢性抗体関連拒絶における新規尿中診断バイオマーカー、治療ターゲットORM1についての研究
Author(s)	樋口, はるか
Description	配架番号 : 2401
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13022号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13022
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88837
Type	doctoral thesis
File Information	Haruka_Higuchi.pdf



学 位 論 文

腎移植の慢性抗体関連拒絶における新規尿中診断
バイオマーカー、治療ターゲット ORM1 についての研究

(Urinary ORM1 as a noninvasive biomarker and a
therapeutic target for chronic active antibody mediated
rejection in kidney allograft)

2018年3月

北 海 道 大 学

樋口 はるか

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	6 頁
実験方法	7 頁
実験結果	11 頁
考察	27 頁
総括および結論	30 頁
謝辞	31 頁
引用文献	32 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は、以下の論文に投稿中である。

1. Higuchi H., Jiang J., Kamimura D, Arima Y., Atsumi T., Iwami D., Hotta K., Takada Y., Kanno-Okada H., Hatanaka C.K., Harada H., Shinohara N., Murakami M.
Orosomucoid1 is a urinary biomarker and therapeutic target for chronic active antibody-mediated rejection in kidney allograft
Journal of Clinical Investigation

本研究の一部は、以下の学会に発表した。

1. HIGUCHI Haruka, BANDO Hidenori, JINAG Jing-Jing, MENG Jie, SABHARWAL Lavannya, NAKAGAWA Ikuma, OTA Mitsutoshi, , ATSUMI Toru, ARIMA Yasunobu, KAMIMURA Daisuke, IWAMI Daiki, MORITA Ken, SHINOHARA Nobuo, MURAKAMI Masaaki
Elavation of Inflammation Amplifier In Renal Transplantation Graft
第44回日本免疫学会学術集会 2015.11.18-20 札幌
2. Haruka Higuchi, Hidenori Bando, JIANG Jing-Jing, Toru Atsumi, Daiki Iwami, Ken Morita, Nobuo Shinohara, and Masaaki Murakami
Inflammation Amplifier, a Chemokine Inducer in Non-Immune Cells in Kidney Transplantation Graft
American Transplant Congress 2016 2016.6.11-6.15 Boston, USA
3. 樋口 はるか、岩見 大基、堀田 記世彦、村上 正晃、篠原 信雄
移植腎における炎症アンプの活性化
第52回日本移植学会総会 2016.9.29-10.1 東京
4. HIGUCHI Haruka, JIANG Jing-Jing, KAMIMURA Daisuke, NAKAGAWA Ikuma, OTA Mitsutoshi, FUJITA Munezumi, HIRATSUKA Shigeto, TANAKA Yuki, OKAWARA Momoko, ATSUMI Toru, ARIMA Yasunobu, SHINOHARA Nobuo, MURAKAMI Masaaki
RNE1, which is induced after cytokine-mediated NF- κ B activation, is a potential biomarker and therapeutic target for kidney inflammation

第 45 回日本免疫学会学術集会 2016. 12. 5-7 沖縄

5. Haruka Higuchi, Daiki Iwami, Kiyohiko Hotta ,Nobuo Shinohara, and

Masaaki Murakami

Activation of Inflammation Amplifier in Kidney Graft and Urinary
Biomarker for Chronic Rejection

American Transplant Congress 2017 2017. 4. 29-5. 3 Chicago, USA

6. Haruka Higuchi, Daiki Iwami, Kiyohiko Hotta ,Nobuo Shinohara, and

Masaaki Murakami

The Activation of Inflammation Amplifier in Kidney Transplant Graft
and Urinary Biomarker for Chronic Rejection

American Urological Association 2017 2017. 5. 12-16 Boston, USA

緒言

腎移植とは末期腎不全に対する腎代替療法の選択肢のひとつである。U. S. Renal Data System (2013) (<https://www.usrds.org/>) のデータによると、腎移植治療を受けた患者の生命予後は透析患者に比べて優位に優れていると報告している。免疫抑制剤の開発と進歩により臓器移植後の成績が著明に向上してきた。特に、腎移植においては、1978年に cyclosporine、1990年に tacrolimus などの calcineurin inhibitor (CNI) の開発があり、1999年に代謝拮抗薬である mycophenolate mofetil、2002年に IL-2R に対するモノクローナル抗体である basiliximab が開発された。これらの新たな導入免疫抑制剤により、前時代と比較して移植腎生着率の目覚ましい改善を認めている。免疫抑制剤の発展により移植腎生着率が延長した一方で、移植後は半永久的な免疫抑制剤の内服が必要であり、免疫抑制と日和見感染のバランス、腎毒性、悪性腫瘍などが免疫抑制剤内服の大きなリスクとなっている¹。また、移植腎の急性拒絶の多くは治療可能になってきたものの、慢性抗体関連拒絶反応 (chronic active antibody mediated rejection: CAAMR) の治療については十分な薬物療法が確立されておらず、移植腎喪失の原因となっている²⁻⁵。

拒絶反応は大きく T リンパ球の反応で引き起こされる T 細胞関連型拒絶反応とドナーに対する抗体によって引き起こされる抗体関連型拒絶反応に分類される。前述の様に免疫抑制剤の発達により T 細胞関連型拒絶反応は制御可能となって来たため短期の移植腎生着率は向上した。しかしながら、現在の免疫抑制剤でも抗体関連型拒絶反応の制御は未だ不十分であり、特に慢性期に発症する CAAMR に対しての治療法はない。発症の原因は de novo の抗ドナー抗体の出現により、慢性的な血栓形成、炎症、その修復に伴い組織障害を起し、血管内皮障害、抗原抗体複合体の基底膜沈着・糸球体硝子化などにより腎機能が低下すると考えられている。CAAMR の診断は腎生検によって慢性移植腎機能障害を示す動脈内膜の線維性肥厚、糸球体基底膜の二重化が証明され、患者の血液中に抗ドナー抗体の存在が証明されれば確定診断に至る。傍尿細管血管への C4d 陽性所見でかつては診断されていたが、補体非依存的な抗体関連型拒絶反応、血液型不適合移植などでみられる C4d の非特異的な陽性所見が認められ、C4d 陰性の抗体関連型拒絶反応が認識されるようになり、Banff Classification 2013⁶からは必須条件ではなくなった。臨床的には血清クレアチニン値の上昇、蛋白尿、高血圧などを呈し、進行性に腎機能が低下する。CAAMR の問題点は血清クレアチニン値の上昇や尿蛋白陽性などの臨床所見がないにも関わらず、組織学的な変化を来す場合があることである。診断の gold standard は移

植腎生検であるが⁷、病理学的な変化を一度来してしまうと、有効な治療がなく、現状では不可逆な障害であるため腎機能の改善は見込めない。よって、CAAMRを早期に、可能であれば発症前に診断する方法の確立が望まれる。

炎症反応は様々な疾患の発症に重要な役割を果たしている。当研究室ではこれまでに、局所における慢性炎症誘導の分子基盤として、線維芽細胞・血管内皮細胞などの非免疫細胞において、NF- κ B経路とSTAT3経路の同時活性化によりIL-6、ケモカインなどの炎症性メディエーターの発現・産生が相乗的に増加し、臓器特異的な慢性炎症性疾患や自己免疫性疾患の病態形成の起点となることを見出し、Inflammation amplifier (炎症アンプ、IA)と命名した^{6,7}。この機構の活性化後に発現する主な機能分子はケモカインや成長因子であり、免疫細胞の局所集簇と局所細胞の増殖により病巣局所の恒常性が保たれなくなることであり、IL-6はSTAT3の活性化を維持する燃料のような役割を果たしている⁸。また、臨床検体組織やいくつかの疾患モデルにおける細胞で、IAが活性化されており、この活性化をブロックすることにより疾患モデルにおける炎症を抑制することが報告されている^{6,8-12}。さらに、IAの活性化がヒト肺移植の慢性拒絶組織およびマウスの慢性拒絶モデルの発症に重要であることを見出された^{13,14}。また、当研究室では約16,000遺伝子を標的としたshRNAライブラリを用いたゲノムワイドスクリーニング解析を行い、IAを正に制御する1,000以上の遺伝子群、及び炎症回路の標的となる500以上の遺伝子群をそれぞれこの機構の制御遺伝子、標的遺伝子として同定している。更にこれらの遺伝子群の中には、実際に多くのヒト慢性炎症性疾患の関連遺伝子が含まれることをreverse direction法により証明している⁸。この遺伝子のひとつにORM1(オロソムコイド-1, α 1-アシドグリコプロテイン1)が存在した。

ORM1は炎症の際に増加する急性期の血漿タンパク質で炎症や悪性腫瘍で上昇する¹⁵。肝臓がORM1の主な産生臓器であるが、内皮細胞や腫瘍細胞からも産生される¹⁶。血清中で薬物と結合する輸送蛋白としての機能が報告されているが^{17,18}、正確な機能は特定されていない。ORM1は悪性疾患の予後予測因子となるという報告や¹⁹、心不全、関節リウマチ、膀胱癌などいくつかの疾患の尿中での上昇することが報告されているが²⁰⁻²²、尿中で検出される機序については全く明らかにされておらず、移植に関連した報告もない。そこで尿中ORM1の検出はCAAMRの診断において、非侵襲的な診断バイオマーカーになり得る可能性があり着目した。

これらの背景から、今回、炎症アンプの活性化のCAAMRへの関与を明らかにし、CAAMRの新たな診断および治療標的となりうる分子を同定、機能解析を行うことを目的として本研究を行った。

本研究により、ヒト腎臓の非免疫系細胞でIAが活性化されることがはじめて

明らかとなり、CAAMRの腎組織でNF- κ B経路とSTAT3経路が活性化されていることが明らかとなった。さらにこの炎症機構が活性化された腎臓の尿細管細胞ではORM1が活性化しており、CAAMR患者の尿中でもORM1が上昇していることを発見した。また、試験管内の結果から、ORM1はIAの標的分子であるとともにIAの活性化を増強し、自己のポジティブフィードバック系において炎症を制御していることがわかった。実際に、マウス炎症モデルでORM1の局所投与は病態を悪化させた。これらの結果から、尿中ORM1の測定がCAAMRの新規の診断バイオマーカーになり得ること、移植腎におけるIAの活性化に関与するORM1を標的とした治療の可能性が見出された。

略語表

ATMR	acute T cell mediated rejection
CAAMR	chronic active antibody mediated rejection
CHRDL2	chordin Like 2
DSA	donor-specific antibody
eGFR	glomerular filtration rate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EXOC3L2	exocyst complex component 3 like 2
HKF	human kidney fibroblasts
HRMC	human renal mesangial cells
HRGEC	human renal glomerular microvascular endothelial cells
IFTA	interstitial fibrosis and tubular atrophy
IA	inflammation amplifier
LINGO3	leucine rich repeat and Ig domain containing 3
NAG	N-acetyl- α -D-glucosaminidase
ORM1	orosomucoid1
Pp65	phosphorylated p65
ROC	receiver operating characteristic
RPTEC	renal proximal tubule epithelial cells
RT-PCR	real time quantitative polymerase chain reaction
UTP	urinary total protein

実験方法

対象

2015年11月～2017年1月の期間に移植腎生検を施行した移植患者の血清と尿を北海道大学病院および市立札幌病院で収集した。全ての患者が移植手術後3か月以上経過していた。顕微鏡的血尿（5RBC/HPF以上）、尿路感染、重篤な急性感染症、悪性疾患のある患者は除外した。明らかな疾患のない健常ボランティア10名の尿を健常コントロールとした。尿検体は4℃で1500g 5分間、血液は4℃で3000g 10分間遠心し、上清を-80℃で保存して実験に用いた。また移植患者の臨床データ（血清クレアチニン、CRP、尿蛋白、尿アルブミン、尿中N-acetyl- α -D-glucosaminidase : NAG、glomerular filtration rate : eGFR）を分析した。また、ヒト尿検体からMagCapture Exosome Isolation Kit PS (Wako, Tokyo, Japan)を用いてexosomeを抽出した。移植腎生検組織、腎癌の摘出腎、摘出した移植腎のパラフィン包埋切片を免疫染色に用いた。

本研究は北海道大学病院の倫理委員会 (No. #014-0391) と市立札幌病院の倫理委員会 (H29-056-405) の承認を得て患者へ説明を行い、書面での同意を得ている。病理学的評価は北海道大学病院においてBanff Classification 2013²³に基づいて診断された。

関節炎モデルマウスにおける関節炎誘導実験

サイトカイン刺激により関節炎が誘導されるF759マウスを用いた^{8,10,24,25}。実験は北海道大学動物実験に関する規程に基づいたプロトコールで実施された。この実験ではORM1の炎症への影響をみるために、通常関節炎を起こさない低用量(10 ng)のIL-6 (Toray Industries, Tokyo, Japan) とIL-17 (PeproTech, Rocky Hill, NJ)を関節に注射し、さらにORM1として10 μ g のヒト血清 α 1 acid glycoprotein (Sigma Aldrich, St. Louis, MI) をdays 0、1、2にF759マウスの関節に注射した群としない群を比較した。関節炎の重症度は炎症による関節の硬直度によってscore化した^{8,10,24,25}。

細胞調整と刺激

マウスの非免疫細胞としてI型コラーゲン陽性細胞 (BC1) を培養して用いた。ヒト腎細胞として以下のヒト初代培養細胞を用いた：近位尿細管上皮細胞 renal proximal tubule epithelial cells (RPTEC, CC-2553, Lonza, Switzerland)、糸球体血管内細胞 human renal glomerular microvascular

endothelial cells (HRGEC, ACBRI128, Cell Systems, Kirkland, WA)、ヒト腎線維芽細胞 human kidney fibroblasts (HKF, H-6016, Cell Biologics, Chicago, IL)、メサングウム細胞 human renal mesangial cells (HRMC, #4200, ScienCell, Carlsbad, CA)。これらのヒト腎細胞は 96-well plates (1×10^4 cells/well) で培養し、BC1 細胞は starvation 後に human IL-6 (100 ng/ml; Toray Industries, Tokyo, Japan)、human soluble IL-6R- α (100 ng/ml; PeproTech)、human IL-17A (50 ng/ml; PeproTech)、TNF- α (50 ng/ml; PeproTech) で 3、6、24 時間刺激した。Soluble IL-6R α は、非免疫細胞では通常 IL-6 signal-transducing receptor subunit gp130 のみを発現するため加えた。

Real time quantitative polymerase chain reaction

7300 fast RT-PCR system (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) と SYBR Green PCR master mix (Kapa Biosystems, Woburn, MA) を用いて mRNA を定量した。細胞からの total RNA は RNA extraction kit と DNase I (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) を用いて抽出した。RT-PCR に用いた PCR プライマーの配列は下記の表 1 の通りである。RT-PCR は 40 cycles、94° C、15 秒、40 cycles、60° C、60 秒の条件で行った。Human の mRNA の発現量は GAPDH で、mouse の mRNA は hprt で補正した。

表 1 RT-PCR で用いたプライマー配列

Gene	Sequence
<i>human GAPDH</i>	5' - GAGTCAACGGATTTGGTCGT - 3' 5' - CGCTCCTGGAAGATGGTG - 3'
<i>human IL-6</i>	5' - GGTACATCCTCGACGGCATCT - 3' 5' - GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC - 3'
<i>human CCL2</i>	5' - CAGCCAGATGCAATCAATGCC - 3' 5' - TGGAATCCTGAACCCACTTCT - 3'
<i>human ORM1</i>	5' - CAACTGGGAGAGTTCTACGAAGC - 3' 5' - CTTCTCCAGTGGCTCACACTTATC - 3'
<i>mouse Hprt</i>	5' - GATTAGTCGATGATGAACCAGGT - 3' 5' - CCTCCATCTCCTTCATGACA - 3'
<i>mouse Il-6</i>	5' - AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA - 3' 5' - GAGGATACCACTCCCAACAGACC - 3'
<i>mouse Lta4h</i>	5' - GAGGTCGCGGATACTTGCTC - 3' 5' - TTTTGTGTCCAAAGTCAGGCT - 3'

Western Blotting 法

ヒト尿検体から抽出した尿 Exosome を SDS-PAGE (Wako, Tokyo, Japan) 後に polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, Billerica, MA) に転写した後以下の抗体 : rabbit anti-CHRD2 ポロクローナル抗体 (Sigma-Aldrich)、rabbit anti-EXOC3L2 ポリクローナル抗体 (Sigma-Aldrich)、mouse anti-ORM1 モノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich)、goat anti-LINGO3 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) を用いてタンパク質を検出した。

ORM1 の測定

ヒト尿中の ORM1 は Human α 1-Acid Glycoprotein ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いて酵素結合免疫吸着法 (ELISA) で測定し、尿中クレアチニンで補正した。血清 ORM1 は免疫比濁法 (LSI Medience Corporation, Sapporo, Japan) で測定した。

Mouse IL-6 の測定

BC1 細胞を 96 well plate に播き (1×10^4 cells/well) 一晚培養後、human IL-6 (100 ng/ml) /human soluble IL-6R- α (100 ng/ml)、mouse IL-17 (50 ng/ml)、TNF- α (50ng/ml) で刺激後、培養上清を回収しマウス IL-6 Elisa kit (BD Biosciences, Tokyo, Japan) により IL-6 濃度を測定した。上清回収後の培地に DMEM で希釈した MTT を添加し 3 時間後に培地を除去後、DMSO により発色させマイクロプレートリーダーで細胞数を測定した。

ShRNA、Human small interfering RNAs による遺伝子抑制

BC1 細胞に shRLTA4h に対する ShRNA (Sigma-Aldrich) と non target shRNA (Sigma Mission SHC002V) を有するレンチウィルスの培養上清を添加、LTA4h ノックダウン細胞、mock 細胞を作成した。また、ORM1 に対する Small interfering RNAs (siRNAs) (Sigma-Aldrich) と non-target control (Sigma Mission SIC-001s; Sigma-Aldrich) を 96well に培養した RPTEC (1×10^4 cells/well) に Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific, Kanagawa, Japan) を用いて導入して 24 時間培養し ORM1 のノックダウン細胞、コントロール細胞を作成した。これらの細胞を 2 時間 starvation した後 human IL-6 (100 ng/ml) と IL-6R- α (100 ng/ml) または IL-17A (50 ng/ml) で 3 時間刺激し、mRNA を抽出して RT-PCR を行った。

共焦点顕微鏡による p65 の核内移行実験

不死化処理したRPTEC をIL-6 (100 ng/ml) とhuman soluble IL-6R- α (100 ng/ml)、recombinant ORM1 (1,000 ng/ml)単独、またはIL-6とORM1、TNF- α (10 ng/ml) で30分間刺激した。刺激した細胞はCytotfix solution (Cytotfix/Cytoperm kit, BD Biosciences, San Jose, CA)で20分間処理し、Perm/Wash solution (Cytotfix/Cytoperm kit)で洗浄後rabbit anti-p65 (1:50) で1時間処理した。2次抗体としてanti-rabbit Alexa Fluor 546-conjugated secondary Ab (1:200) 、核をHoechst 33342 (1:10,000) で1時間染色し、共焦点顕微鏡 LSM5 Pascal system (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)で観察した。P65の局在が核内>細胞質にみられる細胞の数を計測した。

免疫染色

摘出した腎癌の正常部分、摘出移植腎、移植腎生検組織の連続切片を rabbit anti-STAT3 pY705 (1:200, Cell Signaling Technology, Danvers, MA)、rabbit anti-phospho NF- κ B p65 Ser276 (1:400, Sigma Aldrich)、rabbit anti-ORM1 prestige antibodies HPA046438 (1:500, Sigma Aldrich) 、control IgG (Cell Signaling Technology)で免疫染色した。二次抗体として control rabbit IgG Elite ABC kit と ImmPACT DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いて染色した。

統計学的解析

GraphPad Prism 5 (Graphpad Software, Inc., La Jolla, CA)を用いて Student *t* (two-tailed), ANOVA と Bonferroni による多重比較を行った。*p* 値 <0.05 を統計学的有意差ありと定義した。

実験結果

腎組織の免疫染色とターゲット遺伝子の検索

組織染色による IA の活性化は p65 とリン酸化 STAT3 の両方が陽性である場合にその組織で IA が活性化されていると評価する^{13,14}。そのため最初に、腎癌のため摘出した腎臓の正常部分と、感染などの理由により摘出した移植腎をリン酸化 p65 (pp65)、リン酸化 STAT3 で染色し、ヒト腎組織がこれらの抗体によって染色できるかを確認した。ヒト腎組織はこれらの抗体で染色することが可能であることが確認できた (図 1-1)。

当研究室では過去にゲノムワイドスクリーニング解析を行い、炎症アンプを正に制御する 1000 以上の遺伝子群を同定しているが⁸、この中から加水分解酵素 Leukotriene A4 Hydrolase (LTA4h) という遺伝子を選択して炎症アンプへの関与を再検証した。LTA4h はロイコトリエン A4 をロイコトリエン B4 に変換し、またアミノペプチダーゼとしても働く 2 機能酵素で、アラキドン酸の代謝に関与しており²⁶、結核や HIV 感染との関連が報告されている^{27,28}。マウスの非免疫細胞である BC1 細胞を IL-17、IL-6、TNF- α で単独または組み合わせて刺激すると、IL-6 や IL-17 の単独刺激に比較して IL-6 と IL-17 で共刺激した場合に IL-6 などのサイトカインの産生が強くみられ、これが IA の細胞モデルである (図 1-2 A)。

IA の活性化刺激で BC1 細胞で IL-6 の発現がみられ (ELISA、図 1-2-B)、LTA4h を shRNA を用いてノックダウンした BC1 細胞に IL-17、IL-6、TNF- α の刺激を与えると、IL-6 の産生は抑制され、LTA4h は炎症アンプを正に制御する遺伝子である可能性を確認できた (図 1-2-C)。RT-PCR でも LTA4h のノックダウンにより IL-6 の発現が抑制されることを確認したが、BC1 での mock の IA 刺激による反応は弱かった。RT-PCR は定量結果、実験結果の再現性が安定しなかったが、細胞数の調整などの工夫を重ねて、実験手技が安定した。しかしながら、LTA4h と移植腎の CAAMR との関連、診断のバイオマーカーとなり得る分子であることを証明することができなかった。

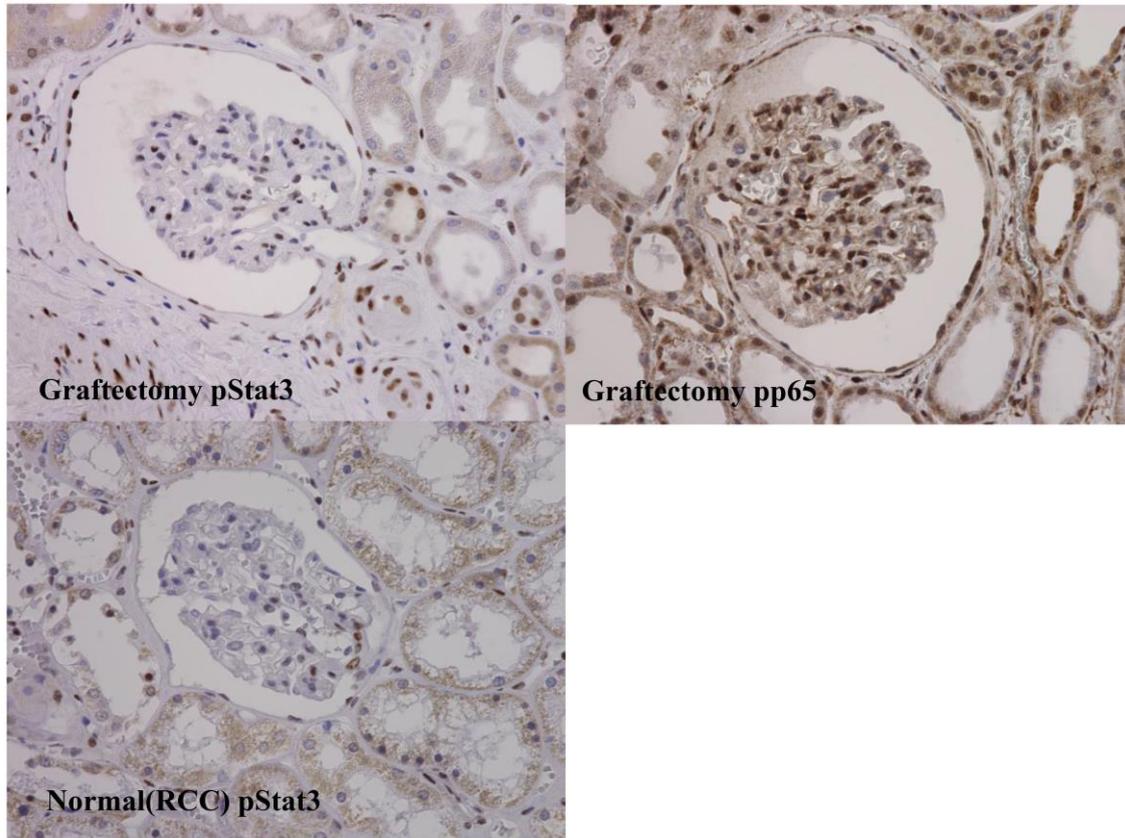
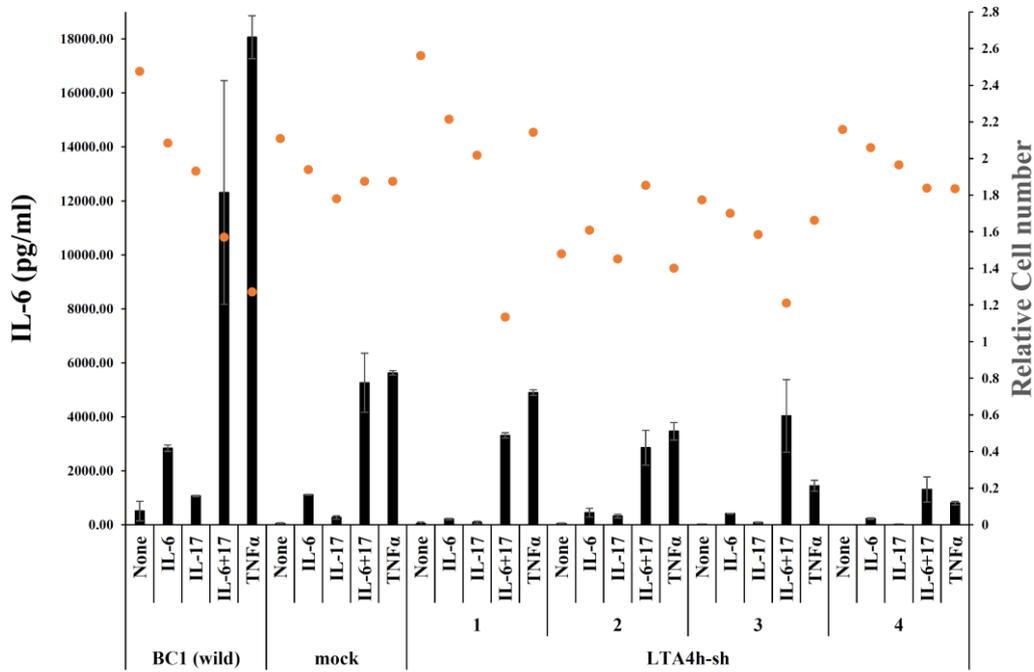


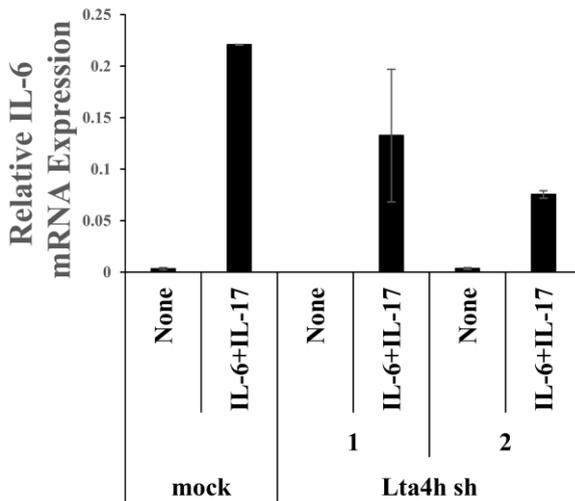
図 1-1 腎組織の免疫染色

摘出した移植腎と腎癌の正常部位をリン酸化 STAT3、pp65 で免疫染色し、腎臓が染色されることを確認した。左上：移植腎リン酸化 STAT3、右上：移植腎 pp65、左下：腎癌正常部位リン酸化 STAT3、pp65。

A



B



C

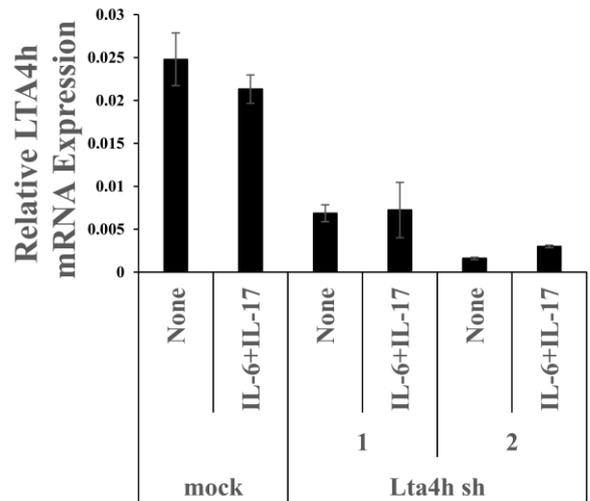


図 1-2 BC1 細胞のノックダウン実験

BC1 細胞を shRNA でノンターゲット遺伝子 (mock)、LTA4h をノックダウンし、IL-6、IL-17、TNF- α で刺激して、ELISA(A)で IL-6、RT-PCR で IL-6(B)、LTA4h(C)の発現を測定した。(A)LTA4h をノックダウンすると、BC1 に IA を活性化する刺激を加えた時に、IL-6 の産生が抑制されることを ELISA で確認した。棒グラフは IL-6 の発現、赤い点は細胞数である。(B,C) LTA4h をノックダウンすると IL-6 の発現の抑制が mRNA レベルでも確認された。

腎細胞と尿検体での標的遺伝子の検索

次に腎臓の非免疫細胞でのIAの活性化の有無について調べた。ヒト腎初代培養細胞 (RPTEC、HRM、HRGEC、HKF) をIL-6、IL-17、TNF- α で刺激し、ケモカインの発現をRT-PCRで測定した結果、刺激したすべてのヒト腎臓由来の細胞において炎症回路によるケモカイン、IL-6の発現が強くみられ、ヒト腎の非免疫細胞でもIAの活性化が起こることが証明された (図2)。そこで特定の分子の尿中での検出を目的に移植患者 (CAAMR、acute T cell mediated rejection:ATMR) および健常ボランティアの尿検体からexosomeを抽出した。Exosomeは生体内の細胞および培養細胞から分泌される30~200 nmの膜小胞で、血液、尿、羊水、腹水などの体液や細胞培養液中に存在している。DNA、RNA、脂質、タンパク質を含み、細胞から分泌されて目的の細胞へと運ばれ、細胞間や組織へのシグナル伝達の役割を担っている^{26, 29-33}。抽出したexosomeを用いてWestern BlottingでIAを正に制御する候補遺伝子であるchordin Like 2 (CHRD2)³⁴、exocyst complex component 3 like 2 (EXOC3L2)^{35, 36}、leucine rich repeat and Ig domain containing 3 (LINGO3)³⁷、可溶性の蛋白であるORM1の検出を試みた。ORM1とEXOC3L2は健常の尿に比べて移植患者の尿で強く発現したが (図3)、CHRD2、LINGO3は検出に成功しなかった。また、exosomeの安定した抽出、検体としての尿量がある程度必要であるなどの点が問題であった。当研究室ではshRNAライブラリを用いたゲノムワイドスクリーニング解析でIAを正に制御する遺伝子を同定している。このゲノムワイドスクリーニング研究では、shRNAを用いてBC1細胞でshRNAを用いて標的遺伝子のノックダウン細胞を作成し、IAを活性化する刺激を与えた時に、IL-6の発現が抑制する1000以上の遺伝子を同定し、IAの活性化に不可欠な遺伝子、すなわちIAを正に制御する候補遺伝子であることを見出した³⁸。IAの活性化により発現する遺伝子であることが同定されており、かつ患者検体からの検出が可能な可溶性分子であるORM1の検出の有用性に着目した。

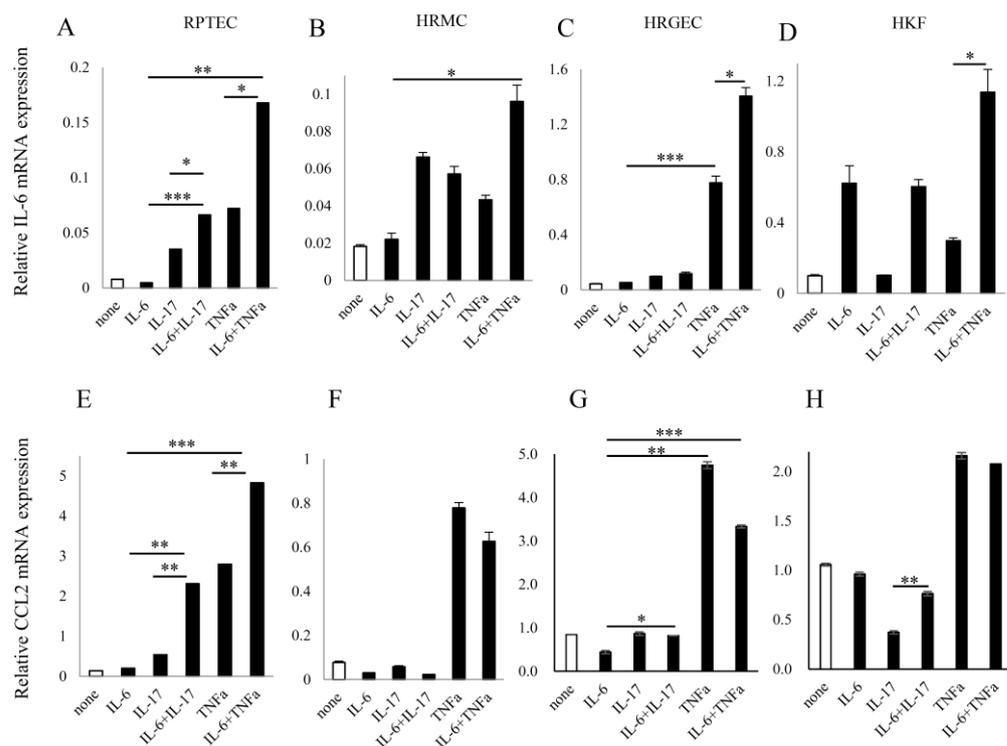


図2 ヒト腎細胞のサイトカイン刺激によるIAの活性化

RPTEC (A, E)、HRMC (B, F)、HRGEC (C, G and K)、HKF (D, H) を IL-6、IL-17、TNF- α で刺激した。RT-PCR により IL-6 (A-D)、CCL2 (E-H) の mRNA の発現を測定し、GAPDH の mRNA で補正した。ヒト腎細胞で IA の活性化刺激により IL-6、CCL2 の産生が促進された。データは mean \pm S.D. で示した。統計学的解析は Student's t tests (two-tailed) で行った。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

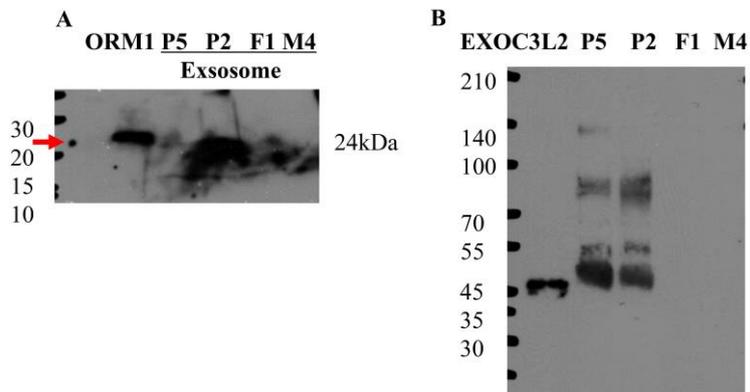


図 3 尿中 exosome の解析

ORM1 遺伝子、EXOC3L2 遺伝子を各々過剰発現させた HEK293 細胞をから抽出した蛋白を positive control とし、健常ボランティア (F1、M4)、ATMR (P5)、CAAMR (P2) の尿から抽出した exosome を Western Blotting で検出し ORM1 (A) と EXOC3L2 (B) 発現の強さを比較した。尿中 exosome から ORM1、EXOC3L2 の発現が確認でき、健常ボランティアに比べ拒絶のある移植患者の尿で高く発現していた。

ORM1 の尿中での測定結果

Banff 2013 に基づいた病理診断により移植患者を Normal (n=17)、IFTA (n=30)、CAAMR (n=17) の 3 群に分け、臨床データを比較した。患者背景は表 2 に示す。急性期の炎症蛋白である ORM1 を血清と尿中での発現を測定した。移植後の経過期間は Normal で有意に短かった。eGFR は Normal に比べて CAAMR 群で有意に低かった。(図 4-A)。血清中の ORM1 の値は 3 群で差がなかった(図 4-B)。尿細管障害を反映する尿中 NAG³⁹ も差がなかった。一方、尿中クレアチニンで補正した尿中 ORM1 は IFTA (9,558.3 ± 1,935.8 ng/mg Cre) と Normal (4,283.3 ± 1,010.4 ng/mg Cre) に比較して CAAMR (40,549.0 ± 8,093.6 ng/mg Cre) で有意に高かった(図 4D)。CAAMR 診断に有効な尿中 ORM1 の値を得るために ROC 曲線を作成した(図 4-E)。ROC 解析から、CAAMR 診断の尿中 ORM1 の cut off 値は 7,090.4 ng/mg Cre (感度 94.1%、特異度 68.0%、AUC 0.88) であった。この結果から尿中 ORM1 は CAAMR の非侵襲的な診断バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

表 2：患者背景

	CAAMR	IFTA	Normal	P value
患者数	17	30	17	
性別 (男/女)	10/7	16/14	12/5	ns
移植時年齢(年)	46.0(3-62)	44.5(2-67)	38.0(2-68)	ns
ドナー年齢 (年)	52.0(35-74)	52.0(23-70)	57.5(24-69)	ns
移植後経過期間 (年)	10.5(3.5-16)	6.25(0.5-20)	2.0(0.25-10)	* N vs I * N vs C
ABO 不適合 (%)	1 (5.8%)	7 (23%)	6 (35.2%)	* N vs C
生体腎 (%)	15 (88.2 %)	21 (70%)	16 (94.1%)	ns
CRP (mg/dL)	0.02(0.01-1.64)	0.03(0.02-0.44)	0.03(0.02-0.18)	ns
血清 Cre (mg/dL)	1.47(0.87-2.85)	1.14(0.49-3.45)	1.05(0.53-1.73)	* C vs I * C vs N
eGFR (ml/min)	41.4(15.9-58.7)	50.3(19.3-96.2)	50.7(37.8-123)	* C vs N
TP/Cre(g/gCre)	0.53(0.001-5.9)	0.05(0.005-2.0)	0.02(0.007-0.42)	* C vs I ** C vs N

C: chronic active antibody-mediated rejection、I: interstitial fibrosis and tubular atrophy、N:Normal Histology、CRP:C reactive protein、Cre:Creatinine、eGFR:Glomerular filtration rate、TP:total protein 統計学的解析は ANOVA、Bonferroni で行った。

* p<0.05, **p<0.01, ns: not significant

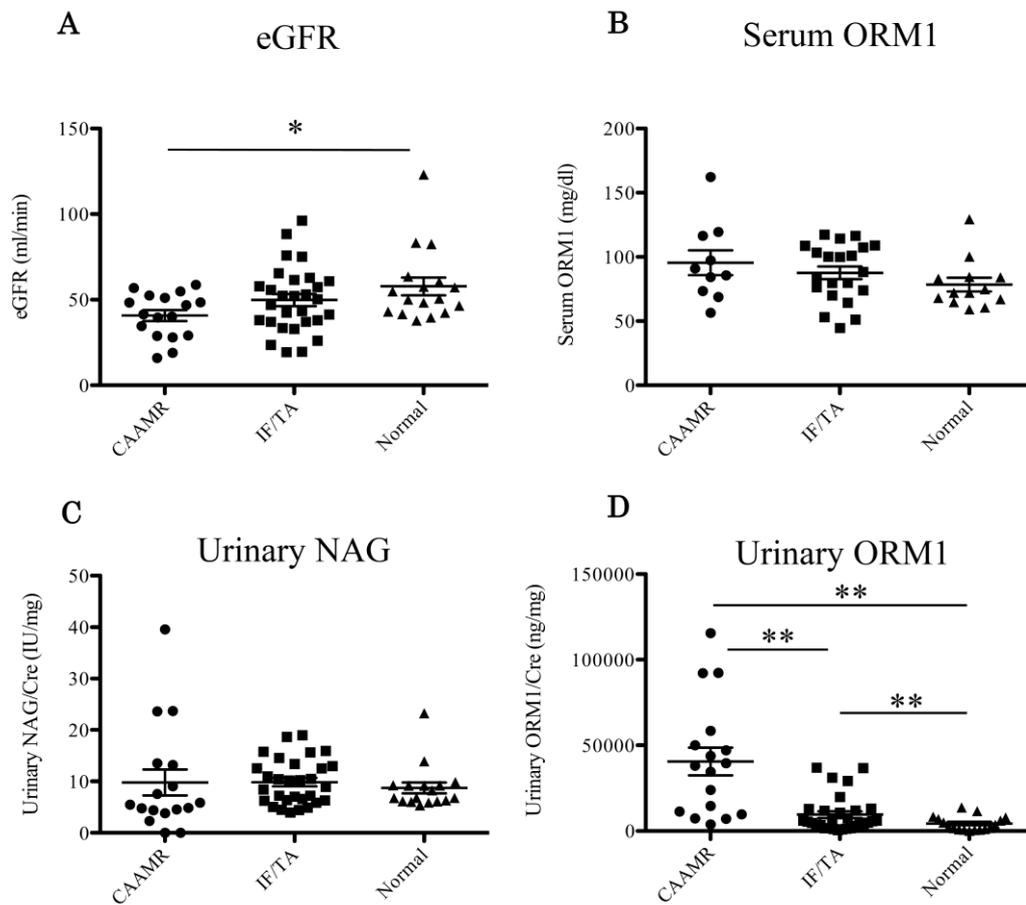


図4 移植患者血清、尿の解析結果

腎移植患者の血清と尿について、正常 (Normal)、IFTA、CAAMR の3群で eGFR (A)、尿中 NAG (C) について臨床データから解析した。血清 ORM1 (B) は免疫比濁法、尿中 ORM1 (D) は ELISA で測定し、尿中クレアチニンで補正した。データは mean \pm S.E.M. で示した。血清中の ORM1、尿中 NAG の値は3群で差がなかった。ORM1 は IFTA と Normal に比較して CAAMR で有意に高かった。統計学的解析は ANOVA と Bonferroni で行った。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.001$ 。

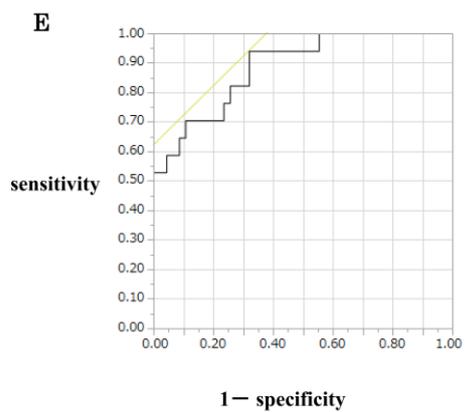


図 4 移植患者血清、尿の解析結果

(E) CAAMR 診断のための ROC 曲線は 64 の尿検体の結果を用いて作成した。
 CAAMR 診断の尿中 ORM1 の cut off 値は 7,090.4 ng/mg Cre (感度 94.1%、特異度 68.0%、AUC 0.88) であった。

移植腎生検組織の免疫染色結果

移植腎生検組織の免疫染色では Normal と比較して CAAMR 患者の組織の尿細管細胞の brush border で ORM1 が強く発現した (図 5-A)。Pp65 と リン酸化 STAT3 は組織の核で同時に強く発現した場合に IA が活性化されていることが示唆される^{13,14}。Pp65 とリン酸化 STAT3 は Normal の組織では pp65 の発現が弱かったのに対して、CAAMR の尿細管でとくに強く発現していた (図 5-B、C)。これらの結果から移植腎の CAAMR において NF- κ B と STAT3 の同時活性化が関与しており、特に尿細管で ORM1 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

ヒト腎における非免疫細胞におけるサイトカイン刺激による NF- κ B 活性化

ヒト腎初代培養細胞 (RPTEC、HRM、HRGEC、HKF) を IL-6、IL-17 で刺激し、ケモカインの発現を RT-PCR で測定した結果、刺激したすべてのヒト腎臓由来の細胞において炎症回路によるケモカイン、IL-6 の発現が強くみられ、ヒト腎の非免疫細胞でも IA の活性化が起こることが証明された (図 2)。一方、IA を活性化させる刺激により ORM1 の発現は RPTEC で高くみられ (図 6 A-D)、免疫染色で ORM1 が CAAMR 患者の尿細管細胞で強く発現していた結果と矛盾しなかった (図 6-A)。これらの結果から腎臓を構成する種々の細胞は NF- κ B を活性化するが、サイトカイン刺激による ORM1 の供給源は尿細管であることが示唆された。さらに機能的な解析を行うため、RPTEC を細胞不死化試薬 SV40 large T 抗原を用いて不死化処理した。Immortalized RPTEC (不死化 RPTEC) はサイトカイン刺激に対して初代 RPTEC と同様の反応を示し、IL-6、CC12 の発現が促進された (図 6 E, F)。

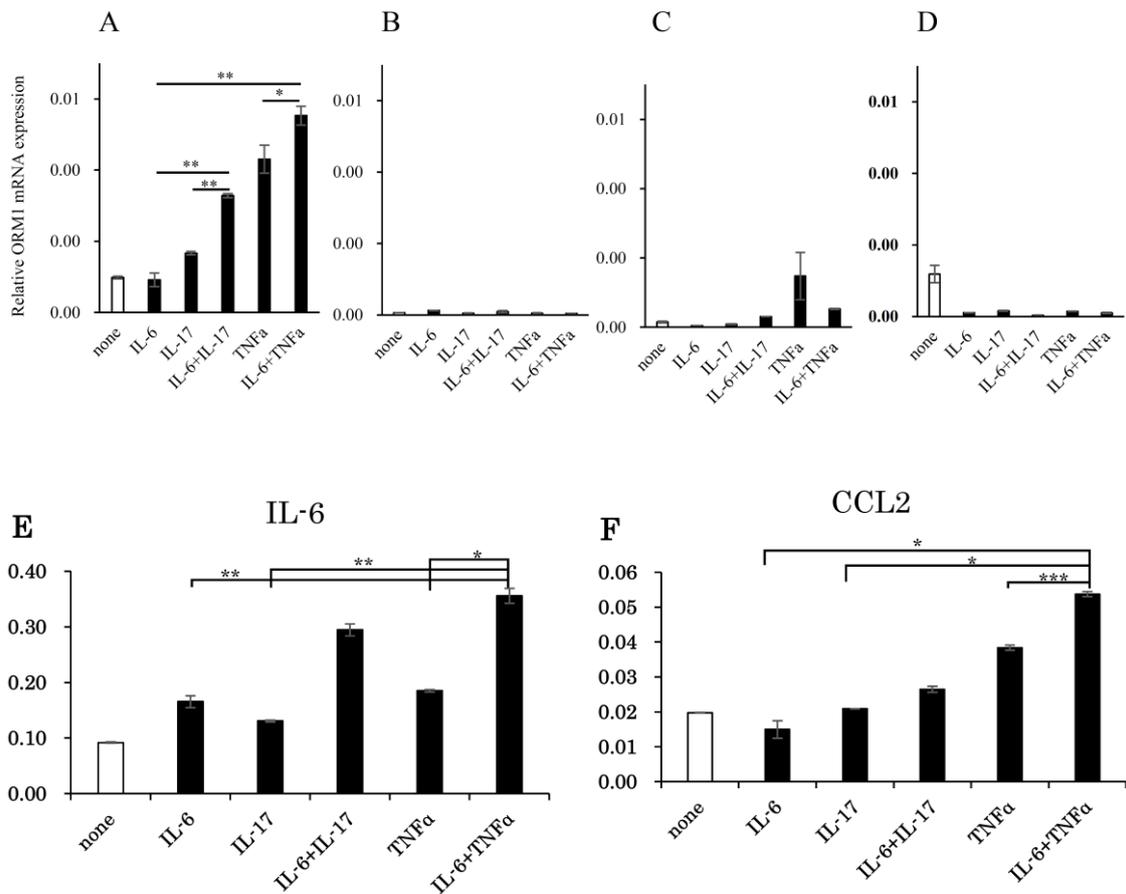


図6 ヒト腎細胞における ORM1 の発現

ヒト初代培養細胞:RPTEC (A)、HRMC (B)、HRGEC (C)、HKF (D) を IL-6、IL17、TNF- α 単独または組み合わせて刺激し ORM1 の発現を RT-PCR で測定した。(E, F) RPTEC を SV40 で処理して不死化細胞を作成し、IL-6、IL17、TNF- α 単独または組み合わせて刺激して IL-6、CCL2 の発現を測定した。ORM1 の発現を RT-PCR で測定した。IA を活性化させる刺激により ORM1 の発現は RPTEC で高くみられた。不死化 RPTEC はサイトカイン刺激に対して初代 RPTEC と同様の反応を示し、IL-6、CC12 の発現が促進された。統計学的解析は Student's t tests (two-tailed) で行った。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$ 。

尿細管細胞、関節炎モデルマウスにおける ORM1 による NF- κ B の活性化

我々は過去に成長因子エペグリンがIAによって誘発され、さらにpositive feed back loopを形成しNF- κ Bの活性化を介してIAを増強させることを報告した⁸。ORM1にもそのような機能があるかを解析するため、RPTECをrecombinant ORM1で刺激した。ORM1がIL-6のような刺激物質として機能しているのではないかと考え、RPTECを様々な濃度で刺激したが、ORM1の単独刺激ではサイトカインの発現が得られなかったが、ORM1とIL-6同時刺激により、IL-6単独またはORM1単独刺激に比較してIL-6 や CCL2 mRNAの発現が有意に増加した、ORM1はIL-6と相乗的にIAを活性化することが示唆された(図7A、4B)。siRNAを用いてRPTECでORM1をノックダウンするとIL-6とIL-17による刺激後、IL-6の発現は有意に抑制された(図7C、4D)。動物モデルでのORM1の影響をマウス炎症モデル(F759 マウス)を用いた関節炎誘導実験を行った。低用量のIL-6とIL-17の刺激では軽度の関節炎が誘発されたのに対して、ORM1とIL-6の共刺激では強い炎症が惹起された(図7E)。この結果からORM1は動物モデルにおいてもIAの標的遺伝子であるとともにNF- κ B経路の正の制御因子であると考えられた。

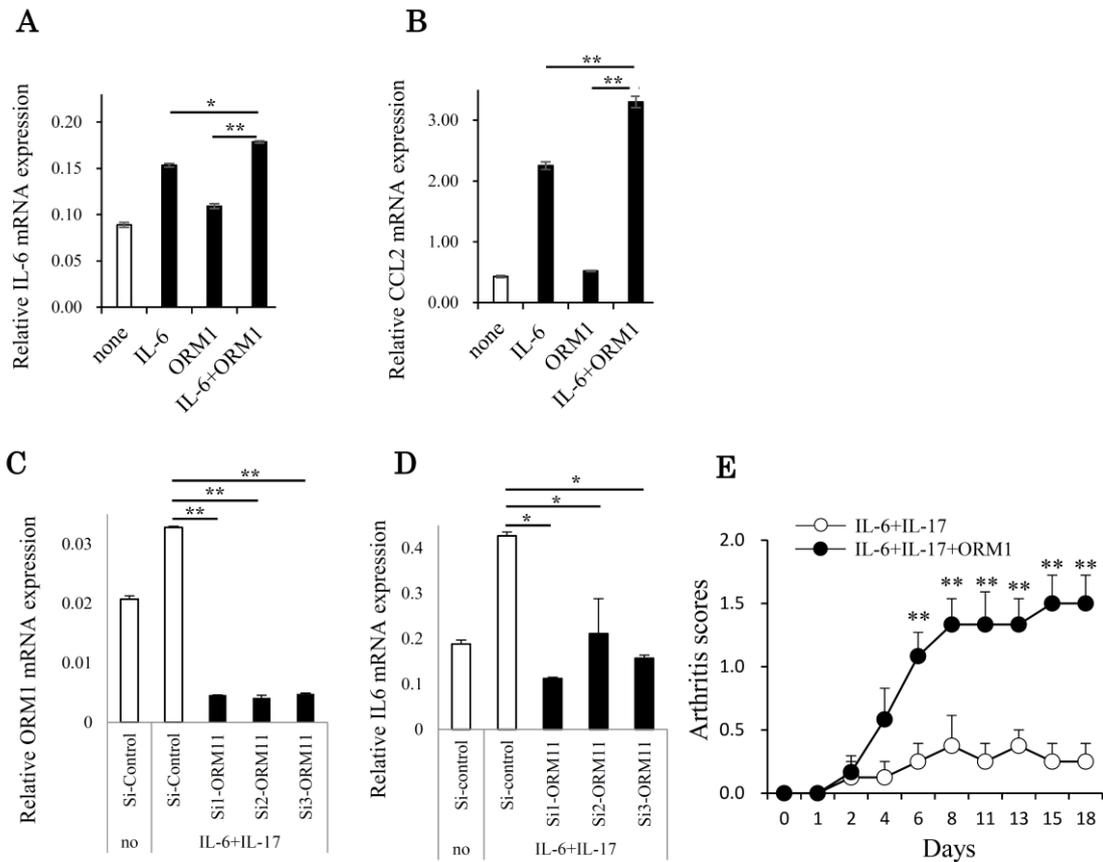


図7 RPTECにおけるORM1のノックダウンと動物モデルでの関節炎の誘発 (A, B) RPTECをIL-6、ORM1、IL-6とORM1(IL-6+ORM1)で共刺激、TNF- α で刺激し、IL-6(A)とCCL2(B)のmRNAの発現をRT-PCRで測定してGAPDHで補正した。(C, D)3種類のORM1 siRNAs (si1-ORM1 ~ si3-ORM1)を用いてRPTECでORM1をノックダウンし、IL-6とIL-17Aで刺激後、ORM1の発現の低下(C)とIL-6(D)の発現の低下をRT-PCRで測定した。(E)低用量のIL-6とIL-17AをF579マウスの関節に注射し、ORM1の添加の有無による関節炎のclinical scoreを比較した。低用量のIL-6とIL-17の刺激では軽度の関節炎が誘発されたのに対して、ORM1とIL-6の共刺激では強い炎症が惹起された。統計学的解析はStudent t tests (two-tailed)で行った。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ 。

ORM1 による NF- κ B のシグナルの促進

ORM1 の機能的な解析を行うために、RPTEC を IL-6 単独、ORM1、IL-6+ORM1、TNF- α 単独で刺激し、NF- κ B p65 の活性化をその局在として共焦点顕微鏡で評価した。TNF- α は強力な NF- κ B 活性化分子であり、核移行の陽性コントロールとして使用した。NF- κ B p65 の細胞質から核への移行は IL-6+ORM1 刺激で認められ、核に局在する細胞の割合は IL-6 単独刺激 (1.05%)、ORM1 単独刺激 (2.5%) と比較して IL-6+ORM1 の刺激 (17.7%) で有意に高かった (8-A、B)。これらから ORM1 は RPTEC において NF- κ B のシグナルを増強させることが示唆された。

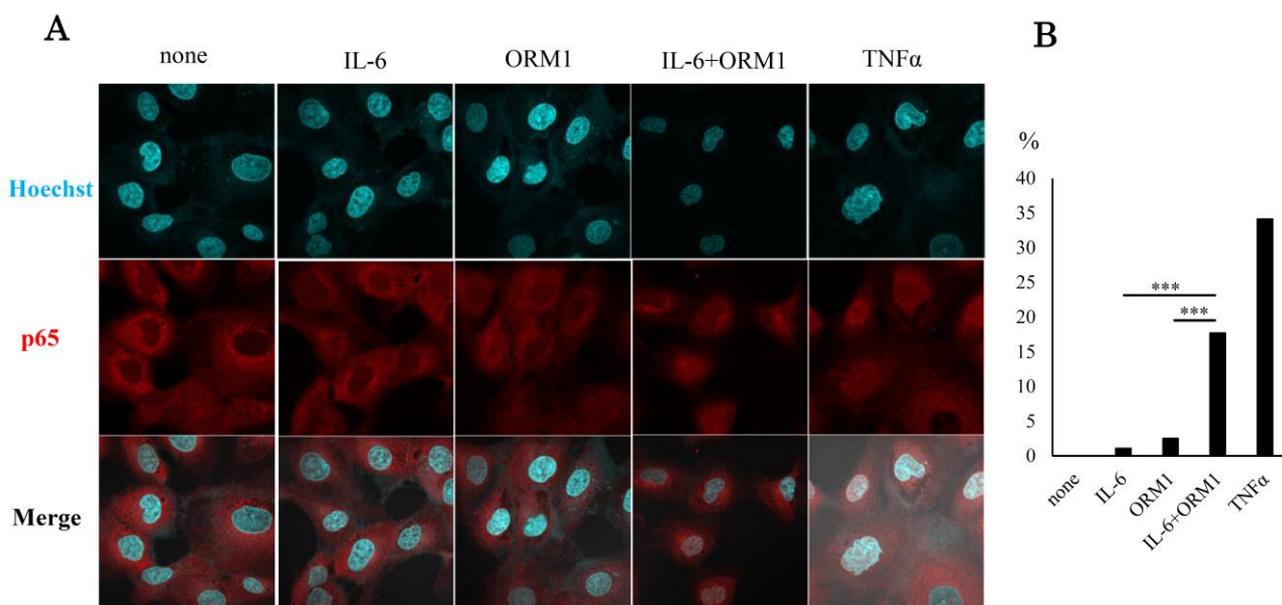


図 8 不死化 RPTEC における p65 の核内移行

(A) 不死化処理した RPTEC を IL-6、ORM1、IL-6+ORM1、TNF- α (positive control) で刺激した。刺激後 30 分での NF- κ B p65 (赤) の局在を共焦点顕微鏡で評価した。Hoechst 33342 (シアン) で核を染色した。NF- κ B p65 の細胞質から核への移行は IL-6+ORM1 刺激で認められた。

(B) 核内の NF- κ B p65 の割合を示した。統計学的解析は Fisher's exact test で行った。* p <0.05、** p <0.01、and *** p <0.001。

考察

今回の研究では尿中で測定が可能な可溶性分子である ORM1 に着目し、初めに非侵襲的な診断バイオマーカーになり得るかを検討した。移植患者の尿中で ORM1 は病理診断の結果が IFTA や正常であった患者に比較して CAAMR で有意に高いことを発見した。一方、従来尿細管障害のマーカーとして知られている尿中 NAG はこれら 3 群で差がなかった。CAAMR 患者では他の患者群と比較して尿中の総蛋白 (urinary total protein:UTP) の値も有意に高かったが、8名の患者(47.05%)では UTP が 0.5 g/g Cre 以下であった。UTP が低かった 8名のうち 6名の尿中 ORM1 は 10,000 ng/mg Cre を超えており、明らかな尿蛋白陽性がみられない患者においても尿中 ORM1 は鋭敏かつ非侵襲的な診断バイオマーカーになり得る可能性がある。

CAAMRの病理診断においては、糸球体係蹄壁の肥厚や二重化など糸球体内皮細胞の変化が診断基準のひとつとなっているが、糸球体障害が高度になると尿中に漏出した血清由来の蛋白により、尿中蛋白が高値となる。尿中蛋白が低く、かつ尿中ORM1が高値であった患者の尿中ORM1は、糸球体に高度な障害が及んでいない段階で、炎症の結果尿細管上皮細胞から分泌されたORM1を検出している可能性がある。CAAMRは血清クレアチニン値の上昇や尿蛋白の出現などの臨床症状がみられなくても、病理組織学的な変化が進行している場合がある。確定診断は移植腎の生検による病理診断がgold standardであるが、確立した治療法はなく、病理診断確定後の治療成績は良好とは言えない。早期診断による治療介入が長期間の移植腎機能の安定と、移植腎機能喪失までの期間を延長させる可能性がある。ドナー特異抗体 (DSA) を測定することはCAAMRのリスクをモニタリングするひとつの方法であるが、日本においては測定可能な医療機関が限定されており一般検査ではないこと、また定期検査として実施するには高額であるなどの問題点がある。新たなモニタリング方法として、B細胞のphenotypeの違いによるCAAMRの診断が有用である可能性などが報告されている⁴⁰。尿中のORM1の検出は臨床的な所見に乏しい段階での拒絶を診断し、スクリーニングとしてより優れた検査になる可能性がある。しかしながら、ORM1は血清中では尿中の1000倍(45-98 mg/dL in male)の基準値とされており、血尿を認める患者に対して尿中ORM1の測定は有用ではない可能性がある。

糸球体や尿細管細胞を含む種々の腎細胞で STAT3 と NF- κ B の同時活性化により IA の活性化が惹起されることを in vitro で確認した。一方移植腎生検組織の免疫染色の結果から、リン酸化 NF- κ B とリン酸化 STAT3 の同時活性が CAAMR 患者の尿細管で強く認められ、CAAMR における尿細管での IA の関与が示唆された。ORM1 については CAAMR 患者の組織切片の尿細管で強く染まっており、ORM1

の mRNA は IA を活性化する刺激により RPTEC で高く発現していた。この結果から IA の活性化は CAAMR の発症における炎症を惹起させることが示唆される。ORM1 は尿細管において CAAMR の病勢進行に重要な役割を果たしている可能性がある。これらの結果に一致して、ORM1 の阻害により RPTEC における IA の活性化が抑制された。腎細胞における ORM1 の産生を提唱する報告は我々の知る限りは初めてである。

本研究において、ORM1 を介した IA の活性化が CAAMR の発症に重要な役割を果たしていることをヒトの細胞を用いた *in vitro* モデルで初めて見出しが、動物モデルで証明することはできなかった。その理由は、急性抗体関連拒絶の動物モデルを報告する文献はあるもの⁴¹、CAAMR の動物モデルの報告はないからである。そのため、慢性炎症モデルであり、IA と関節リウマチの関連を研究するために使用されている関節リウマチモデルマウスを *in vivo* 実験として使用した。この実験の結果から、ORM1 が関節リウマチという慢性炎症モデルにおいて IA の活性化に重要であることを初めて証明した。しかしながら、ORM1 と CAAMR における慢性炎症との関係を動物モデルにおいて直接証明することは未だできていない。

IL-6 は炎症反応において重要な役割を果たすサイトカインであるが、移植領域においても多数の報告があり、マウスの心移植モデルでの産生が報告されている^{42,43}。移植腎患者でも拒絶反応が進行した状態では血清、および尿中の IL-6 が上昇することが報告されており⁴⁴⁻⁴⁶、抗 IL-6 受容体モノクローナル抗体トシリズマブが近年 CAAMR の治療薬として注目を集めている^{47,48}。今回の CAAMR と IA に関する発見は移植患者での IL-6 の上昇と CAAMR に対する抗 IL-6 受容体ブロックの有効性を説明することが可能であるひとつのメカニズムと言える。ORM1 の阻害は腎の尿細管細胞において NF- κ B のターゲット遺伝子の発現を抑制した。一方で、ORM1 で尿細管細胞を刺激すると NF- κ B のターゲット遺伝子の発現を増強させ、関節炎モデルマウスの関節に ORM1 を注射すると局所の炎症を強めた。従って、ORM1 が局所の炎症を調整し、尿細管細胞における ORM1 の阻害は慢性拒絶を含めた腎臓における炎症反応を減弱させるという理論は妥当であると考えられる。我々は ORM1 が IL-6 による NF- κ B p65 の核移行を促進させることを発見し、これらの細胞における ORM1 のレセプターの存在が示唆される。ORM1 がどのように NF- κ B のシグナルに影響しているか、正確なメカニズムを解明することは将来の研究課題である。

免疫抑制剤の発展により移植腎の生着率は向上したが、移植腎喪失の大きな原因となっている CAAMR の早期診断、治療方法の確立が強く求められている。本研究で明らかにした、CAAMR 発症への IA の関与は新たな知見であり、その制御が治療ターゲットとなる可能性がある。既存の免疫抑制剤とは異なる機序を

ターゲットした治療は従来の副作用を軽減し、より特異的な治療となる可能性があり、新たな治療法の確立を目指した更なる研究を目指したい。

総括/結論

① 本研究全体から得られた知見

- ・ 腎臓を構成する細胞で NF- κ B 経路と STAT3 経路の同時活性化により種々のサイトカインが産生され、腎臓の非免疫細胞においても IA が活性化されることを示した。
- ・ リン酸化 NF- κ B とリン酸化 STAT3 の同時活性が CAAMR 患者の尿細管で強く認められ、CAAMR における尿細管での IA の関与が示唆された。
- ・ IA を正に制御する遺伝子であり、かつ可溶性分子である ORM1 は CAAMR 患者の尿中で拒絶のない患者と比較して有意に高く、また腎生検組織においても CAAMR 患者の尿細管で ORM1 が強く発現していた。
- ・ RPTEC において ORM1 のノックダウンにより IA の活性化は阻害され、ORM1 と IL-6 の共刺激により活性化され、関節炎モデルマウスにでも ORM1 により関節炎が増悪することが示された。

② 新知見の意義

- ・ 尿中 ORM1 の検出は CAAMR の非侵襲的な診断バイオマーカーとなり得る。
- ・ CAAMR の発症には IA の活性化による炎症が関与しており、ORM1 は CAAMR の発症に重要な役割を果たしている可能性がある。
- ・ ORM1 を介した IA の活性化を阻害することが、CAAMR の治療ターゲットとなる可能性がある。
- ・ 移植腎患者でも拒絶反応が進行した状態では血清、および尿中の IL-6 が上昇することが報告されており、抗 IL-6 受容体モノクローナル抗体トシリズマブが近年 CAAMR の治療薬として注目を集めている。今回の CAAMR と IA に関する発見は移植患者での IL-6 の上昇と CAAMR に対する抗 IL-6 受容体ブロックの有効性を説明することが可能であるひとつのメカニズムと言える。

③ 今後の展開・課題

- ・ CAAMR 発症前、治療後の ORM1 の継時的な評価による発症予測因子、治療効果判定因子としての可能性についてのさらなる検索。
- ・ ORM1 がどのように NF- κ B のシグナル経路に影響しているか、IA の活性化に至る正確なメカニズムを解明することは将来の研究課題である。
- ・ ORM1 の NF- κ B のシグナルにおける更なるメカニズムの解明により、より特異的な機序を治療ターゲットとすることで、副作用の少ない効率的かつ効果的な治療法への道が開ける。

謝辞

本研究は、著者が北海道大学大学院医学研究科医学専攻博士課程在籍中の研究成果をまとめたものである。稿を終えるにあたり本研究の機会を賜りました同大学院医学研究科腎泌尿器外科学分野、篠原信雄教授に深甚なる謝意を表します。さらに実際の研究の場となった北海道大学遺伝子制御研究所分神経免疫学講座の村上正晃教授に研究デザインや手技、論文作成に至るまで、多大なるご協力を頂き、心より感謝申し上げます。また、研究技法をご指導いただきました同講座のスタッフの皆様に心からお礼申し上げます。また臨床検体収集にご協力いただいた市立札幌病院腎臓移植外科部長、原田浩先生に御礼申し上げます。最後に、本研究において最も重要である臨床検体を提供していただいた移植患者さんの協力を深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1 Lea-Henry, T. & Chacko, B. Management considerations in the failing renal allograft. *Nephrology (Carlton)* **23**, 12-19, (2018).
- 2 Hara, S. Current pathological perspectives on chronic rejection in renal allografts. *Clin. Exp. Nephrol.* **21**, 943-951, (2017).
- 3 Lamb, K. E., Lodhi, S. & Meier-Kriesche, H. U. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am. J. Transplant.* **11**, 450-462, (2011).
- 4 Sayegh, M. H. & Carpenter, C. B. Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2761-2766, (2004).
- 5 Pascual, M., Theruvath, T., Kawai, T., Tolckoff-Rubin, N. & Cosimi, A. B. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* **346**, 580-590, (2002).
- 6 Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Kanamoto, M., Nishihara, M., Iwakura, Y. & Hirano, T. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity* **29**, 628-636, (2008).
- 7 Atsumi, T., Singh, R., Sabharwal, L., Bando, H., Jie, M., Arima, Y., Yamada, M., Harada, M., Jiang, J. J., Hirano, T., Kamimura, D., Ogura, H. & Murakami, M. Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer Research* **74**, 8-14, (2014).
- 8 Murakami, M., Harada, M., Kamimura, D., Ogura, H., Okuyama, Y., Kumai, N., Okuyama, A., Singh, R., Jiang, J. J., Atsumi, T., Shiraya, S., Nakatsuji, Y., Kinoshita, M., Kohsaka, H., Nishida, M., Sakoda, S., Miyasaka, N., Yamauchi-Takahara, K. & Hirano, T. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell Rep.* **3**, 946-959, (2013).
- 9 Arima, Y., Harada, M., Kamimura, D., Park, J. H., Kawano, F., Yull, F. E., Kawamoto, T., Iwakura, Y., Betz, U. A., Marquez, G., Blackwell, T. S., Ohira, Y., Hirano, T. & Murakami, M. Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell* **148**, 447-457, (2012).
- 10 Harada, M., Kamimura, D., Arima, Y., Kohsaka, H., Nakatsuji, Y., Nishida, M., Atsumi, T., Meng, J., Bando, H., Singh, R., Sabharwal, L., Jiang, J. J., Kumai, N., Miyasaka, N., Sakoda, S., Yamauchi-Takahara, K., Ogura, H., Hirano, T. & Murakami, M. Temporal expression of growth factors triggered by epiregulin regulates inflammation development. *J. Immunol.* **194**, 1039-1046, (2015).
- 11 Arima, Y., Kamimura, D., Atsumi, T., Harada, M., Kawamoto, T., Nishikawa, N., Stofkova, A., Ohki, T., Higuchi, K., Morimoto, Y., Wieghofer, P., Okada, Y., Mori, Y.,

- Sakoda, S., Saika, S., Yoshioka, Y., Komuro, I., Yamashita, T., Hirano, T., Prinz, M. & Murakami, M. A pain-mediated neural signal induces relapse in murine autoimmune encephalomyelitis, a multiple sclerosis model. *Elife* **4**, e08733, (2015).
- 12 Arima, Y., Ohki, T., Nishikawa, N., Higuchi, K., Ota, M., Tanaka, Y., Nio-Kobayashi, J., Elfeky, M., Sakai, R., Mori, Y., Kawamoto, T., Stofkova, A., Sakashita, Y., Morimoto, Y., Kuwatani, M., Iwanaga, T., Yoshioka, Y., Sakamoto, N., Yoshimura, A., Takiguchi, M., Sakoda, S., Prinz, M., Kamimura, D. & Murakami, M. Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit. *Elife* **6**, e25517, (2017).
- 13 Lee, J., Nakagiri, T., Oto, T., Susaki, Y., Shintani, T., Inoue, M., Kamimura, D., Miyoshi, S., Morii, E., Hirano, T., Murakami, M. & Okumura, M. IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation. *Int. Immunol.* **25**, 319-332, (2013).
- 14 Lee, J., Nakagiri, T., Oto, T., Harada, M., Morii, E., Shintani, Y., Inoue, M., Iwakura, Y., Miyoshi, S., Okumura, M., Hirano, T. & Murakami, M. IL-6 amplifier, NF-kappaB-triggered positive feedback for IL-6 signaling, in grafts is involved in allogeneic rejection responses. *J. Immunol.* **189**, 1928-1936, (2012).
- 15 Fournier, T., Medjoubi-N, N. & Porquet, D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys. Acta* **1482**, 157-171, (2000).
- 16 Sorensson, J., Matejka, G. L., Ohlson, M. & Haraldsson, B. Human endothelial cells produce orosomucoid, an important component of the capillary barrier. *Am. J. Physiol.* **276**, H530-534, (1999).
- 17 Ito, S., Tsuda, A., Momotsu, T., Igarashi, K., Kasahara, S., Satoh, K. & Shibata, A. Urinary orosomucoid excretion rate in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Endocrinol (Copenh)* **120**, 584-590, (1989).
- 18 Christiansen, M. S., Hommel, E., Friberg, L., Mølvi, J., Magid, E. & Feldt-Rasmussen, B. Increased urinary orosomucoid excretion is not related to impaired renal function in patients with type 2 diabetes. *J. Diabetes Complications* **24**, 28-36, (2010).
- 19 Hashimoto, S., Asao, T., Takahashi, J., Yagihashi, Y., Nishimura, T., Saniabadi, A. R., Poland, D. C., van Dijk, W., Kuwano, H., Kochibe, N. & Yazawa, S. alpha1-acid glycoprotein fucosylation as a marker of carcinoma progression and prognosis. *Cancer* **101**, 2825-2836, (2004).
- 20 Hou, L. N., Li, F., Zeng, Q. C., Su, L., Chen, P. A., Xu, Z. H., Zhu, D. J., Liu, C. H. & Xu, D. L. Excretion of urinary orosomucoid 1 protein is elevated in patients with chronic heart failure. *PLoS One* **9**, e107550, (2014).

- 21 Li, F., Yu, Z., Chen, P., Lin, G., Li, T., Hou, L., Du, Y. & Tan, W. The increased excretion of urinary orosomucoid 1 as a useful biomarker for bladder cancer. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 331-340, (2016).
- 22 Kang, M. J., Park, Y. J., You, S., Yoo, S. A., Choi, S., Kim, D. H., Cho, C. S., Yi, E. C., Hwang, D. & Kim, W. U. Urinary proteome profile predictive of disease activity in rheumatoid arthritis. *J. Proteome Res.* **13**, 5206-5217, (2014).
- 23 Haas, M., Sis, B., Racusen, L. C., Solez, K., Glotz, D., Colvin, R. B., Castro, M. C., David, D. S., David-Neto, E., Bagnasco, S. M., Cendales, L. C., Cornell, L. D., Demetris, A. J., Drachenberg, C. B., Farver, C. F., Farris, A. B., Gibson, I. W., Kraus, E., Liapis, H., Loupy, A., Nickleit, V., Randhawa, P., Rodriguez, E. R., Rush, D., Smith, R. N., Tan, C. D., Wallace, W. D., Mengel, M. & committee, B. m. r. w. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am. J. Transplant.* **14**, 272-283, (2014).
- 24 Murakami, M., Okuyama, Y., Ogura, H., Asano, S., Arima, Y., Tsuruoka, M., Harada, M., Kanamoto, M., Sawa, Y., Iwakura, Y., Takatsu, K., Kamimura, D. & Hirano, T. Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *J. Exp. Med.* **208**, 103-114, (2011).
- 25 Meng, J., Jiang, J. J., Atsumi, T., Bando, H., Okuyama, Y., Sabharwal, L., Nakagawa, I., Higuchi, H., Ota, M., Okawara, M., Ishitani, R., Nureki, O., Higo, D., Arima, Y., Ogura, H., Kamimura, D. & Murakami, M. Breakpoint Cluster Region-Mediated Inflammation Is Dependent on Casein Kinase II. *J. Immunol.* **197**, 3111-3119, (2016).
- 26 Thompson, M. D., Capra, V., Clunes, M. T., Rovati, G. E., Stankova, J., Maj, M. C. & Duffy, D. L. Cysteinyl Leukotrienes Pathway Genes, Atopic Asthma and Drug Response: From Population Isolates to Large Genome-Wide Association Studies. *Front. Pharmacol.* **7**, 299, (2016).
- 27 Tobin, D. M., Roca, F. J., Oh, S. F., McFarland, R., Vickery, T. W., Ray, J. P., Ko, D. C., Zou, Y., Bang, N. D., Chau, T. T., Vary, J. C., Hawn, T. R., Dunstan, S. J., Farrar, J. J., Thwaites, G. E., King, M. C., Serhan, C. N. & Ramakrishnan, L. Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. *Cell* **148**, 434-446, (2012).
- 28 Narendran, G., Kavitha, D., Karunaianantham, R., Gil-Santana, L., Almeida-Junior, J. L., Reddy, S. D., Kumar, M. M., Hemalatha, H., Jayanthi, N. N., Ravichandran, N., Krishnaraja, R., Prabhakar, A., Manoharan, T., Nithyananthan, L., Arjunan, G., Natrajan, M., Swaminathan, S. & Andrade, B. B. Role of LTA4H

- Polymorphism in Tuberculosis-Associated Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome Occurrence and Clinical Severity in Patients Infected with HIV. *PLoS One* **11**, e0163298, (2016).
- 29 Couzin, J. Cell biology: The ins and outs of exosomes. *Science* **308**, 1862-1863, (2005).
- 30 Sun, Y. & Liu, J. Potential of cancer cell-derived exosomes in clinical application: a review of recent research advances. *Clin. Ther.* **36**, 863-872, (2014).
- 31 Braccioli, L., van Velthoven, C. & Heijnen, C. J. Exosomes: a new weapon to treat the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* **49**, 113-119, (2014).
- 32 Thebaud, B. & Stewart, D. J. Exosomes: cell garbage can, therapeutic carrier, or trojan horse? *Circulation* **126**, 2553-2555, (2012).
- 33 Pant, S., Hilton, H. & Burczynski, M. E. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 1484-1494, (2012).
- 34 Nakayama, N., Han, C. Y., Cam, L., Lee, J. I., Pretorius, J., Fisher, S., Rosenfeld, R., Scully, S., Nishinakamura, R., Duryea, D., Van, G., Bolon, B., Yokota, T. & Zhang, K. A novel chordin-like BMP inhibitor, CHL2, expressed preferentially in chondrocytes of developing cartilage and osteoarthritic joint cartilage. *Development* **131**, 229-240, (2004).
- 35 Shang, H., Fu, J., Zhang, X. M., Song, R. R. & Wang, W. Z. Association between EXOC3L2 rs597668 polymorphism and Alzheimer's disease. *CNS Neurosci. Ther.* **19**, 834-839, (2013).
- 36 Seshadri, S. *et al.* Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA* **303**, 1832-1840, (2010).
- 37 Haines, B. P. & Rigby, P. W. Expression of the Lingo/LERN gene family during mouse embryogenesis. *Gene Expr. Patterns* **8**, 79-86, (2008).
- 38 Murakami, M., Harada, M., Kamimura, D., Ogura, H., Okuyama, Y., Kumai, N., Okuyama, A., Singh, R., Jiang, J. J., Atsumi, T., Shiraya, S., Nakatsuji, Y., Kinoshita, M., Kohsaka, H., Nishida, M., Sakoda, S., Miyasaka, N., Yamauchi-Takahara, K., Yamaguchi-Takahara, K. & Hirano, T. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell Rep.* **3**, 946-959, (2013).
- 39 Bosomworth, M. P., Aparicio, S. R. & Hay, A. W. Urine N-acetyl-beta-D-glucosaminidase--a marker of tubular damage? *Nephrol. Dial. Transplant.* **14**, 620-626, (1999).
- 40 Nouel, A., Segalen, I., Jamin, C., Doucet, L., Caillard, S., Renaudineau, Y., Pers, J. O., Le Meur, Y. & Hillion, S. B cells display an abnormal distribution and an

- impaired suppressive function in patients with chronic antibody-mediated rejection. *Kidney Int.* **85**, 590-599, (2014).
- 41 Kohei, N., Tanabe, T., Horita, S., Omoto, K., Ishida, H., Yamaguchi, Y. & Tanabe, K. Sequential analysis of donor-specific antibodies and pathological findings in acute antibody-mediated rejection in a rat renal transplantation model. *Kidney Int.* **84**, 722-732, (2013).
- 42 Liang, Y., Christopher, K., Finn, P. W., Colson, Y. L. & Perkins, D. L. Graft produced interleukin-6 functions as a danger signal and promotes rejection after transplantation. *Transplantation* **84**, 771-777, (2007).
- 43 von Rossum, A., Rey, K., Enns, W., Manku, S., Cheema, R., MacEwan, G. E. & Choy, J. C. Graft-Derived IL-6 Amplifies Proliferation and Survival of Effector T Cells That Drive Alloimmune-Mediated Vascular Rejection. *Transplantation* **100**, 2332-2341, (2016).
- 44 Van Oers, M. H., Van der Heyden, A. A. & Aarden, L. A. Interleukin 6 (IL-6) in serum and urine of renal transplant recipients. *Clin. Exp. Immunol.* **71**, 314-319, (1988).
- 45 Casiraghi, F., Ruggenti, P., Noris, M., Locatelli, G., Perico, N., Perna, A. & Remuzzi, G. Sequential monitoring of urine-soluble interleukin 2 receptor and interleukin 6 predicts acute rejection of human renal allografts before clinical or laboratory signs of renal dysfunction. *Transplantation* **63**, 1508-1514, (1997).
- 46 Sonkar, G. K., Singh, S., Sonkar, S. K., Singh, U. & Singh, R. G. Evaluation of serum interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha levels, and their association with various non-immunological parameters in renal transplant recipients. *Singapore Med. J.* **54**, 511-515, (2013).
- 47 Wu, G., Chai, N., Kim, I., Klein, A. S. & Jordan, S. C. Monoclonal anti-interleukin-6 receptor antibody attenuates donor-specific antibody responses in a mouse model of allosensitization. *Transpl. Immunol.* **28**, 138-143, (2013).
- 48 Choi, J., Aubert, O., Vo, A., Loupy, A., Haas, M., Puliyananda, D., Kim, I., Louie, S., Kang, A., Peng, A., Kahwaji, J., Reinsmoen, N., Toyoda, M. & Jordan, S. C. Assessment of Tocilizumab (Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal) as a Potential Treatment for Chronic Antibody-Mediated Rejection and Transplant Glomerulopathy in HLA-Sensitized Renal Allograft Recipients. *Am. J. Transplant.* **17**, 2381-2389, (2017).