

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	VERMA SAPANA
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Significant Association Between <i>FOXP3</i> Gene Polymorphism and Steroid-Resistant Acute Rejection in Living Donor Liver Transplantation (成人間生体肝臓移植において <i>FOXP3</i> 遺伝子多型とステロイド抵抗性拒絶反応には有意な相関がある)			
論文審査担当者			
主査	教授	大毛 宏喜	印
審査委員	教授	田妻 進	
審査委員	准教授	HAYES CLAIR NELSON	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>制御性 T 細胞 (Treg 細胞) は、<i>FOXP3</i> を表出し、免疫のホメオスタシスを保つうえで重要な細胞である。<i>FOXP3</i> 蛋白は <i>FOXP3</i> 遺伝子 (<i>FOXP3</i>) によりエンコードされ、T 細胞のサイトカイン産生を制御する転写因子と関連して機能している。<i>FOXP3</i> のプロモーター領域の多型は、転写因子との結合の特異性あるいは転写誘導に影響し、Treg 細胞の機能を障害するため、自己免疫疾患の発症と関連することが知られている。一方で、急性拒絶反応 (ACR) において、肝臓グラフトへの Treg 細胞の浸潤が拒絶の深度に関連することが報告されていることから、Treg 細胞が ACR の進行を抑制する機能を有することが予測される。そこで、本研究は肝臓移植患者における ACR の重症度における <i>FOXP3</i> SNP の影響について解析した。</p> <p>成人間生体肝移植 102 症例のレシピエントを対象として、拒絶なし、ステロイド感受性拒絶反応 (SSAR)、ステロイド抵抗性拒絶反応 (SRAR) に分類した。<i>FOXP3</i> SNPs -3499 A/G (rs3761547)、-3279 A/C (rs3761548)、-924 A/G (rs2232365) のジェノタイプは PCR-RFLP 法で評価した。ACR の診断は、肝機能の上昇 (AST またはビリルビン値が 3 倍以上の上昇) と血管・胆管異常の否定、感染症を認めない等の臨床所見で診断した。臨床的拒絶診断は、さらにリンパ球混合試験 (MLR) による抗ドナー応答性により確認した。拒絶反応が疑われた際は、ステロイドミニパルス (125-250 mg /2-3 日) あるいは、ステロイドパルス (500 mg/3 日あるいはそれ以上) で治療を開始し、その後漸減した。SSAR と SRAR の鑑別は、ステロイドパルス後の肝機能改善率が最高値の 50%未満であった場合を SRAR と判断した。ステロイド応答性に関わらず、肝機能の正常化をもって ACR からの回復と判断した。</p> <p>肝臓移植後 6 週間以内において、全 102 症例中 16 症例 (15.69%) に ACR の発症を認めた。平均発症期間は術後 13.5 日であった。ACR の治療に要したステロイド量は 937.5 mg (500-3525 mg) で、治療期間は 5 日間 (2-8 日) であった。ACR 発症 16 例における SRAR は 5 例で 31.25% であり、これまでの報告と同等の割合であった。SRAR 症例においては、OKT3 (1 例) や rATG (3 例) の追加治療を実施した。ACR のうち 6 例に対しステロイドパルス後の病態把握のための肝生検を行った。その結果、ステロイド治療に反応性で臨床的に SSAR と診断した 3 例は、組織学的にも拒絶所見を認めなかった。一方で、ステロイドパルス後肝機能改善率が 50%未満で臨床的に SRAR と診断した 3 例は、ステロイドパルス後も mild/moderate の ACR の組織学的所見が残存していた。</p> <p>今回の解析において、いずれの <i>FOXP3</i> SNP とも ACR 発症率との関連性を見いだせなかった。しかしながら、<i>FOXP3</i> rs3761548 において A/C+A/A genotype は、C/C genotype に比べ有意に SRAR の発症率が高いことがわかった (A/C+A/A vs. C/C; no rejection, SSAR, SRAR, 85.71%, 0%, 14.29% vs. 83.58%, 16.42%, 0%, respectively, $P = 0.0005$)。</p> <p>ACR 治療のステロイド総量は rs3761548 A/C+A/A genotype で 2037.5 ± 887.5 mg であり、</p>			

C/C genotypeの $906.3 \pm 377.4 \text{ mg}$ に比べ有意に多く要した ($P=0.005$)。次に、抗ドナー特異的抗体 (DSA) の出現率を ACR15 例で解析した。いずれの症例も術前の DSA は陰性であった。術後 1 カ月の *de novo* DSA では、SSAR 患者 (すべて rs3761548 C/C genotype) では 10 例中 2 例の 20% で検出された一方、SRAR 患者 (すべて A/C+A/A genotype) では、5 例中 4 例の 80% で *de novo* DSA の出現を認めた。本検討において両者に有意差はないものの、*de novo* DSA 出現を伴う ACR 重症度と rs3761548 SNP との関連性が示唆される結果を得た。さらに、*FOXP3* rs3761548 SNP と同種異系免疫応答との関連を確認するため、CFSE 蛍光色素染色とフローサイトメトリーを用いたリンパ球混合試験によって抗ドナー応答性を経時的に評価した。ACR を発症していない症例では、CD4⁺ および CD8⁺T 細胞の抗ドナー stimulation index (SI) は、rs3761548 A/C+A/A genotype が C/C genotype に比べ高い傾向を示したが、有意差には至らなかった。そこで ACR 症例での拒絶発症時における抗ドナー SI を解析すると、rs3761548 A/C+A/A genotype の抗ドナー CD4⁺T 細胞の SI が C/C genotype に比べ有意に高いことを確認した。この差は抗サードパーティ SI では認めなかった。すなわち、肝臓移植後の ACR において rs3761548 A/C+A/A genotype の抗ドナー CD4⁺T 細胞応答は C/C genotype に対し亢進していることが確認された。著者等はさらに、血清中の免疫関連サイトカインの IL-2, IL-10, IFN- γ , IL-17A, or IL-35 を探索したが、いずれも rs3761548 との関連は見いだせなかった。ただし、ACR 発症例において、術後 2 週目の血清 IFN- γ 値が rs3761548 A/C+A/A genotype で C/C genotype より高値であった。また、感染症や術後生存率においてはいずれの *FOXP3* SNP も関連を認めなかった。肝臓移植における *FOXP3* 遺伝子の rs3761548 SNP は術後 SRAR 発症と有意な相関があることが示唆された。

以上の結果から、本論文は移植領域における免疫抑制および拒絶治療法の選択において *FOXP3* SNP に基づく個別化療法を行ううえで有益な情報もたらすことを見出した点において、高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が VERMA SAPANA 氏に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	VERMA SAPANA
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Significant Association Between <i>FOXP3</i> Gene Polymorphism and Steroid-Resistant Acute Rejection in Living Donor Liver Transplantation (成人間生体肝臓移植において <i>FOXP3</i> 遺伝子多型とステロイド抵抗性拒絶反応には有意な相関がある)			
最終試験担当者			
主査	教授	大毛 宏喜	印
審査委員	教授	田妻 進	
審査委員	准教授	HAYES CLAIR NELSON	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年8月3日の第70回広島大学研究科発表会（医学）及び平成29年8月8日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 <i>FOXP3</i> SNP の分布の性差および人種との関連 2 健常人における <i>FOXP3</i> SNP の意義 3 自己免疫性肝疾患と <i>FOXP3</i> SNP との関連 4 ステロイド抵抗性拒絶反応の移植成績への関連性 5 <i>FOXP3</i> SNP 情報の臨床応用 <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			