

# Plasma microRNAs Are Potential Biomarkers of Acute Rejection After Hindlimb Transplantation in Rats

## (血漿中マイクロ RNA はラット後肢移植モデルの急性拒絶反応のバイオマーカーとなりえる)

織田 宏基

### 緒言

四肢移植は腫瘍切除や交通外傷に伴う切断および先天的な原因などによる四肢欠損患者への治療方針の1つとして考慮され、現在世界的に広く施行されている<sup>1,2</sup>。機能面でも整容面でも良好な結果を得ることができるが、急性あるいは慢性の拒絶反応を回避するため生涯にわたる免疫抑制剤が必要となり、それに伴う生命を脅かすような重大な副作用がoccur<sup>3</sup>。この拒絶反応をより早期に認知することにより良好な免疫抑制の調整を行うことができるのではないかと推測される。現在、拒絶反応の診断は視診および病理組織診にて行われるが、これらは大いに主観的な要素を含んでいる。

マイクロ RNA は蛋白をコードしない短い1本鎖 RNA で血液中にも比較的安定的に存在し<sup>4</sup>、メッセンジャー RNA の蛋白への翻訳を制御することでその機能を発揮する。近年、さまざまな疾患でマイクロ RNA の発現量が変化することが報告されている<sup>5,6</sup>。臓器移植後の拒絶反応時のマイクロ RNA 発現量の変化も報告されているが、四肢移植の分野ではまだ報告はない。今回、ラット四肢移植モデルを用いて四肢移植急性拒絶反応におけるマイクロ RNA の発現量の変化について検討した。

### 方法

実験群では、7匹のオスの Brown-Norway ラット (RT1<sup>n</sup>) をドナーとして用い、13匹のオスの Lewis ラット (RT1<sup>l</sup>) をレシピエントとして用いた。13例のレシピエントのうち5例に対し組織採取を、残りの8例に対し皮膚観察および血液採取を行った。対照群では4匹のオスの Lewis ラットをドナーとして、7匹の Lewis ラットをレシピエントとして用いた。7例のレシピエントのうち2例に対して組織採取を、残りの5例に

対して血液採取を行った。

ラットに全身麻酔を施行したのち、ドナーラットの両側の後肢を大腿中央レベルで切断した。ヘパリン化した細胞外液を灌流したのち、細胞外液中に保存した。ついでレシピエントラットの一侧の後肢を大腿中央レベルで切断したのちドナーの後肢を移植した。18G の注射針で大腿骨接合を行い、背側の筋・皮膚を縫合し、大腿動静脈を吻合した。そして腹側の筋・皮膚を縫合した<sup>7</sup>。術後 7 日間は免疫抑制剤 (FK-506 1mg/kg/day) を投与した<sup>8</sup>。

実験群において皮膚所見を連日観察し、腫脹・発赤・表皮剥離・脱毛の有無を評価した。両群から手術 1~3 日前に 1 回と術後 7、10、14 日目に血液を採取した。採取した血液から血漿を分離し、mirVana Paris Kit (Applied Biosystem) を用いて total RNA を抽出した。いくつかのマイクロ RNA を Taqman miRNA reverse transcription kit (Applied Biosystem) を用いて cDNA に逆転写し、real-time PCR にて評価を行った。

実験群の残りの 5 例から術後 7 日目から 14 日目に足部皮膚組織を、対照群の残りの 2 例から術後 7、10、14 日目に足部皮膚組織を採取し、20  $\mu$ m の切片を作成した。両群の術後 7、10、14 日目の検体を用いての HE 染色を行い、各レシピエントの 2 か所の切片をランダムに選出し評価した<sup>9</sup>。また、CD4 および CD8 に対する免疫組織染色を行い、光学顕微鏡にて観察を行った。実験群の各検体から 2 か所の切片をランダムに選出し陽性細胞数の計測を行った。

免疫組織染色および血漿マイクロ RNA の結果は平均および標準誤差で示し、これらの値は Excel 2013 を用いて t 検定 (Microsoft) を行った。

## 結果

視診においては免疫抑制剤終了後まず腫脹と発赤を認めた。術後 14 日目には全例で皮膚の腫脹・発赤を認め、8 例中 4 例で表皮剥離を、3 例で脱毛を認めた。何らかの皮膚変化を認めるまでの平均日数は術後 11.0 日目、すなわち免疫抑制剤を中止して 5.0 日目であった。

組織所見では、HE 染色において実験群で術後 7 日目は 10 検体中 7 検体が、10 日目は 6 検体が Grade 0 と判断されたのに対し、術後 14 日目には 8 検体で Grade III の強い拒絶反応が生じていると判断された。免疫組織染色では実験群における CD4・CD8 陽性細胞数は術後 7 日目より次第に増加する傾向を認め、術後 7 日目と比較して、CD4 では術後 11、13、14 日目に、CD8 では術後 13、14 日目において陽性細胞数の有意な増加を認めた。

過去の文献を参考に 4 つのマイクロ RNA (マイクロ RNA-146a、マイクロ RNA-155、マイクロ RNA-182、マイクロ RNA-451) を選択して抽出した<sup>10-12</sup>。血漿中のマイクロ RNA-146a の発現量は術後 7 日目 ( $1.17 \pm 0.21$ ) と比較して術後 10 日目 ( $2.10 \pm 0.52$ ,  $P < 0.05$ )、術後 14 日目 ( $1.58 \pm 0.30$ ,  $P < 0.01$ ) に有意な発現量の増加を認めた。

血漿中マイクロ RNA-155 の発現量も術後 7 日目(1.11 ± 0.23)と比較して術後 10 日目(2.51 ± 0.61、 $P < 0.05$ )、術後 14 日目(1.70 ± 0.34、 $P < 0.05$ ) に有意な発現量の増加を認めた。対照群では、術後 7 日目と比較して、術後 10 日目あるいは 14 日目に有意な発現量の変化を認めるマイクロ RNA はなかった。

## 考察

四肢移植では急性拒絶反応は比較的高頻度に生じるが多くは生着する<sup>1</sup>。腎臓移植において、認知できない程度の拒絶でも移植臓器に機能障害をもたらすといわれ、拒絶反応を早期発見して早期に治療することが機能の悪化の回避につながるといわれている<sup>14-15</sup>。四肢移植でも急性拒絶反応を早期に認知して早期に治療することは四肢の機能温存には重要と思われる。

今回の実験で、マイクロ RNA-146a およびマイクロ RNA-155 は術後 10 日目すなわち免疫抑制剤投与終了後 4 日目に発現量の増加を認めた。一方、視診では何らかの変化を認めたのは術後 11.0 日目であった。組織所見でも術後 10 日目の時点では半数以上で拒絶反応は認められなかった。すなわち、マイクロ RNA-146a およびマイクロ RNA-155 は視診・病理組織診より早期に変化すると思われた。

マイクロ RNA-146a はサイトカインなどの刺激により誘導され、炎症性シグナルや regulatory T 細胞の分化や維持に重要な役割を果たしている<sup>16-19</sup>。マイクロ RNA-155 もサイトカイン等で誘導され、免疫細胞の活性化やサイトカインの分泌の誘導等を行う<sup>5,6</sup>。これらのマイクロ RNA は免疫系において重要な役割を持ち、過去の報告ではマウスからラットへの心臓移植における拒絶反応時にもこれらのマイクロ RNA の発現量が上昇したとされている<sup>10</sup>。これらのマイクロ RNA は免疫反応における初期の段階で関与していると考えられるため、本実験でも皮膚所見や病理所見に先んじて変化したと考えられた。

今回、すべてのレシピエントにおいて同様のプロトコールで実験を行ったが、拒絶の程度にばらつきが生じた。これは免疫抑制剤の投与タイミングや多少のドナーとレシピエント間の体重差により生じたものと考えられる。また実験群の 1 例のレシピエントにおいて、術後 10 日目から 14 日目にかけてマイクロ RNA-155 の発現量が低下したものがいた。この例ではすでに術後 11 日目に表皮剥離が生じており、すでにマイクロ RNA-155 の発現量のピークを越えていたものと推測された。Wang らもマウスの敗血症モデルにおいて、マイクロ RNA-155 の発現量が 12 時間でピークを迎え、2 日後には基線にもどっていると報告している<sup>20</sup>。

マイクロ RNA-146a およびマイクロ RNA-155 は様々な疾患や炎症性変化で発現が上昇することが報告されており、本実験においても特異度は高くはないと推測される。またラットのマイクロ RNA は必ずしもヒトのマイクロ RNA と一致していないと考えられるため、ヒトへの応用には更なる検証が必要と考えられる。

血漿中のマイクロ RNA-146a およびマイクロ RNA-155 は客観的でより早期の急性拒絶のバイオマーカーとして有効である可能性があり、この方法は組織生検と比較して低侵襲である。急性拒絶の早期診断・早期治療により移植肢の機能・予後を改善しうるのではないかと考えられる。

## References

1. Gander B, Brown CS, Vasilic D, et al. Composite tissue allotransplantation of the hand and face; a new frontier in transplant and reconstructive surgery. *Transpl Int*. 2006; 19: 868-880.
2. Margreiter R, Brandacher G, Ninkovic M, et al. A double-hand transplant can be worth the effort! *Transplantation*. 2002; 74: 85-90.
3. Starzl R, Brandacher G, Lee WP et al. Review of the early diagnoses and assessment of rejection in vascularized composite allotransplantation. *Clin Dev Immunol*. 2013; 2013: 402980.
4. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarker for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008; 18(10): 997-1006. doi: 10.1038/cr.2008.282.
5. Leng RX, Pan HF, Qin WZ, Chen GM, Ye DQ. Role of microRNA-155 in autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011; 22(3): 141-147. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.05.002.
6. Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E. miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792(6): 497-505. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.02.013.
7. Doi K. Homotransplantation of limbs in rats. A preliminary report on an experimental study with nonspecific immunosuppressive drugs. *Plast Reconstr Surg*. 1979; 64(5): 613-621.
8. Muramatsu K, Doi K, Akino T, Shigetomo M, Kawai S. Longer survival of rat limb allograft. Combined immunosuppression of FK-506 and 15-deoxyspergualin. *Acta Orthop Scand*. 1997; 68(6): 581-585.
9. Büttemeyer R, Jones NF, Min Z, Rao U. Rejection of the component tissues of limb allografts in rats immunosuppressed with FK-506 and cyclosporine. *Plast Reconstr Surg*. 1996; 97(1): 139-148.
10. Li C, Liu T, Qi F, et al. Analysis of intragraft microRNA expression in a mouse-to-rat cardiac xenotransplantation model. *Microsurgery*. 2014; 34(1): 44-50. doi: 10.1002/micr.22139.
11. Huang H, He J, Teng X, et al. Combined intrathymic and intravenous

- injection of mesenchymal stem cells can prolong the survival of rat cardiac allograft associated with decrease in miR-155 expression. *J Surg Res.* 2013; 185(2): 896-903. doi: 10.1016/j.jss.2013.06.015.
12. Wei L, Wang M, Qu X, et al. Differential expression of microRNAs during allograft rejection. *Am J Transplant.* 2012; 12(5): 1113-1123. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03958.x.
  13. Miyagi M, Ishikawa Y, Mizuiri S, Aikawa A, Ohara T, Hasegawa A. Significance of subclinical rejection in early renal allograft biopsies for chronic allograft dysfunction. *Clin Transplant.* 2005; 19(4): 456-465 doi: 10.1111/j.1399-0012.2006.00303.x.
  14. Shishido S, Asanuma H, Nakai H, et al, The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14(4): 1046-1052. doi: 10.1097/01.ASN.0000056189.02819.32.
  15. Rush D, Nickerson P, Gough J, et al. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9(11): 2129-2134.
  16. Devier DJ, Lovera JF, Lukiw WJ. Increased in NF- $\kappa$ B-sensitive miRNA-146a and miRNA-155 in multiple sclerosis (MS) and pro-inflammatory neurodegeneration. *Front Mol Neurosci.* 2015; 8: 5. doi: 10.3389/fnmol.2015.00005
  17. Pauley KM, Cha S. miRNA-146a in rheumatoid arthritis: a new therapeutic strategy. *Immunotherapy.* 2011; 3(7): 829-831. doi: 10.2217/imt11.70.
  18. Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, et al. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med.* 2011; 208(6): 1189-1201. doi: 10.1084/jem.20101823.
  19. Williams AE, Perry MM, Moschos SA, Larner-Svensson HM, Lindsay MA. Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer. *Biochem Soc. Trans.* 2008; 36(Pt 6): 1211-1215. doi: 10.1042/BST0361211.
  20. Wang ZH, Liang YB, Tang H, et al., Dexamethasone down-regulates the expression of microRNA-155 in the livers of septic mice. *PLoS ONE* 2013; 8(11): e80547. doi 10.1371/journal.pone.0080547.