



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14075
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91656
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Takada.pdf



学位論文

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

北海道大学

高田 祐輔

学位論文

SYT17(Synaptotagmin17)の腎移植後慢性拒絶反応
に対する新規無侵襲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

北海道大学

高田 祐輔

目次

1. 発表論文目録及び学会発表目録	1
2. 要旨	2
3. 略語表	5
4. 緒言	6
4.1. 腎移植と慢性拒絶反応	6
4.2. 炎症アンプと SYT17	8
4.3. 液体生検 (Liquid biopsy)	11
4.4. 研究の目的	12
5. 対象と方法	13
5.1. RNA シーケンス解析	13
5.2. リアルタイム PCR	13
5.3. ルシフェラーゼレポーターアッセイ	14
5.4. 臨床検体	15
5.5. 免疫染色	15
5.6. 尿中エクソソーム回収	16
5.7. ウェスタンブロットティング法	16
5.8. 統計解析	17
6. 結果	18
6.1. 候補遺伝子の選定	18
6.2. SYT17 の <i>in vitro</i> での機能評価	21
6.3. 移植腎での SYT17 と炎症アンプ関連タンパク質の発現	22
6.4. 尿中エクソソーム SYT17 タンパク質の有用性	27
7. 考察	31
8. 結論	36
①本研究全体から得られた新知見	36
②新知見の意義	36
③今後の研究展開	36
④今後の課題	36
9. 謝辞	37
10. 利益相反	37
11. 引用文献	39

1. 発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である

1. Takada Yusuke, Kamimura Daisuke, Jiang Jing-Jing, Higuchi Haruka, Iwami Daiki, Hotta Kiyohiko, Tanaka Yuki, Ota Mitsutoshi, Higuchi Madoka, Nishio Saori, Atsumi Tatsuya, Shinohara Nobuo, Murakami Masaaki

Increased urinary exosomal SYT17 levels in chronic active antibody-mediated rejection after kidney transplantation

International Immunology (2019年10月投稿)

本研究の一部は以下の学会で発表した

1. TAKADA Yusuke, KAMIMURA Daisuke, IWAMI Daiki, HOTTA Kiyohiko, SHINOHARA Nobuo, MURAKAMI Masaaki
A urinary biomarker candidate for chronic rejection after kidney transplantation
Exosomes and Liquid Biopsies Europe 2018, 24-26 Oct 2018, Netherlands
2. TAKADA Yusuke, KAMIMURA Daisuke, TANAKA Yuki, OTA Mitsutoshi, Oki Takuto, MURAKAMI Masaaki
A urinary biomarker candidate for chronic rejection after kidney transplantation
第47回日本免疫学会学術集会、2018年12月10日~12日、福岡
3. 高田祐輔, 上村大輔, 岩見大基, 堀田記世彦, 篠原信雄, 村上正晃
腎移植後慢性拒絶反応診断のための Liquid Biopsy
第3回リキッドバイオプシー研究会、2019年1月18日~19日、東京
4. TAKADA Yusuke, KAMIMURA Daisuke, IWAMI Daiki, HOTTA Kiyohiko, SHINOHARA Nobuo, MURAKAMI Masaaki
Liquid biopsy for chronic rejection after kidney transplantation ~a novel non-invasive biomarker involved in Inflammatory Amplifier~
American Transplant Congress 2019, 1-5 Jun 2019, Boston USA
5. TAKADA Yusuke, KAMIMURA Daisuke, IWAMI Daiki, HOTTA Kiyohiko, SHINOHARA Nobuo, MURAKAMI Masaaki
Urinary exosomal KIAM protein is a novel non-invasive diagnostic biomarker for chronic active antibody-mediated rejection after kidney transplantation
第71回西日本泌尿器科学会総会、2019年11月7日~10日、島根県

2. 要旨

【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 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。

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 \pm 0.07、IF/TA:0.83 \pm 0.39、CNI-T:0.80 \pm 0.93、CAAMR:8.85 \pm 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蔵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 \pm 0.09、NED:0.13 \pm 0.17、IF/TA:0.22 \pm 0.35、CNI-T:0.40 \pm 0.35、CAAMR:1.34 \pm 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、炎症アンプの正のレギュレーターの役割を持っている。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 であれば発見・診断できるという新規性があると考えられる。

【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。

3. 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

CAAMR	Chronic active antibody mediated rejection
CCL	C-C motif chemokine ligand
CNI-T	Calcineurin inhibitors toxicity
DSA	Donor specific antigen
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
IF/TA	Interstitial fibrosis and tubular atrophy
IL17	Interleukin-17
IL-6	Interleukin-6
NED	Normal histology
NFkB	Nuclear factor-kappa B
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PEI	Polyethyleneimine
p-P65	Phosphorylated p65
p-STAT3	Phosphorylated STAT3
QOL	Quality of life
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	Small interfering RNA
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TNF α	Tumor necrosis factor alfa

4. 緒言

4.1. 腎移植と慢性拒絶反応

慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease : CKD）患者数は日本全体で約 1330 万人（20 歳以上の成人 8 人に 1 人）と推計され、新たな国民病とも言われている(Japanese Society of Nephrology, 2018)。CKD が進行し、末期腎不全（End Stage Renal Disease : ESRD）へ至った場合、生命維持ために、腎移植または透析療法のどちらかの治療が必要である。腎移植は、他人から提供された腎臓を ESRD 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、透析療法にくらべて高い QOL（Quality of life）を享受できる治療法である。近年の腎移植は、免疫抑制剤や技術の進歩によって生着率が格段に進歩し、20 年～30 年の長期生着が期待できる時代である。その一方で機能廃絶の原因をみると、近年でも、慢性拒絶反応が 25%を占めている(Transplantation, 2017)。

現在の慢性拒絶反応のうち、新規にドナー特異的抗体（Donor Specific Antigen : DSA）が出現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。一般的に CAAMR は、DSA の出現から徐々に進行し臨床的な腎機能障害をきたすと考えられている(Djamali *et al.*, 2014) < 図 1 >。しかし、その進行メカニズムが不明であり、臨床的な検査値の異常をきたすのは、最終段階まで進行してからである。ここまで進んだ CAAMR を治療することは極めて困難である。したがって、早期の段階での異常を検知できるバイオマーカーが求められている。加えて、現在の診断には、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した低侵襲なバイオマーカーは、早期診断と早期治療を可能とし、移植腎の長期生着に大きな貢献をもたらすと考える。

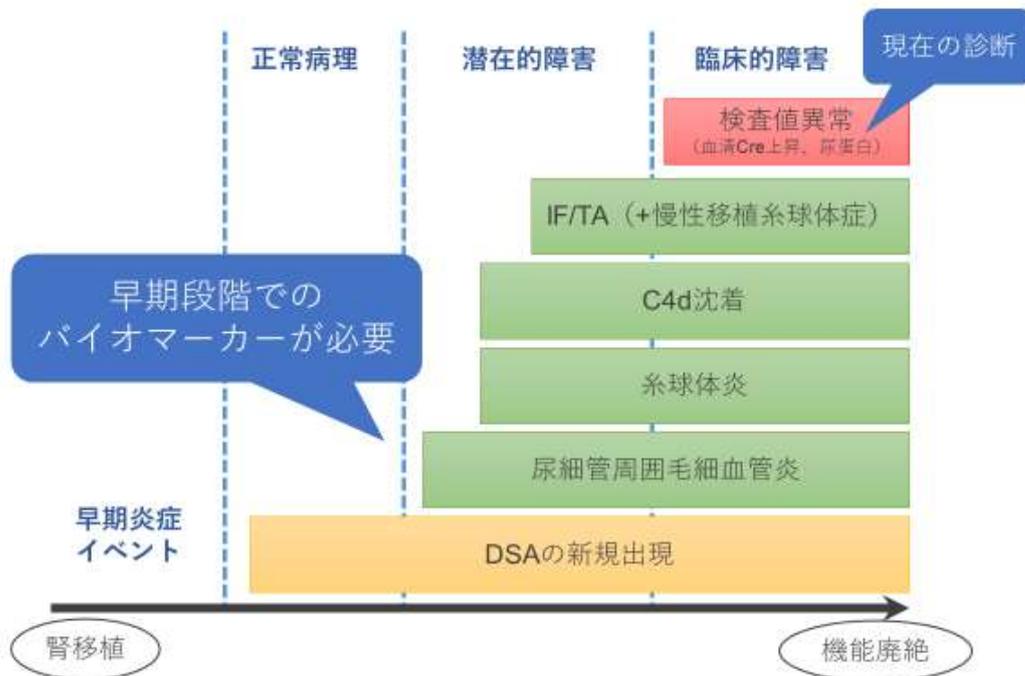


図 1. CAAMR の自然経過

移植腎での微少炎症を契機に DSA が新規出現する。DSA 出現後に、何らかのメカニズムにより段階的に病理学的変化をきたし進行する。最終的に血清クレアチニン上昇や尿蛋白陽性という臨床的な検査値の異常を認める。現在はこの最終段階での診断のため、治療は困難である。より早期の段階での異常を検知できるバイオマーカーが求められている。(Djamali *et al.*, 2014 より改変)

4.2. 炎症アンプと SYT17

炎症アンプは、F759 マウスという関節リウマチ炎を自然発症するノックインマウスの解析を通して明らかになった(Atsumi *et al.*, 2002; Ogura *et al.*, 2008; Murakami *et al.*, 2013)。概略を述べる。IL-6 は、IL-6 受容体と信号伝達サブユニットである gp130 の 2 つの分子から構成される、IL-6 受容体複合体に結合する。結合後、細胞内に STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) 依存性の正のシグナルと SOCS3 (Suppressor Of Cytokine Signaling 3) 依存性の負のシグナルを伝達する。F759 マウスでは、gp130 上の 759 番目のチロシン残基をフェニルアラニンに置換させた変異 (Y759F) をノックインした。これにより、gp130 上の SOCS3 の結合サイトが失われ、IL-6 シグナルのネガティブフィードバック機構が破綻し、慢性的な STAT3 活性化が引き起こされる。この過剰な IL-6-STAT3 信号の結果として生後 1 年ほどで関節炎を自然発症するほか、脾腫、自己抗体の産生などの自己免疫病態を発症する。この F759 マウスの病態解析の結果、免疫細胞ではなく、血管内皮細胞・線維芽細胞・アストロサイトなどの 1 型コラーゲン陽性の非免疫系細胞において、NFκB と STAT3 が同時に活性化することで、炎症性サイトカイン、ケモカインが相乗的に発現することが明らかとなった。特に、活性化した病原性ヘルパー T 細胞から産生される IL-17 と IL-6 の共刺激による NFκB と STAT3 の同時活性化は、効率良く局所の炎症アンプを誘導・活性化し、様々な細胞の局所への移入を促し、慢性炎症・自己免疫疾患の病態を形成した。これらの事実は、これまで単に免疫細胞の標的と考えられてきた非免疫細胞が炎症性疾患の形成に深く関わっているという、画期的な知見である<図 2>。

実際に、炎症アンプが様々な疾患に関わっていることが分かってきている。実験モデルマウスで、炎症アンプを阻害することによって、肺移植後拒絶反応をはじめとした、関節リウマチ炎、多発性硬化症、皮膚炎、ブドウ膜炎の病態を改善させた(Arima *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012, 2013; Atsumi *et al.*, 2014; Harada *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2017; Okuyama *et al.*, 2018; Tanaka *et al.*, 2018; Fujita *et al.*, 2019; Stofkova *et al.*, 2019)。加えてヒトの検体においても、炎症アンプターゲット分子が、肺移植後拒絶反応、関節リウマチ炎、多発性硬化症、ケロイドの患者血清・組織中で高値を示すことを発見している(Lee *et al.*, 2013; Murakami *et al.*, 2013; Fujita *et al.*, 2019)。

腎移植後 CAAMR でも、炎症アンブが病態の形成に重要な役割を担っていると考えられる。したがって、我々は炎症アンブを通じて、CAAMR の病態を解明すること目的とした。

炎症アンブに関わる遺伝子の中で、後述する *in vitro* 実験から正のレギュレーターとしての役割が判明した SYT17 (Synaptotagmin17) がその候補となった。この遺伝子は Synaptotagmin ファミリーの一つであり、細胞質に発現するタンパク質をコードする遺伝子である。Synaptotagmin ファミリーは、17 個のアイソフォームを有し、神経細胞および非神経細胞におけるエキソサイトシスの主要な Ca^{2+} センサーとして知られている (Chen and Jonas, 2017)。神経疾患のバイオマーカーとしての報告はあるが (Tratnjek, Živin and Glavan, 2013)、腎疾患との関連は報告されていない。SYT17 は B/K (Brain/Kidney) 蛋白という別名をもち、過去にラットの腎虚血再灌流障害との報告が 1 報ある (Han *et al.*, 2007)。虚血再灌流障害は、虚血状態にある臓器、組織に血液再灌流が起きた際に、フリーラジカルの産生、好中球・血小板の活性化などの炎症反応が惹起されて発生し、炎症性疾患と考えられる。したがって、SYT17 は腎臓での炎症性疾患に関わっている可能性が高いと考えられる。

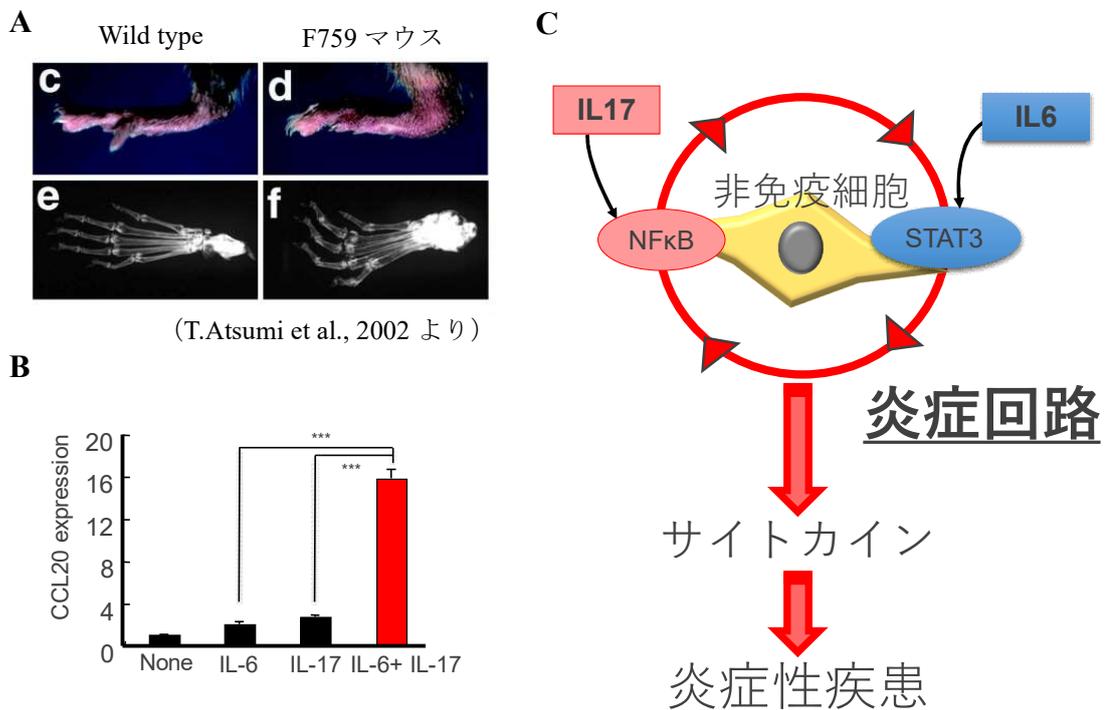


図 2. 非免疫細胞における炎症アンプ

A: 関節リウマチモデルマウス (F759 マウス) の病態解析から炎症アンプの機構が発見された。**B:** 非免疫細胞において、IL-6 と IL-17 単独刺激よりも、共刺激を行うことで、炎症性サイトカイン CCL20 の発現増加がみられる。**C:** IL-17 による NF κ B 経路が活性化と、IL-6 による STAT3 経路の同時活性化が、非免疫細胞でおきることで相乗的にサイトカイン発現が増加して、炎症性疾患を形成すると考えられる。この機構は炎症アンプと命名された。(T.Atsumi et al., 2002、Ogura *et al.*, 2008、Murakami *et al.*, 2013 より)

4.3. 液体生検 (Liquid biopsy)

現在の腎移植後拒絶反応のための診断のゴールドスタンダードは移植腎生検である(Van Loon, Lerut and Naesens, 2017)。しかし、いくつかの問題点がある。まず侵襲的な検査であり、合併症の懸念がある(Tøndel *et al.*, 2012)。さらに、腎全体の大きさに対して、針生検で得られるサンプルは極めて小さい。したがって、病巣を採取できない、サンプリングエラーの可能性も指摘されている(Lo, Kaplan and Kirk, 2014b)。

これに対して、液体生検 (Liquid biopsy) という、近年急速に発展している分野がある。体液サンプルから診断や治療効果予測を行うことを目標とした技術である(Friedrich, 2017)。これによる恩恵として、①低侵襲な診断が可能になること、②患者の個別の遺伝子情報を得ることでオーダーメイド治療が可能になると言われている。加えて、特定の臓器由来の体液は、その臓器全体の状態を反映した情報を含むと考えられる。具体的には、腎臓で産生される尿には、腎臓全体の情報を含まれると予想される。

Liquid biopsy の知見の中で、エクソソームという小胞体が注目されている(Raposo and Stoorvogel, 2013; Kalluri, 2016)。エクソソームは、細胞が能動的に放出し、その中にはタンパク質やRNAなどの放出した細胞に特有の情報が含まれる<図3>。したがって、移植腎に由来するエクソソームは尿中に多く含まれると考える。尿は体液の中でもまったく侵襲がなく採取可能な理想的サンプルであり、尿中エクソソームによる診断が可能となれば患者への恩恵は計り知れない。

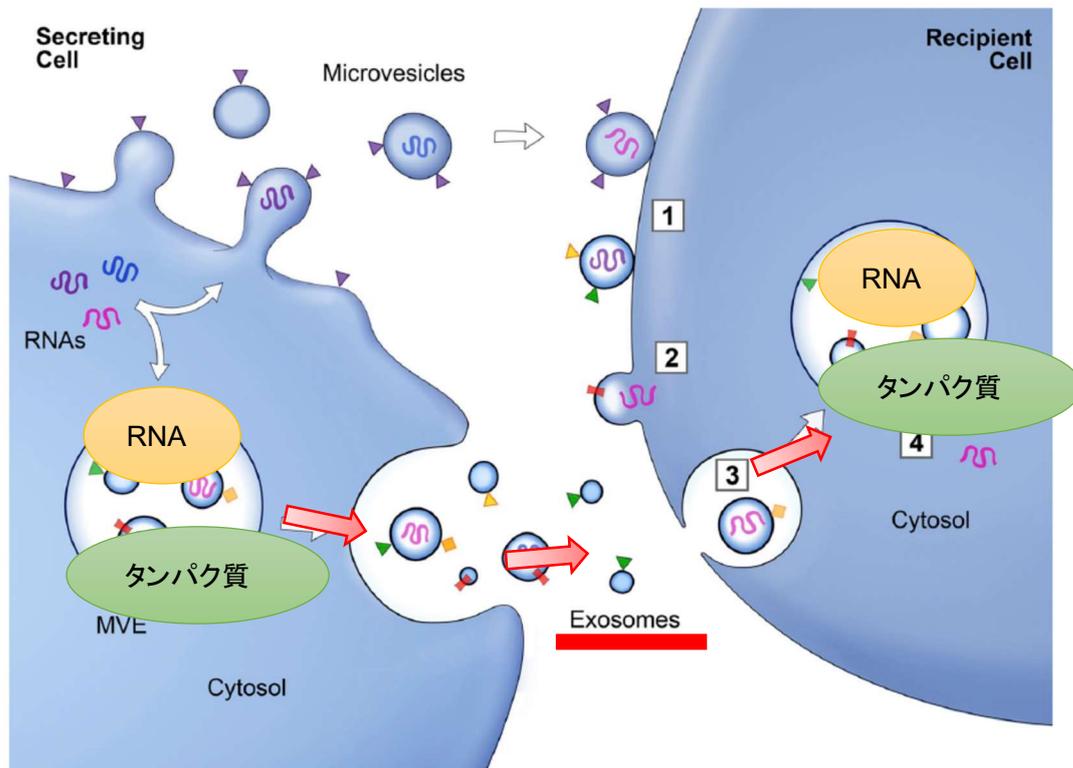


図 3. エクソソームの細胞間連絡の役割

エクソソームは、細胞が能動的に放出し、その中にはタンパク質や RNA などの放出した細胞に特有の情報が含まれる。この情報が別の細胞へ運ばれることで、受け取った細胞に機能活性をもたらす。免疫細胞やがん細胞から放出されるエクソソームに含まれるタンパク質や RNA は、バイオマーカーとなる可能性を秘めている (Raposo and Stoorvogel, 2013 より)。

4.4. 研究の目的

本研究では進行メカニズムおよび治療戦略が確立されていない CAAMR に着目した。炎症アンプおよび CAAMR を共に制御している遺伝子の解析によって、新たなバイオマーカー、さらには治療ターゲットの可能性となる候補を探索することを目的とした。候補を SYT17 として、バイオマーカーには尿中エクソソーム内の SYT17 タンパク質に注目した。

5. 対象と方法

5.1. RNA シーケンス解析

腎での炎症アンブに関わる候補遺伝子を探索するために、*in vitro* でヒト腎細胞株を用いて RNA シーケンス解析を行った。使用したヒト腎細胞株は、糸球体内皮細胞(HRGEC : human renal glomerular epithelial cell)、近位尿細管細胞(RPTEC : renal proximal tubular epithelial cell)、微小血管内皮細胞(MVEC: microvascular endothelial cell) の3種類である。IL-6 と IL-17 または TNF α により炎症アンブを刺激して、6 時間後および 24 時間後の RNA レベルを測定したこの解析は、かずさ DNA 研究所で行った。

5.2. リアルタイム PCR

SYT17 ノックダウン細胞と MOCK 細胞 (non-target コントロール細胞)に IL-6 および TNF α で刺激を与えて、単独刺激と共刺激による炎症性サイトカインの変化をリアルタイム PCR で評価した。

siRNA を用いてノックダウン細胞の作成を行った。使用した siRNA は human si-SYT17 (s28627、s28628、s28629、Thermo Fisher) と、MOCK 細胞として human si-nontarget (SIC-001、Sigma-Aldrich) である。HRGEC と RPTEC 用いた。Day 1 で、96 well plate に 1.4×10^3 cells/well で播種する。Opti-MEM (18μ l/well、Thermo Fisher) に siRNA (5μ M) 0.5μ l、Lipofectamine RNAiMAX (0.28μ l/well、Thermo Fisher) を混ぜたものを、添加してトランスフェクションを行い 1 晩培養する。Day 2 で 180μ l の DMEM (富士フィルム和光) に 10% FBS (Thermo Fisher) を混ぜた培地を追加してさらに 1 晩培養する。Day 3 で、2 時間の血清飢餓処理の後、ヒト IL-6 (R&D Systems) 100 ng/mL、可溶性 IL-6 受容体 (R&D Systems) 100 ng/mL、TNF α (50 ng/mL、PeproTech) で 3 時間刺激したのち mRNA 抽出を行なった。mRNA 抽出は SuperPrep® Cell Lysis & RT Kit for リアルタイム PCR (東洋紡ライフサイエンス) を用いて標準プロトコールに従った。cDNA の合成は M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) を用いて標準プロトコールでおこなった。

標的遺伝子の mRNA、及び内在性コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いた。測定

は、7300 fast real-time PCR システム (Applied Biosystems)と Taqman PCR master mix (Kapa Biosystems)を使用した。リアルタイム PCR で用いたプライマーの配列を表 1 に示す。

表 1. リアルタイム PCR で用いたプライマー配列の一覧

Primer name	Primer sequence (5' - 3')	
human GAPDH	Forward	CTCCTCTGACTTCAACAGCGA
	Reverse	CCAAATTCGTTGTCATACCAGGA
	Probe	GATGCCAGCCCCAGCGTCAAAGG
human IL-6	Forward	CATCCTCGACGGCATCTCAG
	Reverse	AGCCATCTTTGGAAGGTTTCAGG
	Probe	CTGCCAGTGCCTCTTTGCTGCTT
human CCL2	Forward	TCACCAATAGGAAGATCTCAGTGC
	Reverse	CCACAATGGTCTTGAAGATCACAG
	Probe	GAGAAGAATCACCAGCAGCAAGTGTCCTCCAAA
human SYT17	Forward	AAGGTTTCAGACCCCTTT
	Reverse	GGGAACTTTGAAGCTGAA
	Probe	TGGTGCATGGACTCAAACCTTGT

5.3. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

レポーター活性の測定は、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて標準プロトコールに従って行った。HEK293T 細胞を 96-well plate に 2×10^4 cells/well で播種し一晩培養した。SYT17 を含む pEF-BOS と empty vector をポリエチレンジアミン(PEI)によって細胞内へ導入した。加えて pGL4.32[luc2P/ NF κ B -RE/Hygro] (4.75 ng/well、Promega)、pGL4.32[luc2P/ IL-6 -RE/Hygro] (4.75 ng/well、Promega) 及び pGL4.74[hRluc/TK] (0.25 ng/well、Promega) も導入した。24 時間後に、TNF α (500 ng/ml、PeproTech)を加えて 6 時間反応させた。Lysis buffer (50 μ l/well) を加えて 4°C で 20 分間振盪して細胞を融解した。この細胞溶解液 5 μ l を専用プレートに注入して、ルミノメーター (GloMax[®]-Multi Detection System、Promega) で測定した。ウミシイタケルシフェラーゼ活性を内部コントロールとし、ホタルルシフェラーゼ活性との比を算出し NF κ B および IL-6 の luciferase 活性とした。

5.4. 臨床検体

2016年1月から2019年3月に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同意を得て、尿サンプルを採取した。本研究は、倫理委員会によって承認された自主臨床研究『腎移植後の慢性拒絶におけるバイオマーカーの探索に関する研究（臨床研究番号 自 014-0391）』の一環として実施した。腎移植患者のサンプルは定期移植腎生検目的の入院の際に採取したものを使用した。エピソード腎生検は、検査値の異常を認めただけに精査目的で行う。本研究では、検査値の異常をきたす前の段階での診断を目的としたため、エピソード生検の際のサンプルは除外した。尿サンプルは1500 rpmで5分間遠心し、血清サンプルは3000 rpmで10分間遠心して、上清を-80℃で保存した。腎移植患者は腎生検の結果をもとに、4つのグループ(NED: normal histology、IF/TA: interstitial fibrosis and tubular atrophy、CNI-T: calcineurin inhibitors toxicity、CAAMR)へと分け、健常ボランティアとともに5群間での検討を行った。そして、後の統計解析の項目で述べるように、各群の目標検討数を20例と設定した。

5.5. 免疫染色

SYT17 および炎症アンプ関連タンパク質の腎組織で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。すべての患者検体は、移植腎生検で得られた余剰検体を使用した。

コンパウンドに包埋され凍結保存されていたサンプルは、マイクロトーム(Leica CM3050 S、Germany)により10 μm厚で切り出し、エタノールで脱水後に、ホルムアルデヒドで固定した(Kawamoto、2003)。PBSで洗浄後に、10% BSA in PBSで1時間ブロッキングを行った。1次抗体反応として、抗SYT17抗体(1/200、Proteintech)およびRabbit IgG Isotype Control(1/5000、Cell Signaling Technology)を使用し、4℃で1晩反応させた。洗浄の後、二次抗体反応として、Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody、Alexa Fluor 546(1/1000、Life Technologies)およびHoechst

33342、Trihydrochloride、Trihydrate (1/3000、Life Technologies)を室温で1時間反応させた。洗浄の後に25%グリセロールで包埋し、蛍光顕微鏡 (BZ-9000、BIOREVO、KEYENCE) で観察した。

パラフィンに包埋された検体からマイクロームにより5-8 μm 厚で切り出した切片を40°Cの蒸留水上に浮遊させた後、スライドガラスに切片を移し一昼夜乾燥させた。キシレンで脱パラフィンを行なった後、無水エタノールで検体を完全脱水させた。超純水で洗浄した後、抗原賦活化としてクエン酸ナトリウムバッファー (pH6.0) に浸して10分間煮沸させた。スライドガラスが室温に戻った後、超純水で洗浄し、内在性酵素の不活化として3%過酸化水素水で5分間処理した。ブロッキングは VECTASTAIN ABC KIT (Vector Laboratories) を用いた標準プロトコールで行なった。一次抗体には抗リン酸化 p65 抗体(1/400、Sigma Aldrich)、抗リン酸化 STAT3 抗体(1/200、Cell Signaling Technology、Danvers、MA)、抗 SYT17 抗体 (1/10000、Proteintech) を使用し、二次抗体にはビオチン標識抗ウサギ IgG モノクローナル抗体を使用した。発色基質としては DAB (ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate Kit、Vector Laboratories) を用いた。

5.6. 尿中エクソソーム回収

尿サンプル1 ml から、MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (富士フィルム和光純薬) を用いて、キットのプロトコールにしたがいエクソソームを抽出した。抽出した尿中エクソソームサンプルは1/100量の protease inhibitor (Z-Leu-Leu-Leu-al®、Sigma Aldrich) を加えて-20°Cで保存した。

5.7. ウェスタンブロッティング法

サンプル15 μl に対して、2-メルカプトエタノールを含む SDS sample buffer を5 μl 添加し、60°Cで10分間煮沸させた。全量を5-20%濃度勾配の SDS-PAGE ゲル (富士フィルム和光純薬) へ注入して、ウェットウェスタンブロットシステム (Bio-Rad) を用いて

ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行なった。Immobilon®-P (Millipore) に SDS-PAGE により分離したゲルタンパク質を転写した。転写が終了した Immobilon®-P は、30kDa のマーカーの位置で上下に切断して、上側を SYT17 用に、下側を CD9 用とした。SYT17 側は、Pierce® Western Blot Signal Enhancer (Thermo scientific) によりシグナル増強処理を行った。非特異的タンパク質のブロッキングとして、SYT17 側は 0.5% BSA in TBS-T を、CD9 側はブロッケーヌス (KAC Co., Ltd. Japan) を用いて、室温で 1 時間反応させた。一次抗体反応として、Anti-SYT17 (HPA040811、ATLAS ANTIBODEIS) を 1/2500 濃度で Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution (東洋紡) に希釈し、インテリミキサー (トーホー) を使用して 4 °C で 1 晩反応させた。Anti-CD9 (System Biosciences) は 1/1000 で同様に希釈して heat seal bag に封入して 4 °C で 1 晩振とうして反応させた。二次抗体には horseradish peroxidase 標識抗体を用い、Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher) によって化学発光したものを、現像機 FPM100 (富士メディカルフィルム) でフィルムに感光し検出した。

5.8. 統計解析

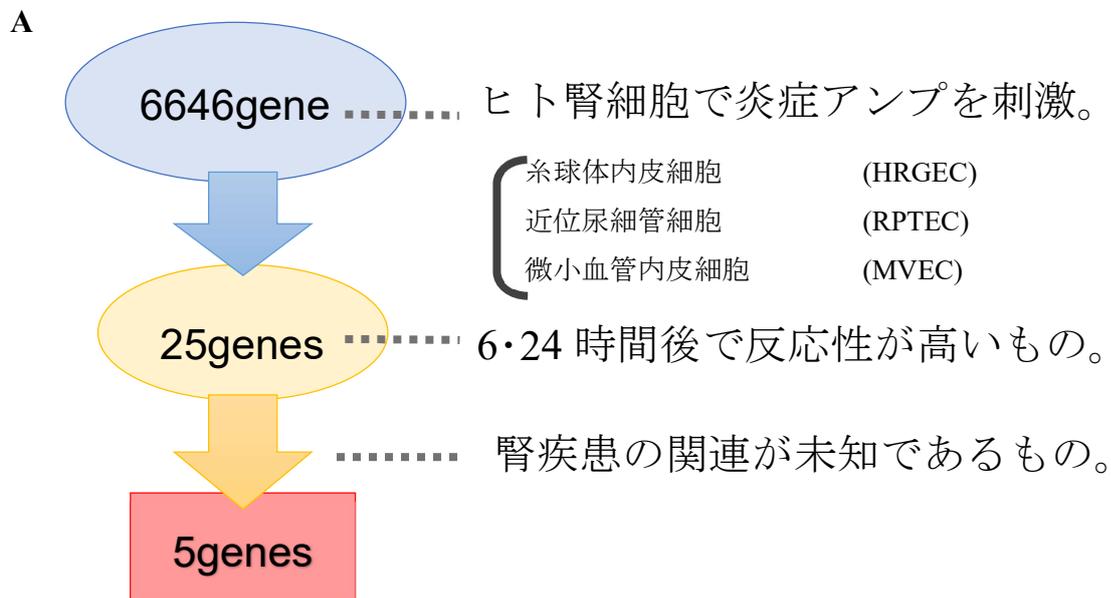
バイオマーカーとしての有用性を検討するための目標症例数は、1 群あたり 20 例を実施可能例数と設定した。この例数であれば、CAAMR 群とそれ以外の 4 群の比較でエフェクトサイズ 1.4 程度であれば、Tukey 法を用いて検出力 80%以上を担保できる。ROC (Receiver operating characteristic) 曲線は、CAAMR 群とそれ以外の 2 項分類によって定義した。

また臨床項目の検定で、2 群間の検討にはカイ二乗検定と t 検定を、3 群間以上には Tukey 検定と Dunnet 検定を用いた。すべての統計解析は JMP® 14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて、p 値は 0.05 未満のものを有意とし、*p < 0.05、**p < 0.01、及び***p < 0.001 で示した。

6. 結果

6.1. 候補遺伝子の選定

炎症アンプに対する反応を RNA シーケンス解析によって評価して候補遺伝子の選定を行った<図 4.A>。3 種類のヒト腎細胞を用いて、IL-6 および、IL-17 または TNF α によって炎症アンプを刺激した。RNA シーケンス解析によって、6646 遺伝子の単独刺激および共刺激の際の反応を評価した。刺激後 6 時間および 24 時間後で、共刺激時の反応が、単独刺激よりも高い 25 遺伝子へしぼった。これらは IL-6・CCL20 と同様に、炎症アンプの機構が働いた結果、産生される炎症サイトカインであると考えられる<図 4.B>。それぞれの遺伝子について文献検索を行い、腎疾患との関連が報告されていない 5 つの遺伝子を検討対象とした。



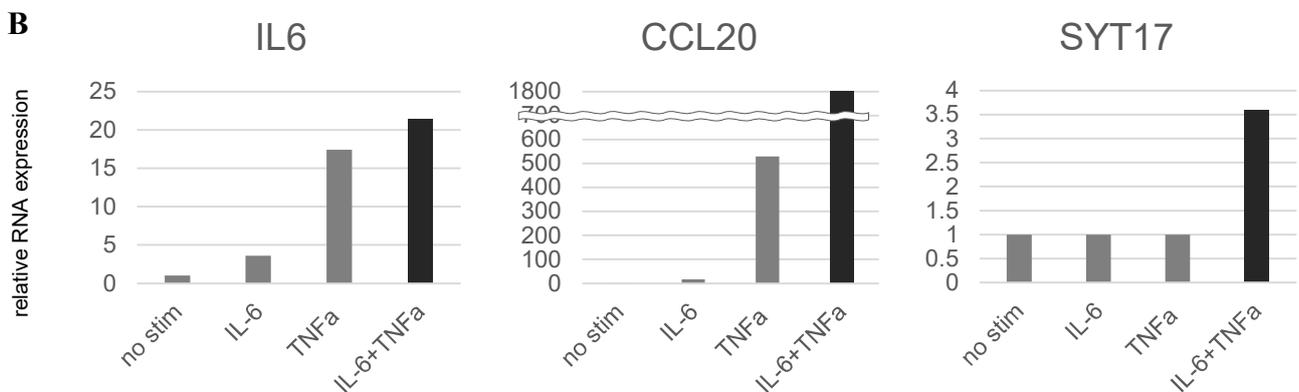


図 4. RNA シーケンス解析による候補遺伝子の選定

- A: RNA シーケンス解析による候補遺伝子の選定のフローチャートを示す。
- B: RPTEC による 24 時間での RNA シーケンス解析の測定結果を示す。

炎症アンプとの関連を調べるために、それぞれの遺伝子を siRNA によってノックダウンし、リアルタイム PCR で評価した。評価対象は、炎症アンプが動いた際に産生される炎症性サイトカインのうち、IL-6 と CCL2 を用いた。これらのサイトカインの、遺伝子ノックダウンによる変化を比較することで、間接的に、炎症アンプへの関連の程度を評価することができる。ノックダウンに用いた siRNA は、それぞれの遺伝子毎で、一部の配列が異なる 3 種類を使用した(S1:s28627, S2:s28628, S3:s28629, Thermo Fisher)。1 種類だけでは、影響の程度の評価が不十分となるためである。そして、3 種類の siRNA うち、2 種類以上で炎症性サイトカイン産生の抑制効果がある遺伝子を候補遺伝子とした<図 5>。

最終的に 5 つのうち、腎臓での炎症アンプへの影響が最も強いと考えられる SYT17 (Synaptotagmin17) を候補とした。

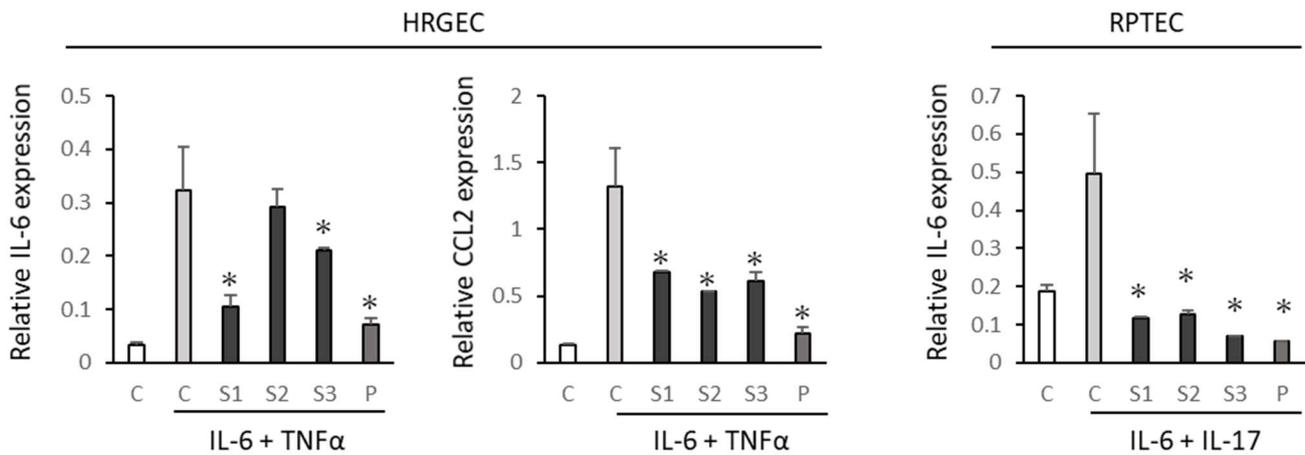


図 5. ヒト腎細胞における SYT17 ノックダウンによる炎症サイトカインの産生低下

糸球体内皮細胞(HRGEC : human renal glomerular epithelial cell)と、近位尿管細胞(RPTEC : renal proximal tubular epithelial cell)を用いて、SYT17 を siRNA によってノックダウンした際の、IL-6・CCL2 の mRNA レベルの結果を示す。それぞれの siRNA は、C : ネガティブコントロール、S1~S3 : SYT17、P : ポジティブコントロール (NF κ B) である。すべての mRNA レベルは GAPDH との比である。*は刺激を与えたネガティブコントロールをターゲットとした Dunnett test による $p < 0.05$ を示す。

6.2. SYT17 の in vitro での機能評価

SYT17 の機能活性を評価するため、①ルシフェラーゼレポーターアッセイ、②リアルタイム PCR、③ウェスタンブロッティング法を行った。

まず①ルシフェラーゼレポーターアッセイで、SYT17 の導入によって NFκB と IL-6 の発現活性がどのように変化するかを評価した。SYT17 の導入によって、TNFα の刺激がない状態でも NFκB と IL-6 の発現活性が高まった。そして、TNFα 刺激を行うことで、その活性は顕著となった<図 7>。このことは、SYT17 が炎症アンプの正のレギュレーターとして働き、NFκB と IL-6 の発現を増幅していることを示唆する。

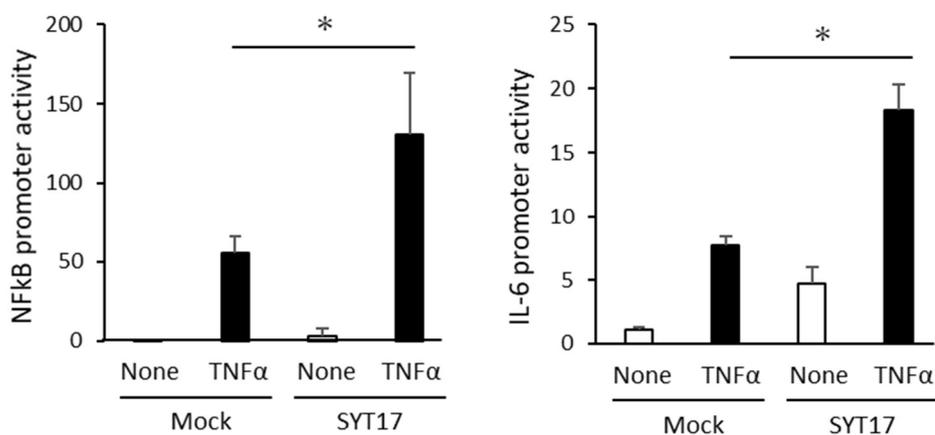


図 6. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

SYT17 の過剰発現の有無および TNFα 刺激の有無による、NFκB と IL-6 の発現活性の変化を示す。*は t test による $p < 0.05$ を示す。

上記の 6.1.「候補遺伝子の選定」の項目で、siRNA によって SYT17 をノックダウンすることで、炎症サイトカインの IL-6 と CCL2 の産生が抑制されることを示した。では、実際に siRNA によって SYT17 がどの程度抑制されているのかを、RNA レベルでの測定をリアルタイム PCR で評価した。しかし、種々のプライマーおよび細胞株を用いたが、SYT17 自体を測定することは叶わなかった。タンパク質レベルでは評価可能かとも考えて、③ウェスタンブロッティング法でも試行錯誤を行ったが、測定は困難であった。このことは、in vitro では SYT17 の発現が極めて少ないことを示す。したがって、siRNA による SYT17 の抑制効率の程度を評価することはできなかった。

以上の結果から、SYT17 は何らかのパスウェイを介して炎症アンプの正のレギュレーターとして働いているが、in vitro では発現が微小であり評価困難であることがわかった。治療薬の開発には in vitro での評価が必須であるが、SYT17 では困難だった。

6.3. 移植腎での SYT17 と炎症アンプ関連タンパク質の発現

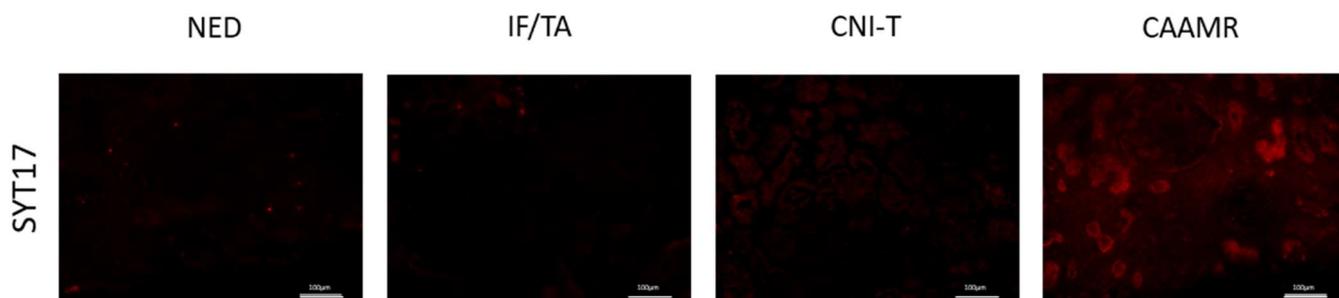
生体内の SYT17 の発現を評価するために、移植腎生検サンプルを用いて免疫染色を行った。凍結サンプル免疫染色で、明らかに CAAMR 群で SYT17 タンパク質が強く発現していた<図 7.A>。各群 6 例ずつ、ImageJ を用いて蛍光強度を数値化し検討した結果、統計学的有意差をもって CAAMR 群で SYT17 タンパク質が多いことが明らかになった<図 7.B>。さらに、腎組織内での発現部位を観察すると、糸球体ではなく、尿細管細胞に強く発現していた<図 7.C>。さらに観察倍率を拡大すると細胞内での発現は、核ではなく、細胞質に強いことが分かった<図 7.D>。

また、炎症アンプに関わるタンパク質として、リン酸化 NFκB (p-P65) とリン酸化 STAT3 (p-STAT3) の免疫染色も行った。CAAMR サンプルの尿細管細胞のみで、p-P65 と p-STAT3 の同時発現が確認された<図 8>。このことは、慢性拒絶反応の炎症によって、尿細管細胞が首座となって炎症アンプが動いていることを示す。

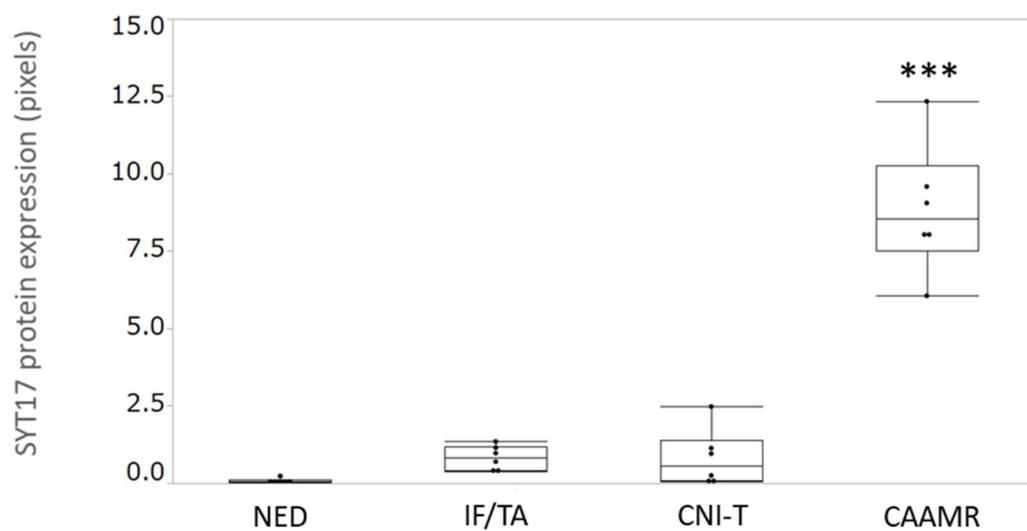
以上の結果から、ヒト生体内で SYT17 および炎症アンプ関連タンパク質は、CAAMR の尿細管細胞に強く発現していた。これは、

慢性拒絶反応による炎症の結果、移植腎の尿細管細胞で炎症アン
プが活性化して SYT17 が発現したことを示唆していると考ええる。

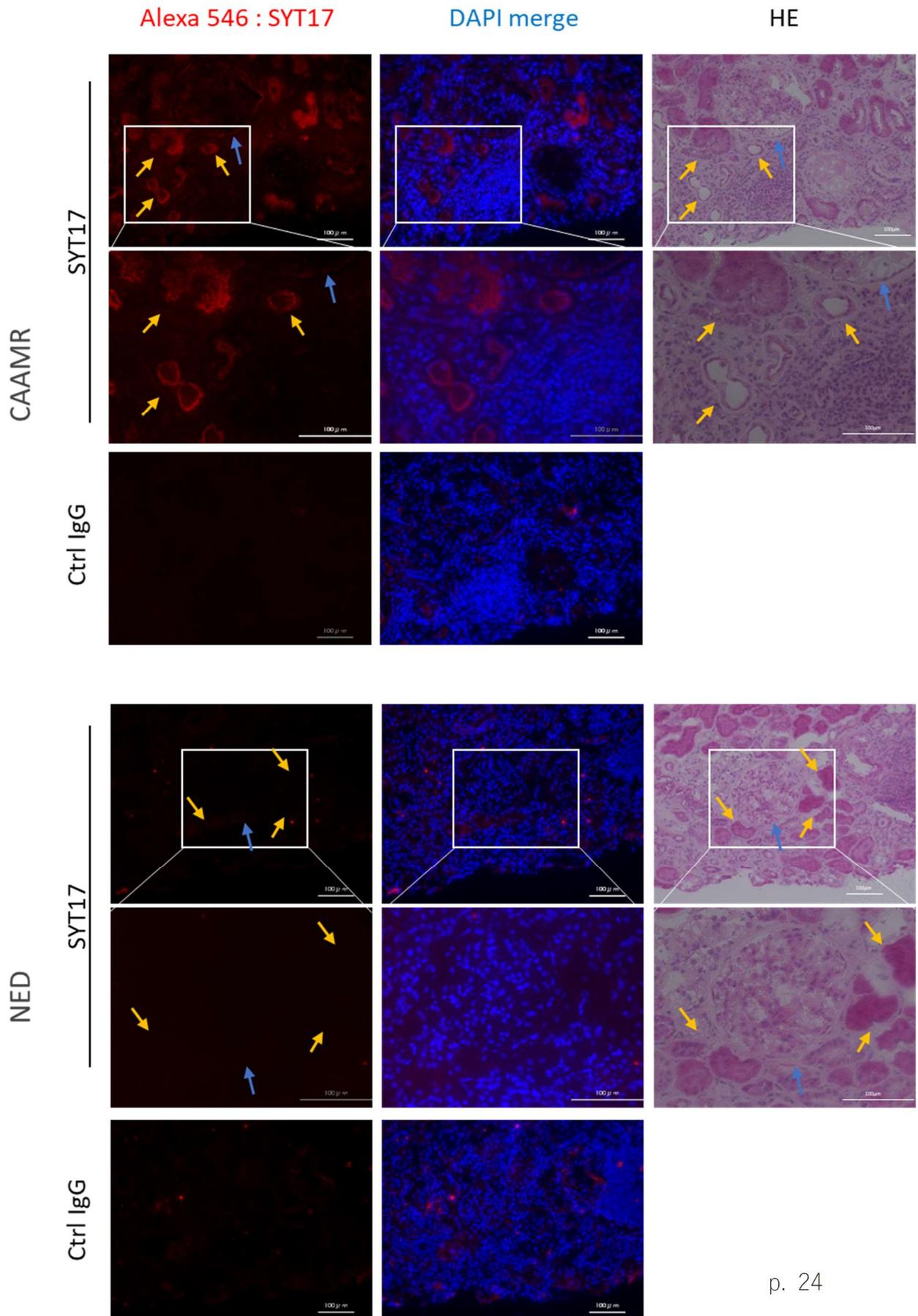
A



B



C



D

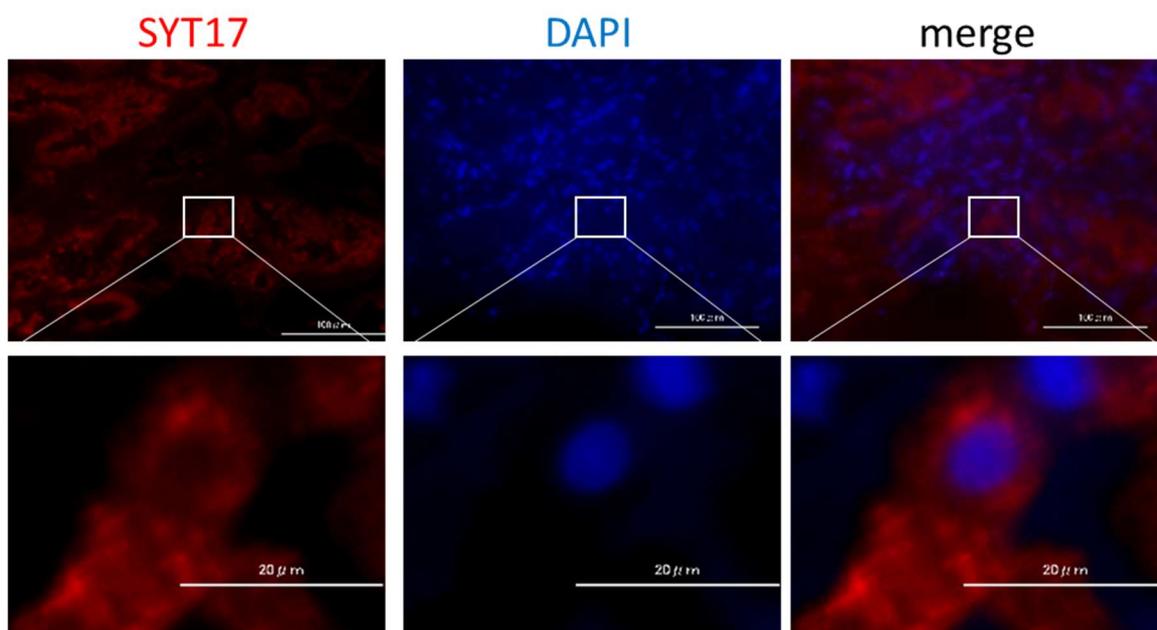


図 7. SYT17 の移植腎生検免疫染色

A: 各移植患者群での SYT17 免疫染色の代表像を示す。**B:** 各移植患者群 6 例ずつ検討した結果の中央値を示す。蛍光強度は ImageJ によって数値化を行った。***は Tukey 検定による $P < 0.01$ を示す。**C:** CAAMR と NED サンプルによる、SYT17 タンパク質の腎組織の局在を示す。黄色矢印(→)は尿細管を、青色矢印(→)は糸球体を示す。A~C までのスケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。**D:** CAAMR サンプルによる SYT17 タンパク質の細胞内での局在を示す。スケールバーは、上段が $100\mu\text{m}$ を、下段が $20\mu\text{m}$ を示す。

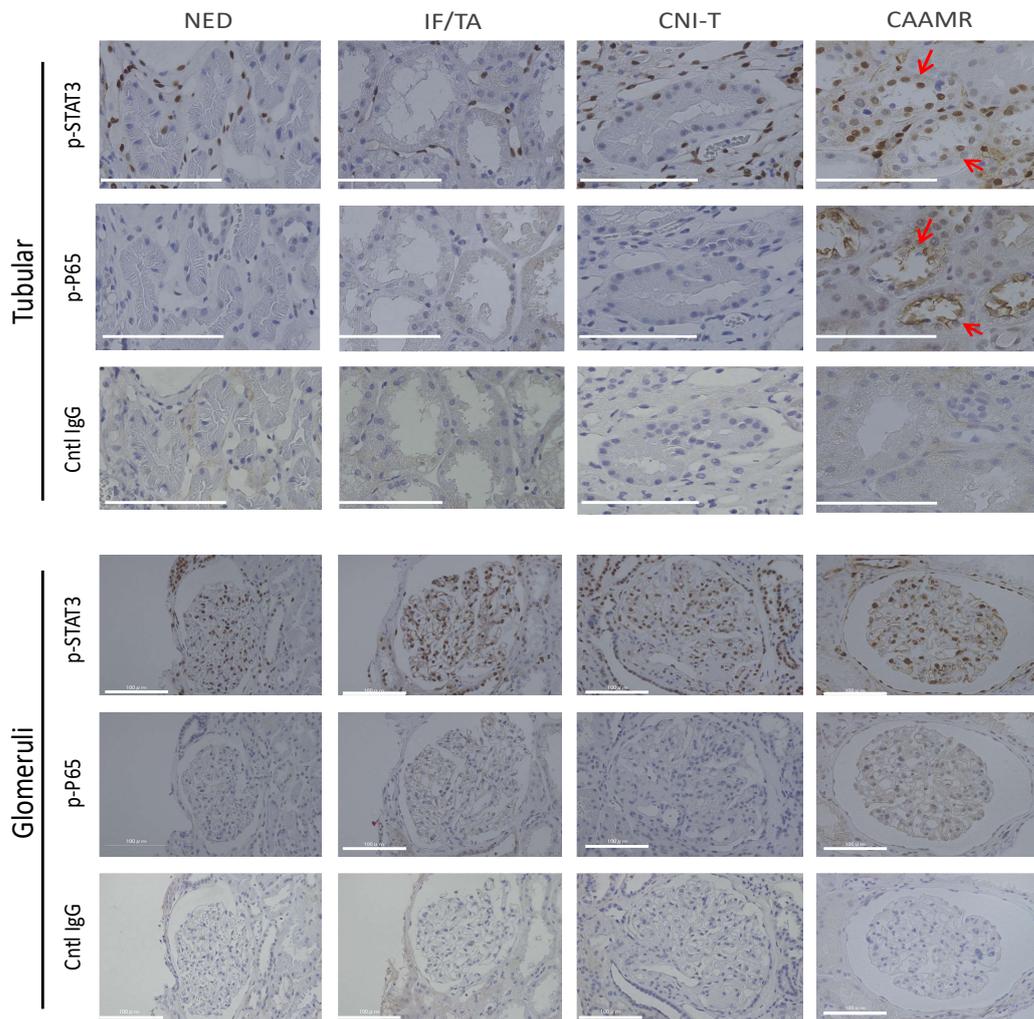


図 8. 移植腎生検サンプルの炎症アンプ関連タンパク質の免疫染色
 移植腎生検パラフィン切片による p-P65 と p-STAT3 の免疫染色結果を示す。赤矢印 (→) は、p-P65 と p-STAT3 が共に発現している細胞を示す。スケールバーは 100 μ m を示す。

6.4. 尿中エクソソーム SYT17 タンパク質の有用性

最後に、SYT17 が CAAMR の診断バイオマーカーとして有用であるのかを評価した。尿サンプルを用いて、SYT17 タンパク質をウェスタンブロッティング法によって測定した。

はじめに、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 タンパク質を測定することはできなかつた<図 9.A>。

その一方で、尿中エクソソームでは、CAAMR 症例のサンプルのみで SYT17 タンパク質の強い発現を確認できた<図 9.B>。異なるフィルムどうしでの比較のため、ImageJ によってバンドの数値化を行った。エクソソームの内在性コントロールとして CD9 を用いた(Mathivanan and Simpson, 2009; Mathivanan, Ji and Simpson, 2010; Record *et al.*, 2011; Vago and Salonia, 2019)。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り、CD9 に不均一性が認められた。したがって、SYT17 の発現量の比較には SYT17/CD9 比を用いた<図 9.C>。さらに、実験ごとの抗体反応や感光条件の不均衡を是正するために、ある CAAMR 患者の同一サンプルをポジティブコントロールとして毎回用いた。

各群 20 例を目標症例数と設定して、CD9 が認められない症例、すなわちエクソソーム回収不良例を除いた 98 例で検討を行った。CAAMR 群のみで、統計学的有意差をもって SYT17/CD9 比が高値であった<図 10.A>。ROC 曲線では、AUC0.82 (intermediate accuracy) で、カットオフ値が 0.42、感度 77%、特異度 87%の結果であった<図 10.E>。現在臨床で使用でき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。これらのバイオマーカーで、CAAMR 群と他群で有意差を示すことのできるものはなかつた<図 10.B~E>。加えて、SYT17/CD9 比と有意な相関関係があるものはなかつた<図 10.F>。これらのデータは、SYT17 であれば現在の臨床検査で区別できない CAAMR 患者を区別・診断できるという新規性を示唆している。

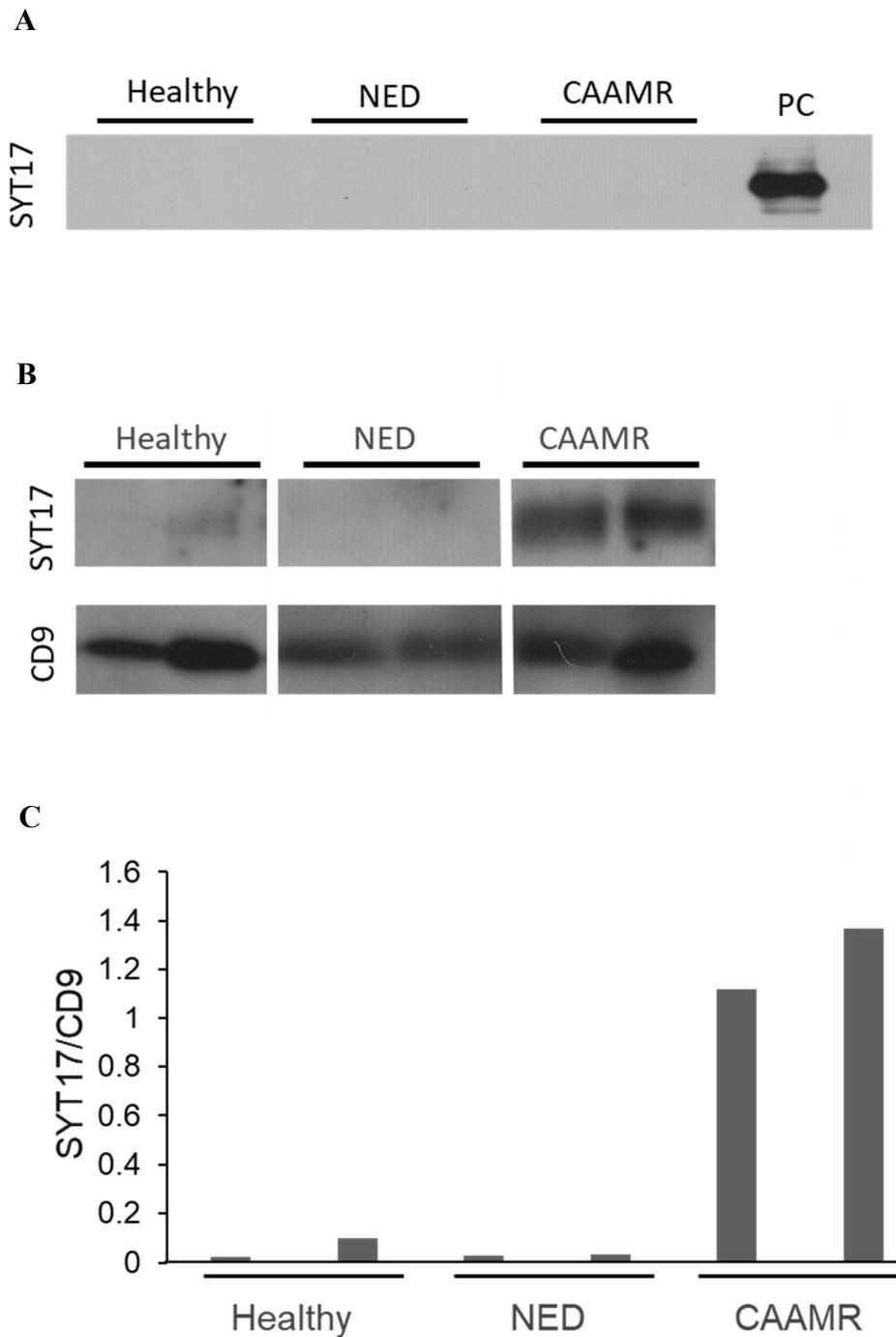
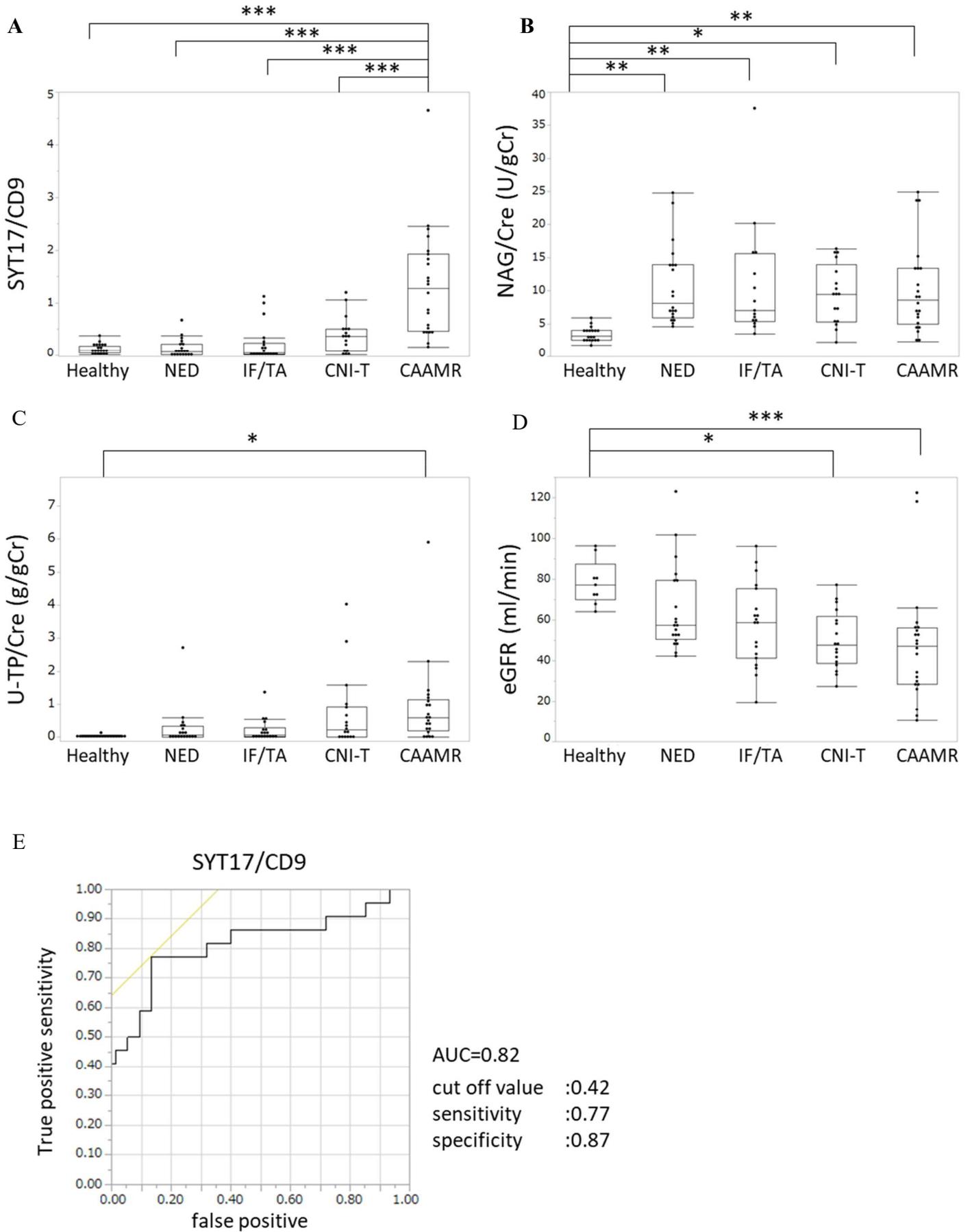


図 9. 尿サンプルによる SYT17 タンパク質の測定

A: 未処理の状態の尿サンプル (whole urine) での結果を示す。PC (Positive control) は SYT17 を過剰発現させた HEK293T 細胞の溶解液である。**B:** 尿中エクソソームサンプルの結果を示す。CD9 はエクソソームの内源性コントロールである。**C:** ImageJ を用いて **B** のバンドを数値化し、SYT17/CD9 比によってグラフ化した結果を示す。



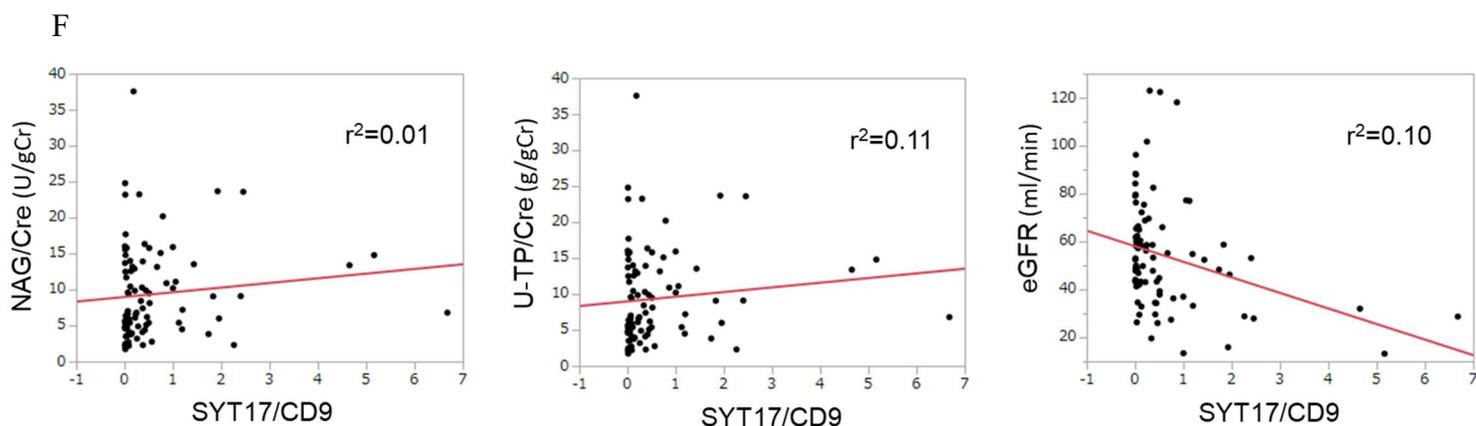


図 10. 尿中エクソソーム内 SYT17 タンパク質の CAAMR 診断バイオマーカーとしての有用性

A~D: 健常ボランティアと各移植患者群のそれぞれのバイオマーカーの結果を示す。(A:SYT17/CD9、B:NAG、C:尿蛋白、D:eGFR) 統計学的有意差は Tukey 検定によって * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、及び*** $p < 0.001$ で示した。**E:** SYT17/CD9 比の ROC 曲線を示す。**F:** SYT17/CD9 比と現在のバイオマーカーの相関関係を示す。

7. 考察

我々の知る限りでは“急性”拒絶反応に対するバイオマーカーの文献は散見されるが(Lorenzen *et al.*, 2011; Pisitkun *et al.*, 2012; Lo, Kaplan and Kirk, 2014a; Camp *et al.*, 2015; Merhi, 2015; Park *et al.*, 2017, 2018; Salvadori and Tsalouchos, 2017)。“慢性”拒絶反応ならび CAAMR についてのバイオマーカーの報告は本研究が初めてである。

NIH の Biomarkers Definitions Working Group によるとバイオマーカーは”A characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention.”と定義されている(Atkinson *et al.*, 2001)。現在使用できるバイオマーカーには、NAG・尿蛋白・eGFR があげられる。しかし、いずれも疾患特異性は低く、病勢が進行した状態になって初めて異常値をきたす(Miranda *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2017)。よって厳密に言えば、これらの検査は、上記の定義には当てはまらない。特に、CAAMR は緩徐に進行するため現在の検査によるモニタリングでは不十分である(Josephson, 2011)。さらに、病理学的には拒絶の診断であるが検査値に異常を認めず、病理と検査が解離している “subclinical rejection”の症例も経験する(Lo, Kaplan and Kirk, 2014b)。したがって、病勢を反映するバイオマーカーの登場が望まれている。

現在、CAAMR を含めた腎疾患の診断において、腎生検はゴールドスタンダードである。しかし針生検は、①病巣が採取できていないサンプリングエラーの可能性や、②合併症の問題がある(Tøndel *et al.*, 2012; Lo, Kaplan and Kirk, 2014b; Mischak, 2015; Zijlstra and Stoorvogel, 2016)。①サンプリングエラーの問題に関しては言えば、針生検のサンプル量が腎全体に対して極少量であることが原因である。これに対して、尿や血液は、腎全体の状態を均一に反映していると考えられている(Lo, Kaplan and Kirk, 2014a)。また、診断バイオマーカーには、低コストで、正確に、繰り返し施行できること、が求められる(Califf, 2018)。腎生検では、コストと合併症の懸念からこれらを満たすことは難しい。その一方で、尿や血液による検査であればこの3つの条件すべてを満たすことが可能である。特に尿は、体液の中でも全く侵

襲なく採取できる理想的なサンプルである。加えて血液は、腎以外の多くの臓器からのノイズが含まれる。よって、CAAMR を診断するためのサンプルは、尿が最適である(Van Balkom *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2017)。Whole urine では CAAMR と他の群の区別をできなかつた<図 10.A>。Whole urine には血清由来の蛋白質が約 30%含まれる。また、Tamm-Horsfall 蛋白やウロビリノーゲンなどの修飾を受け、微量蛋白は正確に測定できない可能性が言われている(Pisitkun *et al.*, 2006)。その一方で、エクソソーム内のタンパク質ではこの懸念は少なく、30 倍の感度で測定が可能である(Van Balkom *et al.*, 2011)。

エクソソームは細胞から能動的に放出される径 100nm 程度の細胞外小胞である。1967 年に P.Wolf によって、“Platelet Products”として初めて報告された(Wolf, 1967)。1981 年に E.G.Trans によって、「エクソソーム」と名付けられた(Trans *et al.*, 1981)。細胞と細胞どうしの情報伝達の役割を担っていると考えられ、エクソソームの中には RNA やタンパク質などの情報物質が含まれている。この情報物質は、エクソソームの脂質膜によって守られ、遠くまで安定的に運ばれる(Hill *et al.*, 2013; Perez-Hernandez *et al.*, 2015; Pitt, Kroemer and Zitvogel, 2016; Tkach and Théry, 2016; Karpman, Ståhl and Arvidsson, 2017)。含まれる情報物質は、放出する細胞毎に異なっている。そこで、リキッドバイオプシーの分野では、がん細胞などの疾患に特異的な細胞や、免疫細胞が放出するエクソソームに含まれる情報がバイオマーカーとして有用性であると期待されている(Robbins, Dorransoro and Booker, 2016)。エクソソームは、尿・血液などのすべての体液中に含まれ、それぞれの体液に接する上皮細胞から放出されると考えられている(Pisitkun, Shen and Knepper, 2004; Robbins, Dorransoro and Booker, 2016)。具体的には、尿中エクソソームを放出するのは、尿に接する組織であり、腎、尿管および膀胱（男性であれば前立腺）があげられる(Lauzurica-Valdemoros *et al.*, 2015; Karpman, Ståhl and Arvidsson, 2017)。尿中エクソソームがどの臓器からどの程度の割合で放出されるのかを明確に示した文献はない。Whole urine の蛋白は 70%が腎に由来しているため(Thongboonkerd *et al.*, 2002; Thongboonkerd and Malasit, 2005)、尿中エクソソームに含まれる蛋白も腎に由来しているものが多いと推察される。したがって、腎移植患者の尿中エクソソームは、移

植腎に由来するものが多いと考える。実際に、Pisitkun らは健常者の尿中エクソソームのプロテオミクス解析で、尿中エクソソームの多くが腎遠位尿管細胞に由来していることを報告している(Pisitkun, Shen and Knepper, 2004; Smalley *et al.*, 2008)。我々の研究でも、SYT17 は CAAMR 群の遠位尿管細胞に発現していることが確認され、この既報を支持すると言える。

尿エクソソームの回収は、ISEV (International Society for Extracellular Vesicles) のプロトコールにしたがった(Witwer *et al.*, 2013)。特に、H.Zhou らは尿中エクソソームの回収方法について、①尿の保存の際にプロテアーゼインヒビターを入れること、②-80°Cで保存すること、③十分にボルテックスを行ってから回収することを推奨していた(Dear *et al.*, 2006)。我々は、①を行なわなかったが、最長 2.5 年保存されたサンプルでも、評価に問題なかった。エクソソーム回収のゴールドスタンダードは超遠心法である(Dear *et al.*, 2006; Smalley *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2010; Pisitkun *et al.*, 2012; Hill *et al.*, 2013; Camp *et al.*, 2015; Perez-Hernandez *et al.*, 2015; Oosthuyzen *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2017, 2018)。しかし、10ml から 200ml と多量のサンプルを必要とすること、回収までの手順が煩雑であることが問題である。我々は、PS アフィニティー法を用いたキットを使用した(Miyatake *et al.*, 2016)。尿 1ml のみからでも、評価に適するエクソソームの回収が可能であった。

Liquid biopsy の分野の多くの報告で、RNA シーケンスと Mass Spectrometry によるバイオマーカーの同定を行っている(Pisitkun, Shen and Knepper, 2004; Smalley *et al.*, 2008; Pisitkun *et al.*, 2012; Hill *et al.*, 2013; Camp *et al.*, 2015; Nazari-Jahantigh *et al.*, 2015; Perez-Hernandez *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2018)。しかしこれらは特殊な機器を必要とするため、限られた施設でしかできず、汎用性が乏しいと考えられる。加えて、すべての薬剤のターゲットはタンパク質であり(Mischak, 2015)、治療ターゲットとしての評価に抗体を用いる必要がある(WANG *et al.*, 2005)。このうち、最も簡便なのが Western blotting 法である。本研究では Western blotting 法によって SYT17 が CAAMR 患者で強く発現していることを証明した。このことは、CAAMR の治療ターゲットの探索にも布石を投じたと考える。

だが、我々の研究の一部分が、CAAMR ないし腎疾患の治療と関連する報告がある。1 つ目に、J.Choi らは IL-6 受容体抗体が CAAMR 患者の腎予

後を改善したと報告し、IL-6 活性経路が新たな治療アプローチとなりえる可能性を言及している(Choi *et al.*, 2017)。炎症アンプにかかわる遺伝子群は、IL-6 が起点となり活性化されるため、同様の機序で CAAMR 治療のターゲットとなるポテンシャルを持つと思われる。2つ目に、エクソソームと腎疾患の関連についての 2 種類の報告がある。まず、腎の炎症疾患の形成に Rab27 経路を介し産生されるエクソソームの関連が報告されている(Lee *et al.*, 2017; Lv *et al.*, 2018)。続いて、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell) に由来するエクソソームが、急性腎障害モデルでの障害を回復させることが報告されている(Collino *et al.*, 2009, 2012)。これらの報告から、CAAMR の病態形成にはエクソソームが関連していることが予想される。移植腎由来のエクソソームの解析が、新しい治療法の開発の道を開くと信じる。

我々の研究にはいくつかの Limitation がある。まず1つ目は、CAAMR は DSA によって発症すると一般的に考えられている。DSA は血流にのって腎に持ち込まれるので、腎でのファーストコンタクトは糸球体上皮細胞のほずである。しかし、SYT17 は尿細管上皮細胞で発現しており、解離がみられる。この解離には、エクソソームを介した、腎における情報のダウンストリームの関与を考える<図 11>。すなわち、DSA によって糸球体上皮細胞に微小な炎症が生じる。この炎症の情報を含んだエクソソームが、糸球体上皮細胞から尿中に放出される。このエクソソームは尿によって流されて、下流の尿細管まで届き、尿細管上皮細胞に取り込まれることで SYT17 が産生されたと考える(Van Balkom *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2013)。2つ目に、尿中エクソソームは希釈の影響によって、回収に偏りを生じる(Zijlstra and Stoorvogel, 2016)。したがって、用いるサンプルは最も濃縮されている早朝尿が望ましい。3つ目は、CAAMR でも SYT17 の発現が低い症例を認めた。炎症アンプを介さない他のパスウェイによって CAAMR が形成された可能性を考える。最後に、観察期間内に CAAMR を新規で発症した症例がないため、経時変化が不明である。

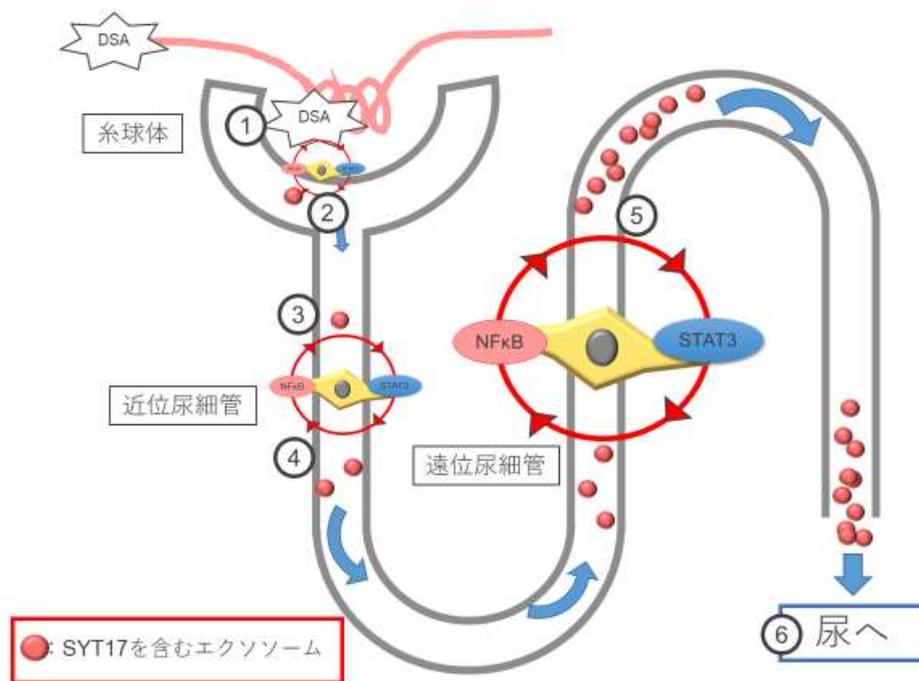


図 11. 本研究の仮説の模式図

- ①血流にのった DSA が糸球体上皮細胞に付着して微小な炎症を起こす。
- ②この炎症を契機として上皮細胞の炎症アンプが活性化して、SYT17 を含むエクソソームが産生され、尿中へ放出される。
- ③尿の流れにしたがって、エクソソームは下流へ移動して、尿に接する上皮細胞に取り込まれる。
- ④炎症の情報を含むエクソソームを取り込んだ上皮細胞では、炎症アンプが活性化される。
- ⑤下流になるにしたがって、上記③と④の過程が繰り返されて、炎症アンプの活性化が増幅される。
- ⑥最終的に、尿中にも炎症の情報を含むエクソソームが放出される。

8. 結論

①本研究全体から得られた新知見

本研究によって、尿中エクソソーム内の SYT17 蛋白質が、腎移植後慢性活動性抗体関連型拒絶反応 (CAAMR) の診断バイオマーカーとなる可能性を明らかにした。

②新知見の意義

本研究は、これまで存在しなかった CAAMR の診断バイオマーカーの発見への大きな一歩であると考えられる。

さらに我々の研究には2つの強みがある。1つ目は、ヒトのサンプルによって CAAMR を区別できたことである。2つ目は、抗体ベースの実験として最も単純な Western blotting 法によって評価が可能であったことである。これは、今後の治療薬の開発に必要な抗体ベースの評価への布石と信じる。

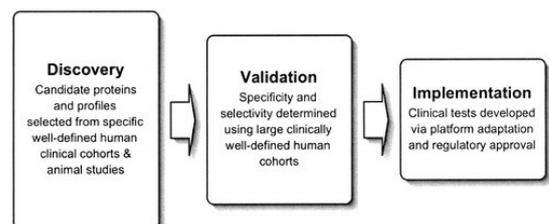
③今後の研究展開

複数のマーカーによる診断精度の向上が期待される(Atkinson *et al.*, 2001; Zijlstra and Stoorvogel, 2016)。その候補となる遺伝子の抽出には、炎症アンプに関わるものからの選定することが効率的と考える。新たな炎症アンプに関わる遺伝子であれば、診断バイオマーカーと治療ターゲットの双方の条件を満たす可能性があるため、さらなる研究が求められる。

④今後の課題

CAAMR は長期にわたる問題のため、さらなる長期間の観察が望まれる。また、バイオマーカーの実用までには3つの段階が存在する。すなわち、発見 (discovery) → 検証 (validation) → 実施 (implementation) と、評価を行う必要がある<図 12>(Granger *et al.*, 2004)。我々の研究はまだ発見 (discovery) の段階であり、検証および実施の次のステージへと進む必要がある。

図 12 バイオマーカーの臨床使用までに必要な3段階(Granger *et al.*, 2004)



9. 謝辞

稿を終えるにあたり、研究の機会を与えて頂いた北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学教室教授 篠原信雄先生に謝意を表します。

本研究全般にわたり直接ご指導ご鞭撻賜りました北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学の村上正晃教授に深く感謝いたします。加えて、基礎的な部分から直接のご指導を頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学講師 上村大輔先生、同助教 田中勇希先生に心から感謝いたします。さらに、各種研究材料を提供して頂きました北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学教室講師 岩見大基先生と堀田記世彦先生に深く感謝致します。

最後に本研究を遂行するにあたり、ご助言・ご協力・ご支援頂きました北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学教室および遺伝子病制御研究所分子神経免疫学の全ての皆様に心より御礼申し上げます。

10. 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

11. 引用文献

- Arima, Y. *et al.* (2012) ‘Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier’, *Cell*, 148(3), pp. 447–457.
- Atkinson, A. J. *et al.* (2001) ‘Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework’, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), pp. 89–95.
- Atsumi, T. *et al.* (2002) ‘A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis’, *Journal of Experimental Medicine*, 196(7), pp. 979–990.
- Atsumi, T. *et al.* (2014) ‘Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology’, *Cancer Research*, 74(1), pp. 8–14.
- Van Balkom, B. W. M. *et al.* (2011) ‘Exosomes and the kidney: Prospects for diagnosis and therapy of renal diseases’, *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 80(11), pp. 1138–1145.
- Califf, R. M. (2018) ‘Biomarker definitions and their applications’, *Experimental Biology and Medicine*, 243(3), pp. 213–221.
- Camp, D. G. *et al.* (2015) ‘Perturbations in the Urinary Exosome in Transplant Rejection’, *Frontiers in Medicine*, 1(January), pp. 1–10.
- Chen, C. and Jonas, P. (2017) ‘Synaptotagmins: That’s Why So Many’, *Neuron*. Elsevier Inc., 94(4), pp. 694–696.
- Choi, J. *et al.* (2017) ‘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.’, *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 17(9), pp. 2381–2389.
- Collino, F. *et al.* (2009) ‘Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles Protect Against Acute Tubular Injury’, *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(5), pp. 1053–1067.
- Collino, F. *et al.* (2012) ‘Microvesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Enhance Survival in a Lethal Model of Acute Kidney Injury’, *PLoS ONE*, 7(3), p. e33115.
- Dear, J. W. *et al.* (2006) ‘Collection, storage, preservation, and normalization of

human urinary exosomes for biomarker discovery', *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 69(8), pp. 1471–1476.

Djamali, A. *et al.* (2014) 'Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: Current status and novel approaches', *American Journal of Transplantation*, 14(2), pp. 255–271.

Fang, D. Y. P. *et al.* (2013) 'Exosomes and the kidney: Blaming the messenger', *Nephrology*, 18(1), pp. 1–10.

Friedrich, M. J. (2017) 'Going with the flow: The promise and challenge of liquid biopsies', *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 318(12), pp. 1095–1097.

Fujita, M. *et al.* (2019) 'NEDD4 Is Involved in Inflammation Development during Keloid Formation', *Journal of Investigative Dermatology*. The Authors, 139(2), pp. 333–341.

Granger, C. B. *et al.* (2004) 'National Heart, Lung, and Blood Institute Clinical Proteomics Working Group Report', *Circulation*, 109(14), pp. 1697–1703.

Han, K. H. *et al.* (2007) 'Differential regulation of B/K protein expression in proximal and distal tubules of rat kidneys with ischemia-reperfusion injury', *Am J Physiol Renal Physiol*, 292(1), pp. F100–6.

Harada, M. *et al.* (2015) 'Temporal Expression of Growth Factors Triggered by Epiregulin Regulates Inflammation Development', *The Journal of Immunology*, 194(3), pp. 1039–1046.

Hill, A. F. *et al.* (2013) 'Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine', *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 86(2), pp. 433–444.

Japanese Society of Nephrology (2018) 'Evidence-based Clinical Practice Guideline for CKD 2018', *Clinical and Experimental Nephrology*, pp. 346–423.

Josephson, M. A. (2011) 'Monitoring and managing graft health in the kidney transplant recipient', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6(7), pp. 1774–1780.

Kalluri, R. (2016) 'The Biology and Function of Urine Exosomes in Bladder Cancer', *The Journal of Clinical Investigation*, 4(2010), p. 2362.

Karpman, D., Ståhl, A.-L. and Arvidsson, I. (2017) 'Extracellular vesicles in renal disease.', *Nature reviews. Nephrology*. Nature Publishing Group, 13(9), pp. 545–562.

Kawamoto, T. (2003) 'Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections', *Arch Histol Cytol*. Available at:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/aohc/66/2/66_2_123/_pdf.

Lauzurica-Valdemoros, R. *et al.* (2015) 'Urinary Extracellular Vesicles as Source of Biomarkers in Kidney Diseases', *Frontiers in Immunology*, 6(January), pp. 1–10.

Lee, J. *et al.* (2012) 'IL-6 Amplifier, NF- B-Triggered Positive Feedback for IL-6 Signaling, in Grafts Is Involved in Allogeneic Rejection Responses', *The Journal of Immunology*, 189(4), pp. 1928–1936.

Lee, J. *et al.* (2013) 'IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation', *International Immunology*, 25(5), pp. 319–332.

Lee, S.-H. *et al.* (2017) 'Rab27-Dependent Exosome Production Inhibits Chronic Inflammation and Enables Acute Responses to Inflammatory Stimuli', *The Journal of Immunology*, 199(10), pp. 3559–3570.

Lo, D. J., Kaplan, B. and Kirk, A. D. (2014a) 'Biomarkers for kidney transplant rejection.', *Nature reviews. Nephrology*. Nature Publishing Group, 10(4), pp. 215–25.

Lo, D. J., Kaplan, B. and Kirk, A. D. (2014b) 'Biomarkers for kidney transplant rejection', *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group, 10(4), pp. 215–225.

Van Loon, E., Lerut, E. and Naesens, M. (2017) 'The time dependency of renal allograft histology', *Transplant International*, 30(11), pp. 1081–1091.

Lorenzen, J. M. *et al.* (2011) 'Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients', *American Journal of Transplantation*, 11(10), pp. 2221–2227.

Lv, L.-L. *et al.* (2018) 'Exosomal CCL2 from Tubular Epithelial Cells Is Critical for Albumin-Induced Tubulointerstitial Inflammation', *Journal of the American Society of Nephrology*, p. ASN.2017050523.

Mathivanan, S., Ji, H. and Simpson, R. J. (2010) 'Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication', *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V., 73(10), pp. 1907–1920.

Mathivanan, S. and Simpson, R. J. (2009) 'ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA', *Proteomics*, 9(21), pp. 4997–5000.

Meng, J. *et al.* (2017) 'Correction: Breakpoint Cluster Region–Mediated Inflammation Is Dependent on Casein Kinase II', *The Journal of Immunology*, 198(2), pp. 971–971.

Merhi, B. (2015) 'Role for urinary biomarkers in diagnosis of acute rejection in the transplanted kidney', *World Journal of Transplantation*, 5(4), p. 251.

- Miranda, K. C. *et al.* (2010) 'Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease', *Kidney International*, 78(2), pp. 191–199.
- Mischak, H. (2015) 'Pro: urine proteomics as a liquid kidney biopsy: no more kidney punctures!', *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 30(4), pp. 532–7.
- Miyatake, Y. *et al.* (2016) 'A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), pp. 1–11.
- Murakami, M. *et al.* (2013) 'Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop', *Cell Reports*. The Authors, 3(3), pp. 946–959.
- Nazari-Jahantigh, M. *et al.* (2015) 'Endothelial cells suppress monocyte activation through secretion of extracellular vesicles containing antiinflammatory microRNAs', *Blood*, 125(20), pp. 3202–3212.
- Ogura, H. *et al.* (2008) 'Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction', *Immunity*. Elsevier Inc., 29(4), pp. 628–636.
- Okuyama, Y. *et al.* (2018) 'Bmi1 Regulates IκBα Degradation via Association with the SCF Complex', *The Journal of Immunology*, 201(8), pp. 2264–2272.
- Oosthuyzen, W. *et al.* (2016) 'Vasopressin Regulates Extracellular Vesicle Uptake by Kidney Collecting Duct Cells', *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(11), pp. 3345–3355.
- Park, J. *et al.* (2017) 'Integrated Kidney Exosome Analysis for the Detection of Kidney Transplant Rejection', *ACS Nano*, 11(11), pp. 11041–11046.
- Park, J. B. *et al.* (2018) 'Novel urinary exosomal biomarkers of acute T cell-mediated rejection in kidney transplant recipients: A cross-sectional study', *Plos One*, 13(9), p. e0204204.
- Perez-Hernandez, J. *et al.* (2015) 'Increased urinary exosomal micrnas in patients with systemic lupus erythematosus', *PLoS ONE*, 10(9), pp. 1–16.
- Pisitkun, T. *et al.* (2006) 'Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: A novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury', *Kidney International*, 70(10), pp. 1847–1857.
- Pisitkun, T. *et al.* (2012) 'Application of systems biology principles to protein biomarker discovery: Urinary exosomal proteome in renal transplantation', *Proteomics - Clinical Applications*, 6(5–6), pp. 268–278.

- Pisitkun, T., Shen, R. and Knepper, M. A. (2004) 'Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), pp. 13368–73.
- Pitt, J. M., Kroemer, G. and Zitvogel, L. (2016) 'Extracellular vesicles: masters of intercellular communication and potential clinical interventions.', *The Journal of clinical investigation*, 126(4), pp. 1139–43.
- Raposo, G. and Stoorvogel, W. (2013) 'Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends', *Journal of Cell Biology*, 200(4), pp. 373–383.
- Record, M. *et al.* (2011) 'Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., 81(10), pp. 1171–1182.
- Robbins, P. D., Dorronsoro, A. and Booker, C. N. (2016) 'Regulation of chronic inflammatory and immune processes by extracellular vesicles', *Journal of Clinical Investigation*, 126(4), pp. 1173–1180.
- Salvadori, M. and Tsalouchos, A. (2017) 'Biomarkers in renal transplantation: An updated review', *World Journal of Transplantation*, 7(3), p. 161.
- Smalley, D. M. *et al.* (2008) 'Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer', *Journal of Proteome Research*, 7(5), pp. 2088–2096.
- Stofkova, A. *et al.* (2019) 'Photopic light-mediated down-regulation of local α 1A -adrenergic signaling protects blood-retina barrier in experimental autoimmune uveoretinitis', *Scientific Reports*. Springer US, 9(1), pp. 1–15.
- Tanaka, Y. *et al.* (2018) 'Presenilin 1 Regulates NF- κ B Activation via Association with Breakpoint Cluster Region and Casein Kinase II', *The Journal of Immunology*, 201(8), pp. 2256–2263.
- Thongboonkerd, V. *et al.* (2002) 'Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation', *Kidney International*, 62(4), pp. 1461–1469.
- Thongboonkerd, V. and Malasit, P. (2005) 'Renal and urinary proteomics: Current applications and challenges', *Proteomics*, 5(4), pp. 1033–1042.
- Tkach, M. and Théry, C. (2016) 'Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go', *Cell*, 164(6), pp. 1226–1232.
- Tøndel, C. *et al.* (2012) 'Safety and complications of percutaneous kidney biopsies in 715 children and 8573 adults in Norway 1988-2010', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 7(10), pp. 1591–1597.
- Trams, E. G. *et al.* (1981) 'Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of

- micro-vesicles.’, *Biochimica et biophysica acta*, 645(1), pp. 63–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6266476>.
- Transplantation, O. (2017) ‘Fact book 2017 of Organ Transplantation in Japan’.
- Tratnjek, L., Živin, M. and Glavan, G. (2013) ‘Up-regulation of Synaptotagmin IV within amyloid plaque-associated dystrophic neurons in Tg2576 mouse model of Alzheimer’s disease’, *Croatian Medical Journal*, 54(5), pp. 419–429.
- Vago, R. and Salonia, A. (2019) ‘Re: Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease’, *European Urology*, 75(2), pp. 342–343.
- WANG, N. S. *et al.* (2005) ‘Prospects for urinary proteomics: Exosomes as a source of urinary biomarkers (Review Article)’, *Nephrology*, 10(3), pp. 283–290.
- Witwer, K. W. *et al.* (2013) ‘Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research’, *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(1).
- Wolf, P. (1967) ‘The nature and significance of platelet products in human plasma.’, *British journal of haematology*, 13(3), pp. 269–288.
- Yu, M. *et al.* (2017) ‘Tissue-specific exosome biomarkers for noninvasively monitoring immunologic rejection of transplanted tissue’, *Journal of Clinical Investigation*, 127(4), pp. 1375–1391.
- Zijlstra, C. and Stoorvogel, W. (2016) ‘Prostasomes as a source of diagnostic biomarkers for prostate cancer’, *Journal of Clinical Investigation*, 126(4), pp. 1144–1151.