

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	機能再建・再生科学領域泌尿器移植再生医学教育研究分野 野呂 大輔
<p>(論文題目)</p> <p>Serum Aberrant <i>N</i>-Glycan Profile as a Marker Associated with Early Antibody-Mediated Rejection in Patients Receiving a Living Donor Kidney Transplant</p> <p>(血清 <i>N</i> 結合型糖鎖変異プロファイルは生体腎移植後の早期抗体関連型拒絶関連マーカーとなり得る)</p>	
<p>【緒言】</p> <p>抗体関連型拒絶 (Antibody-mediated rejection: ABMR) は、腎移植におけるグラフト喪失の原因として広く認識されており、ドナー特異的抗 HLA 抗体 (donor-specific anti-HLA antibodies、DSA) がグラフト生存の予後に関与することが報告されている。ABMR の診断は DSA のモニタリングと侵襲を伴う腎生検に頼っており、ABMR を早期に予知可能なバイオマーカーは存在しない。近年、DSA のサブタイプや補体活性化因子など DSA 免疫複合体の検出による ABMR 予測の試みが行われているが、依然として実臨床で広く使用されるに至っていない。</p> <p>糖鎖修飾 (Glycosylation) は、生体内の様々な反応を調節する重要な役割を果たす分子の一つであり、炎症、慢性疾患、自己免疫疾患、発癌、癌の浸潤・転移などの過程でその糖鎖プロファイルが大きく変化することが知られている。近年、グライコプロッティング法を基盤とした自動糖鎖前処理装置 (SWEETBLOT) と MALDI-TOF-Mass 質量分析装置を組み合わせた血清中の <i>N</i>-結合型糖鎖 (<i>N</i>-glycan) の網羅的解析法 (<i>N</i>-glycomics) が開発され、血清糖タンパク糖鎖の構造解析が可能になった。我々は、<i>N</i>-glycomics により、これまでに腎細胞癌、前立腺癌、膀胱癌、上部尿路上皮癌などの診断や予後予測に有用な <i>N</i>-glycan を同定し、それらをバイオマーカーとして利用する試みを実施してきた。しかしながら、腎移植、特に ABMR に伴う糖鎖プロファイルの変異に関する検討は行われていない。そこで、本研究では、生体腎移植患者の血清 <i>N</i>-glycan プロファイル解析を行い、ABMR 関連糖鎖プロファイルの変異をマーカーとした ABMR の早期予測の有用性について検討した。</p> <p>【対象と方法】</p> <p>2007 年から 2016 年の間に秋田大学病院、聖マリアンナ医科大学病院、東京女子医科大学病院、市立札幌病院および弘前大学病院にて生体腎移植を施行した 197 例のうち、腎生検で ABMR と診断された 16 症例、T 細胞性拒絶反応 (T cell mediated rejection, TCMR) と診断された 40 症例および腎移植後 ABMR および TCMR を発症していない 141 症例 (no-event 群) について検討した。また、岩木町健康増進プロジェクトにおける健康人 135 例を比較対照とした。</p> <p>血清検体は、移植前、移植 1 日後、移植 7 日後、移植 28 日後を収集し、<i>N</i>-glycomics によって血清糖鎖プロファイルを調査した。<i>N</i>-glycan プロファイルによる ABMR 予測については、ABMR の有無を説明変数とし、同定された <i>N</i>-glycan の血清濃度、性別、移植時年齢を目的変数として投入し、判別分析を行った。<i>N</i>-glycan score は、各投入項目と ABMR との関連性から得られた判別関数と各項目の実数値を乗じた数値と定数項を積算した数値とし、ABMR 予測に関する診断精度の評価およびカットオフ値の設定には、</p>	

ROC 曲線解析を用いた。*N*-glycan score 陽性および陰性群間における ABMR 非再発期間は、Kaplan-Meier 曲線を用いて解析を行い、両群間の比較は、log-rank test で評価した。p 値 0.05 未満を統計的有意差とした。

【結果】

N-glycomics を行った結果、定量再現性があり統計解析可能な 36 種類の *N*-glycan が同定された。ABMR 群および非 ABMR (TCMR および no-event) 群間に年齢、性別および ABO 不適合移植の割合に関して有意差は認めなかった。Preformed-DSA の有無および ABMR および TCMR 無再発期間は、両群間に有意差を認めた。

判別分析の結果、F 値が 2.0 以上で ABMR の予測に比較的重要と考えられる *N*-glycan は、ハイブリッド型 (*m/z* 1566 および *m/z* 2033)、バイセクト型 (*m/z* 1810 および *m/z* 2728) および複合 2 分岐型 (*m/z* 1709 および *m/z* 2058) であった。これらは、末端にシアル酸を有し、特に *m/z* 1709、*m/z* 2033 および *m/z* 2728 は、ABMR 群で有意に減少した糖鎖であった。*N*-glycan score を算出した結果、Preformed DSA の有無に関わらず、移植前、移植 1 日後、移植 7 日後において、ABMR 群で有意に *N*-glycan score が高値を示した ($p < 0.0001$)。

ROC 曲線解析の結果、移植 1 日後において、*N*-glycan score の ABMR 予測に関する AUC 0.8916 と、DSA の AUC 0.7619 よりも有意に高く ($p = 0.0001$)、カットオフ値を 0.8770 ポイント以上とすると陽性診断率 81.25%、陰性診断率 86.74%であった。さらに Kaplan-Meier 曲線解析から *N*-glycan score 陽性症例は、有意に ABMR 発症期間が短く、TCMR 発症期間には差が認められなかった。ABMR に関連する *N*-glycan のキャリア糖タンパク質として血清のメジャータンパク質であるイムノグロブリンを想定し、血清イムノグロブリン濃度の測定およびイムノグロブリン分画の *N*-glycomics を検討した。健常血清と比較して、移植前、移植後 1 日目、7 日目、28 日目でイムノグロブリン濃度が有意に減少していたが、両群間において有意差は認めなかった。また、イムノグロブリン分画において、ABMR 関連 *N*-glycan (*m/z* 1709、*m/z* 2033 および *m/z* 2728) は両群間で有意な差は認めなかった。また、2 分岐 *N*-glycan (*m/z* 1591、1607、1753 および 1915) の濃度は、イムノグロブリン分画と全血清、両群間で有意差を認めなかった。

これらの結果から、ABMR 関連 *N*-glycan のキャリア糖タンパク質がイムノグロブリンに由来しないことが示唆された。

【考察】

本研究では、血清 *N*-glycomics が生体腎移植後の早期に ABMR を発症するレシピエントの予測に使用できる可能性が示された。また、*N*-glycan score 陽性症例は移植から ABMR 発症までの期間が有意に短く、有用なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

本研究は、生体腎移植患者の ABMR 予測バイオマーカーとして血清の *N*-glycan プロファイルの有用性を証明した初めての研究である。末端にシアル酸を有するシアリル化 *N*-glycan のうち、特に *m/z* 1709、*m/z* 2033 および *m/z* 2728 は、移植 1 日後において ABMR 群で有意に減少した糖鎖であった。DSA 陽性症例を対象とした小規模研究では、移植日の DSA および初めて DSA が検出された時にシアリル化された DSA の血清レベルが高い場合、移植後の ABMR 発症リスクが低いことが報告されている。本研究では、多施設共同研究により生体腎移植患者 197 症例の血清 *N*-glycan プロファイルを同定した。そのうち ABMR 症例はわずか 16 例と少数例での検討であるが、ABMR に関連するイムノグロブリンに由来しない新規の糖鎖変化を同定し、血清 *N*-glycan プロファイルが、ABMR の有用な予測因子であることを示した。

【結論】

血清 *N*-glycomics による *N*-glycan score は、ABMR を予測するための新規バイオマーカーとして有用である。今後、大規模な Validation study や前向き臨床試験を経て、本法を基盤とした新たな ABMR 予測システムが確立されることが期待される。

