

博士論文

肝細胞の炎症反応とアポトーシスの誘導における APE1 の発現性の効果に関する研究

澤 上 辰 夫

肝細胞の炎症反応とアポトーシスの誘導における APE1 の発現性の効果に関する研究

東京大学大学院医学系研究科博士課程外科学専攻 肝胆膵・人工臓器移植外科

指導教員 長谷川 潔 教授

申請者 澤上 辰夫

要旨

背景と目的：Apyrimidinic/apurinic endonuclease 1 (APE1) は、酸化的塩基損傷の DNA 修復、転写因子のレドックス制御に関与する多機能酵素である。臓器移植においては、APE1 は細胞の再生を促進すると共に、虚血再灌流傷害から臓器を保護する役割をもつとされている。肝移植後の拒絶反応を抑制し、臓器の生着を安定させることは臓器移植において重要な課題であるが、APE1 の DNA 修復とレドックス制御は、拒絶反応が起こす炎症とアポトーシスの抑制に寄与し、臓器の生着を安定させることが動物実験から示唆されている。しかし、APE1 の発現がヒト肝細胞の炎症反応とアポトーシスの誘導に及ぼす影響はまだ検討されていない。本研究は、ヒト肝細胞の炎症とアポトーシスの誘導における APE1 の関与の解明を目的とする。

方法：免疫寛容関連遺伝子を探索するため、APE1 遺伝子の制御モデルをもとに、L-02 細胞による APE1 の影響を明らかにする実験系を構築した。肝移植後患者における免疫寛容の誘導に関連する遺伝子を Gene Expression Omnibus (GEO) を用いて探索した。APE1 遺伝子の発現を制御する実験系を構築し、L-02 細胞に導入した後、各種炎症サイトカインの産生 (IL-1 β 、IL-10、TNF α 、IFN- γ) に対する APE1 の影響を ELISA 法を用いて解析した。L-02 細胞のアポトーシスの誘導と APE1 との関連性を Flow cytometry 法を用いて解析した。APE1 と相互作用するタンパク質を Bioinformatics 法を用いて探索した。

結果：肝臓移植後に免疫寛容の誘導がみとめられた患者の末梢血では、免疫寛容の誘導がみとめられない患者と比べて APE1 が高発現していた。ショートヘアピン RNA (shRNA) による APE1 遺伝子の発現低下の誘導は、L-02 細胞における炎症性因子 (IL-1 β 、IL-10、TNF α 、IFN- γ) の産生を増加させた。一方、APE1 遺伝子の発現上昇の誘導は炎症性因子の産生 IL-1 β 、IL-10、TNF α 、IFN- γ を減少させた。IL-10 は炎症を誘導する機能と共に炎症を抑制する機能を有するとされており、APE1 の発現変動による IL-10 産生量は更なる解析が必要である。APE1 遺伝子の発現低下の誘導は、L-02 細胞のアポトーシスの誘導を増幅させ、APE1 遺伝子の発現上昇の誘導は L-02 細胞のアポトーシスの誘導を減少させた。Bioinformatics 法による解析では、APE1 タンパク質が ANP32A、FEN1、HMGB2、LIG1、MUTYH、NTHL1、OGG1、PCNA、POLB、SET など多くの炎症性免疫応答に関連する因子との潜在的な相互作用をもつことを示した。

結論：APE1 は肝細胞の炎症反応とアポトーシスの誘導を阻害し、肝臓移植後の免疫寛容、細胞保護に関与する遺伝子であることが示唆される。

目次

要旨

| | |
|---|----|
| 第1章 序文 | 1 |
| 第1節：肝移植と免疫抑制剤離脱 | 1 |
| 第2節：本研究の目的 | 2 |
| 第2章 方法 | 4 |
| 第1項 患者のデータ取得 | 4 |
| 第2項 細胞 | 6 |
| 第3項 試薬 | 6 |
| 第4項 肝移植後の免疫寛容の誘導に関する遺伝子のスクリーニング | 6 |
| 第5項 APE1 shRNA ベクターの構築 | 7 |
| 第6項 APE1 過剰発現ベクターの構築 | 10 |
| 第7項 プラスミド DNA の増幅と抽出 | 13 |
| 第8項 細胞への遺伝子導入 | 13 |
| 第9項 リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析 | 14 |
| 第10項 Western blotting 法によるタンパク質発現解析 | 16 |
| 第11項 ELISA 法による炎症関連因子の産生量の解析 | 16 |
| 第12項 Annexin V-FITC/PI double labeling 法による細胞のアポトーシスの解析 | 17 |
| 第13項 Bioinformatics 法で APE1 のタンパク質間相互作用を予測と分析 | 17 |
| 第14項 統計分析 | 17 |
| 第3章 結果 | 18 |
| 第1項 肝移植患者の末梢血における発現変動遺伝子のスクリーニング | 18 |
| 第2項 APE1 shRNA ベクター構築とサイレンシングの効率を評価 | 20 |
| 第3項 APE1 shRNA 過剰ベクター構築と効率を評価 | 22 |

| | |
|--|----|
| 第 4 項 L-02 細胞における APE1 発現変動と炎症反応関連因子の発現と変化 | 24 |
| 第 5 項 L-02 細胞における APE1 の発現変動とアポトーシスの誘導との関連性 | 26 |
| 第 6 項 Bioinformatics 法で APE1 のタンパク質間相互作用を予測と分析 | 28 |
| 第 4 章 考察 | 30 |
| 第 5 章 総括と今後の展望 | 34 |
| 引用文献 | 35 |
| 謝辞 | 44 |

略語一覽

OT: Operational tolerance

ISDT: Immunosuppressive drug therapy

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell

GEO: Gene Expression Omnibus

APE1: Apurinic/aprimidinic endonuclease 1

Image J: Image Processing and Analysis in Java

ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

SP: Streptavidin Peroxidase Con-jugated Method

ShRNA: Small hairpin RNA

qRT-PCR: Quantitative Real-time PCR

mRNA: messenger RNA

IS: Immunosuppression

第1章:序文

第1節:肝移植と免疫抑制剤離脱

肝移植 (LT) は、末期肝疾患に対する効果的な治療法である [1-3]。現在までの 30 年間で、肝移植の外科的手法および周術期ケアの進歩だけでなく、カルシニューリン阻害剤などの免疫抑制剤治療 (immunosuppressive drug treatments、ISDT) の導入により、短期の移植と移植レシピエントの生存における顕著な改善が達成された [4-6]。ISDT は拒絶反応と移植片機能損失を抑えることを目的とした治療である [7-9]。大部分の患者は免疫抑制剤を生涯服用し続ける必要があり、免疫抑制剤の服用による感染症、慢性腎不全、悪性腫瘍の発生といった重篤な副作用はレシピエントの死亡率の増加につながる [10-12]。

近年、免疫反応のない状態で移植片が生着して免疫抑制剤の服用を離脱した患者が臨床で報告されており、免疫抑制剤離脱 (Operational tolerance : OT) と呼ばれる現象が確認された [13-16]。OT は免疫抑制薬完全中止後 1 年以上にわたって肝機能や病理組織学的所見が正常であった状態と定義されており、肝移植では他の臓器移植よりも OT となる症例が高頻度に発生するといわれている [17]。このように OT となる症例が発生することは、同種移植片に対する免疫が静止状態となることにより、臨床の臓器移植で免疫抑制剤を持続的に使用することなく移植片を生着させることが実現可能であることを示唆している [18-20]。しかし、OT となる移植症例はごくわずかであるほか、OT 後に拒絶反応が発生して免疫抑制剤を開始する症例も存在する。従って、OT となりうる症例を探索・評価する方法や OT 後の予後を評価する方法の開発が、移植医療の進展に大変重要な役割を有すると考えられる。最近では、いくつかの国際共同研究において肝移植患者末梢血の遺伝子発見プロファイリングが実施され、肝移植後の免疫抑制剤離脱に関連する有効なバイオマーカーが同定された [21-23]。免疫寛容の誘導に関連するバイオマーカーは、免疫抑制剤治療の離脱の評価に有用であると示唆された [24]。

免疫抑制剤の服用を離脱した肝移植患者を評価した最初の研究は、Martinez-Llordella らによって実施された。この研究では、免疫寛容の誘導をみとめた肝移植患者 16 例と免疫寛容の誘導をみとめない肝移植患者 16 例から末梢血単核細胞を採取して、whole genome Affymetrix マイクロアレイで分析を実施した。その結果、免疫寛容の誘導をみとめた患者からは、positively regulated genes として 462 の遺伝子と negatively regulated genes として 166 の遺伝子を示した [25]。Kawasaki らは、免疫寛容の誘導をみとめた肝移植患者 11 例と健常人 11 例の末梢血単核細胞を用いて 12814 遺伝子の発現をマイクロアレイ法で解析した。その結果、発現上昇した遺伝子として 627 遺伝子と発現低下した遺伝子として 90 遺伝子を同定し、それらの発現変

動遺伝子の中には「免疫応答」の現象に関連する遺伝子が多く存在した[26]。さらに、Pons らの研究では、シクロスポリン A の服用を離脱した肝移植患者 12 例の末梢血単核細胞における *Foxp3* 遺伝子の発現を経時的に定量評価した。免疫抑制剤の服用を離脱した患者では、免疫抑制剤離脱が進むにつれて *Foxp3* 遺伝子の発現量の上昇をみとめたが、拒絶反応を起こした患者では上昇しなかった[27]。以上の研究成果から、末梢血のマイクロアレイ解析による免疫寛容に関わるバイオマーカーの探索が、肝移植患者の免疫抑制剤離脱の評価に有用であると示唆されたが、肝移植患者における免疫寛容の誘導に関する機構の理解は未だ完全ではない。予備調査として公開データベースである Gene Expression Omnibus (GEO) から、肝移植後に免疫寛容の誘導をみとめた患者 9 例と免疫寛容の誘導をみとめない患者 8 例の末梢血のマイクロアレイデータを取得し、免疫寛容に関わるバイオマーカーを探索した。その結果、免疫寛容の誘導をみとめた肝移植患者において Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) の発現が高度に上昇していることを見出した。

第 2 節：APE1 および本研究の目的

本研究では、肝移植患者における免疫抑制剤の服用の離脱を可能とするために必要である免疫寛容の誘導に関する新たな知見を得ることを目的とした。

APE1 は当初、酸化的小よびアルキル化損傷の塩基除去修復 (BER) 経路修復において重要な役割を果たすエンドヌクレアーゼとして同定された[28-31]。近年の研究で、APE1 は、特定の転写因子の活性を調節する酸化還元シグナル伝達タンパク質としても再認識されている[32-35]。また、APE1 は DNA 末端修復機能とレドックス制御にて重要な役割を担っており、炎症性腸疾患治療のターゲットとされている[36-38]。

APE1 エンドヌクレアーゼはすべての細胞の DNA 損傷反応に不可欠であり、APE1 は細胞機能と生存における重要な要素である。この修復機能は *E-coli* から人類まで保存されているが、酸化還元シグナル伝達機能は哺乳類でのみみられる[39]。APE1 酸化還元シグナル伝達は、STAT3、HIF-1 α 、NF- κ B、AP-1、p53 などを含む多数の転写因子に影響を及ぼす[40-45]。APE1 酸化還元シグナル伝達は、特定の転写因子の酸化したシステイン残基を還元化することによりトランス活性化をもたらす高度に制御された機構である[46-49]。APE1 の発現は多くの種類の腫瘍で上昇しており、その変化は腫瘍細胞の成長、遊走、薬剤耐性の増加や患者の生存率の低下に関連することが明らかとなっている[50-53]。APE1 は、酸化ストレスに対する細胞応

答の調節、転写因子のレドックス調節、癌の発生、および肝移植における免疫寛容のプロセスにおいて重要な役割を果たすと考えられている[54-57]。

以上から APE1 遺伝子は細胞の酸化ストレス環境下に対する生体防御機構として、細胞の炎症反応とアポトーシスの誘導に関係すると示唆されている[58,59]。しかし、肝移植後の炎症反応と細胞アポトーシスの誘導における APE1 の役割は解明されていない。本研究では、ヒト正常肝細胞株 L-02 の炎症反応とアポトーシスの誘導に関する APE1 の効果を検討することとした。

第2章 方法

第1項 患者のデータ

9名の肝移植後免疫寛容状態にある患者と8名の免疫寛容状態にない患者の末梢血単核球（PBMC）のマイクロアレイデータを Gene Expression Omnibus (GEO)から取得した (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE11881>)。

肝移植後免疫寛容を誘導している患者の定義は、患者が一年以上免疫抑制剤治療（ISDT）中止になった免疫抑制剤離脱（OP）

患者とした。比較対照となる免疫寛容を誘導していない患者として、免疫抑制剤中止を試行したが急性拒絶反応などの理由で

免疫抑制剤の継続投与を余儀なくされた患者を選択した。GEOとは、米国国立生物工学情報センター（NCBI）が作成・管理

する世界最大の遺伝子発現データベースであり、世界中の研究機関から投稿された遺伝子発現のデータを収集している。

表 1. 免疫寛容状態にある患者と免疫寛容状態にない患者のデータ

| GEO | サンプル名 | 検体 | C型肝炎ウイルス | 治療 |
|-----------|---|------|----------|----------------|
| GSM124753 | Tolerant liver transplant recipient | PBMC | 無 | 無 |
| GSM124834 | Tolerant liver transplant recipient | PBMC | 無 | 無 |
| GSM124836 | Tolerant liver transplant recipient | PBMC | 無 | 無 |
| GSM124845 | Tolerant liver transplant recipient | PBMC | 無 | 無 |
| GSM124851 | Tolerant liver transplant recipient | PBMC | 無 | 無 |
| GSM124853 | Tolerant liver transplant recipient | PBMC | 無 | 無 |
| GSM124646 | Tolerant liver transplant recipient | PBMC | 有 | 無 |
| GSM124850 | Tolerant liver transplant recipient | PBMC | 有 | 無 |
| GSM124648 | Tolerant liver transplant recipient | PBMC | 有 | 無 |
| GSM124863 | Non-tolerant liver transplant recipient | PBMC | 無 | Tacrolimus |
| GSM124833 | Non-tolerant liver transplant recipient | PBMC | 無 | Tacrolimus |
| GSM124575 | Non-tolerant liver transplant recipient | PBMC | 有 | 無 |
| GSM124748 | Non-tolerant liver transplant recipient | PBMC | 有 | Cyclosporine A |
| GSM124838 | Non-tolerant liver transplant recipient | PBMC | 有 | Cyclosporine A |
| GSM124840 | Non-tolerant liver transplant recipient | PBMC | 有 | Tacrolimus |
| GSM124842 | Non-tolerant liver transplant recipient | PBMC | 有 | Cyclosporine A |
| GSM124675 | Non-tolerant liver transplant recipient | PBMC | 有 | Tacrolimus |

第2項 細胞

本研究で使用したヒト正常肝臓細胞 (L-02 細胞) は、Peking Union Basic Research Institute で購入した。ヒト正常肝細胞は一般的に *in vitro* での培養が困難であり、分離培養される初代培養細胞も継続的な培養は不可能である。本研究で使用した L-02 細胞は *in vitro* 培養可能な正常なヒト肝細胞として多くの研究で使用されており、肝細胞の炎症と増殖に関する研究モデルとなっている。L-02 細胞は RPMI-1640 + 10% Fetal bovine serum 培地 (50IU/ml ペニシリンと 50IU/ml スペルプトマイシン) で 37°C の細胞培養インキュベーターの中で培養した。

第3項 試薬

細胞から RNA を抽出するための Total RNA extraction reagents (TRIzol)、抽出した RNA を逆転写して増幅するための SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit 及び mRNA SYBR Green fluorescent PCR 試薬はタカラから購入した。細胞からタンパク質を抽出するための Protein extraction RIPA Buffer、抽出したタンパク質を定量するための BCA protein concentration test kit、SDS-PAGE で使用したゲルは Jiangsu Beyotime で購入した。細胞から分泌された各種サイトカインを ELISA 法により定量するための IL-1 β , IL-10, TNF α , INF- γ Elisa kits は Beijing Berui Technology で購入した。プラスミドベクターを細胞に導入するための Cell transfection reagent Lipofectamine 2000 は Invitrogen、USA で購入した。Western blot 法により各種タンパク質の発現を検出するための抗体である抗 APE1 抗体、抗 GAPDH 抗体は Abcam で購入した。同じく Western blot 法により各種タンパク質の発現を検出するための抗体である Goat anti-Rabbit IgG(H+L) secondary antibody, HRP conjugate は Thermo で購入した。アポトーシスを誘導した細胞を Flow cytometry 法により検出するための Annexin V-FITC/PI double-stain cell apoptosis detection kit は Jiangsu Keygen Biotech で購入した。遺伝子ノックダウンのためのプラスミドとして使用した pLK0.1-puro vector は Sigma Aldrich China で購入した。遺伝子過剰発現のためのプラスミドとして使用した pcDNA3.1 vector は TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO.,LTD で購入した。細胞培養で使用した High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)、fetal bovine serum (FBS)、RPMI-1640 (L-グルタミン、フェノールレッド含有)は Gibco/BRL で購入した。

第4項 肝移植後免疫寛容の誘導に関する遺伝子の発現変動遺伝子スクリーニング

GEO から得られた各患者の遺伝子発現解析結果に対して R 言語プログラム (R version 3.2.5) を使用して、各サンプルの遺伝子発現値を均質化した。均質化には R package limma (Version 3.0) の normalize between array を使用し、全サンプルの中

中央値を同一の基準とした。肝移植後の免疫寛容を伴う患者と伴わない患者で遺伝子発現レベルを比較し、発現変動遺伝子 (differentially expressed gene, DEG) をスクリーニングした。現変動遺伝子としての条件は logFC の絶対値が 1 以上、かつ遺伝子発現量の差における統計的有意性を示す P 値が 0.05 未満であることとした。

第 5 項 APE1 shRNA ベクターの構築

本研究では、APE1 shRNA による遺伝子ノックダウンを行うために pLKO.1 plasmid vector を使用した (図 1)。pLKO.1 plasmid vector は、様々な細胞で shRNA を恒常的に発現する性質を有し、安定な遺伝子ノックダウンを実現することから多くの研究で使用されている [88]。APE1shRNA を結合させたベクターを構築して細胞に導入することにより、APE1 遺伝子の発現を恒常的にノックダウンさせる系を確立させることとした。まず、shRNA primer のアニーリングを実施した。プライマーを超純水で 10 μ M に希釈し、上流プライマーが下流プライマーと 1 : 1 の比率で混合させた後、100°C のウォーターバスで 10 分間混合して変性させた。その後、室温になるまで自然冷却した。pLKO.1 plasmid vector を直線状にし、制限酵素 EcoRI および Age I を加えて、pLKO.1 ベクターの Double digestion を 37°C にて 3 時間実施した後、Tris-EDTA (TE) Buffer でプラスミドを回収、精製、溶解した。shRNA 配列を pLKO.1 ベクターに挿入するために、アニーリングした shRNA プライマーと pLKO.1 ベクターを ligase と混合して、45 分間室温にてライゲーション反応させた。その後、pLKO.1_shRNA をシーケンスで検証した。APE1 shRNA ベクターとして構築した 4 組の APE1 shRNA のシーケンスを表 2 に示した。

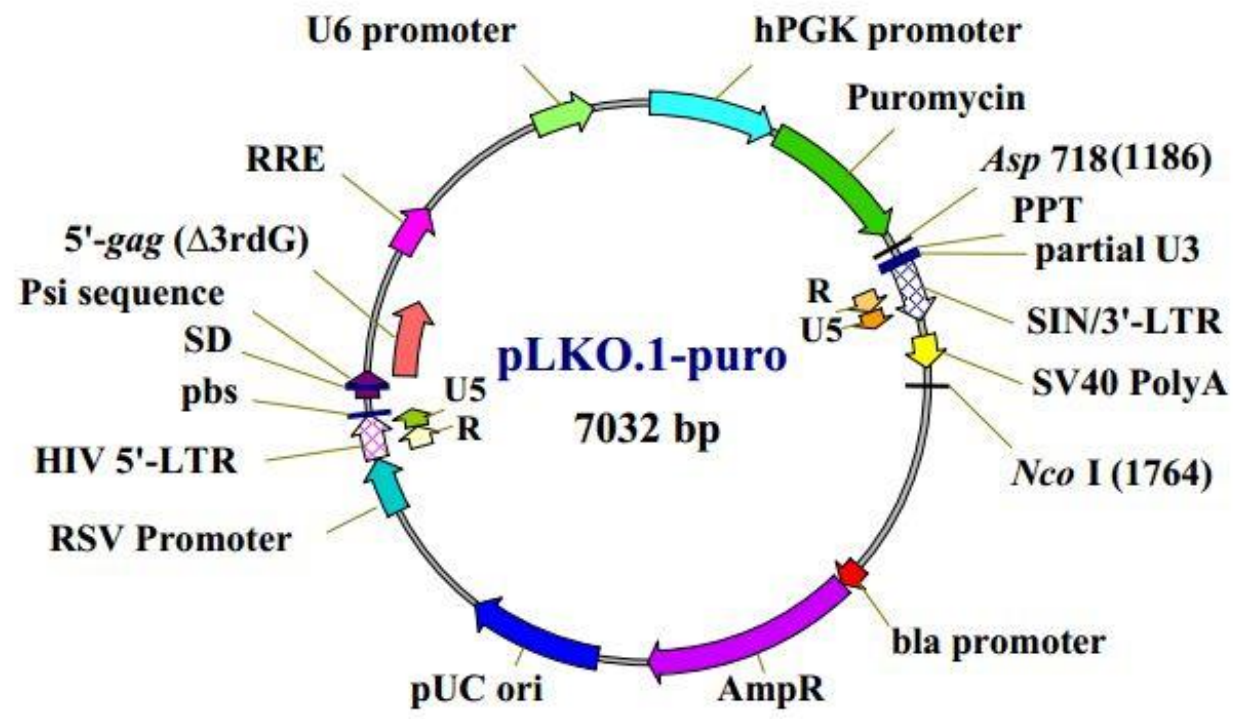


図1 ベクターPlko.1-puroの構図

表 2. 本研究に用いた shRNA のシーケンス

| shRNA name | Sequence information |
|------------|--|
| shRNA_1-F | CCGGCAGAGAAATCTGCATTCTATTCTGAGAATAGAATGCAGATTTCTCTGTTTTT |
| shRNA_1-R | AATTCAAAAACAGAGAAATCTGCATTCTATTCTCGAGAATAGAATGCAGATTTCTCTG |
| shRNA_2-F | CCGGGCCTGGACTCTCTCATCAATACTCGAGTATTGATGAGAGAGTCCAGGCTTTTT |
| shRNA_2-R | AATTCAAAAAGCCTGGACTCTCTCATCAATACTCGAGTATTGATGAGAGAGTCCAGGC |
| shRNA_3-F | CCGGCCACTCTCTGTTACCTGCATTCTCGAGAATGCAGGTAACAGAGAGTGGTTTTT |
| shRNA_3-R | AATTCAAAAACCACTCTCTGTTACCTGCATTCTCGAGAATGCAGGTAACAGAGAGTGG |
| shRNA_4-F | CCGGCCTGGATTAAGAAGAAAGGATCTCGAGATCCTTTCTTCTTAATCCAGGTTTTT |
| shRNA_4-R | AATTCAAAAACCTGGATTAAGAAGAAAGGATCTCGAGATCCTTTCTTCTTAATCCAGG |

第6項 APE1 過剰発現ベクターの構築

APE1 の過剰発現を誘導するベクターを構築するために、本研究では pcDNA3.1 vector を使用した (図 2)。pcDNA3.1 ベクターは、安定な遺伝子過剰発現を誘導することから前述した過去の研究などで使用された[55]。当該ベクターに APE1 遺伝子を結合させたものを構築して、APE1 遺伝子の過剰発現系を確立させることとした。当該ベクターに挿入する APE1 cDNA のシーケンスは、NCBI で検索して設計した (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001641.3)。当該 cDNA の人工遺伝子合成は、TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO.,LTD に委託した。合成された APE1 遺伝子を pcDNA3.1 ベクターに挿入するために、直線状にした pcDNA3.1 ベクターに制限酵素 EcoR I および Xho I を添加して、pcDNA3.1 ベクターの Double digestion を 37°C にて 3 時間実施した後、Tris-EDTA (TE) Buffer でプラスミドを回収、精製、溶解した。APE1 cDNA 配列を pcDNA3.1 vector に挿入するために、アニーリングした APE1 cDNA と pcDNA3.1 ベクターを ligase と混合して、45 分間室温にてライゲーション反応させた。

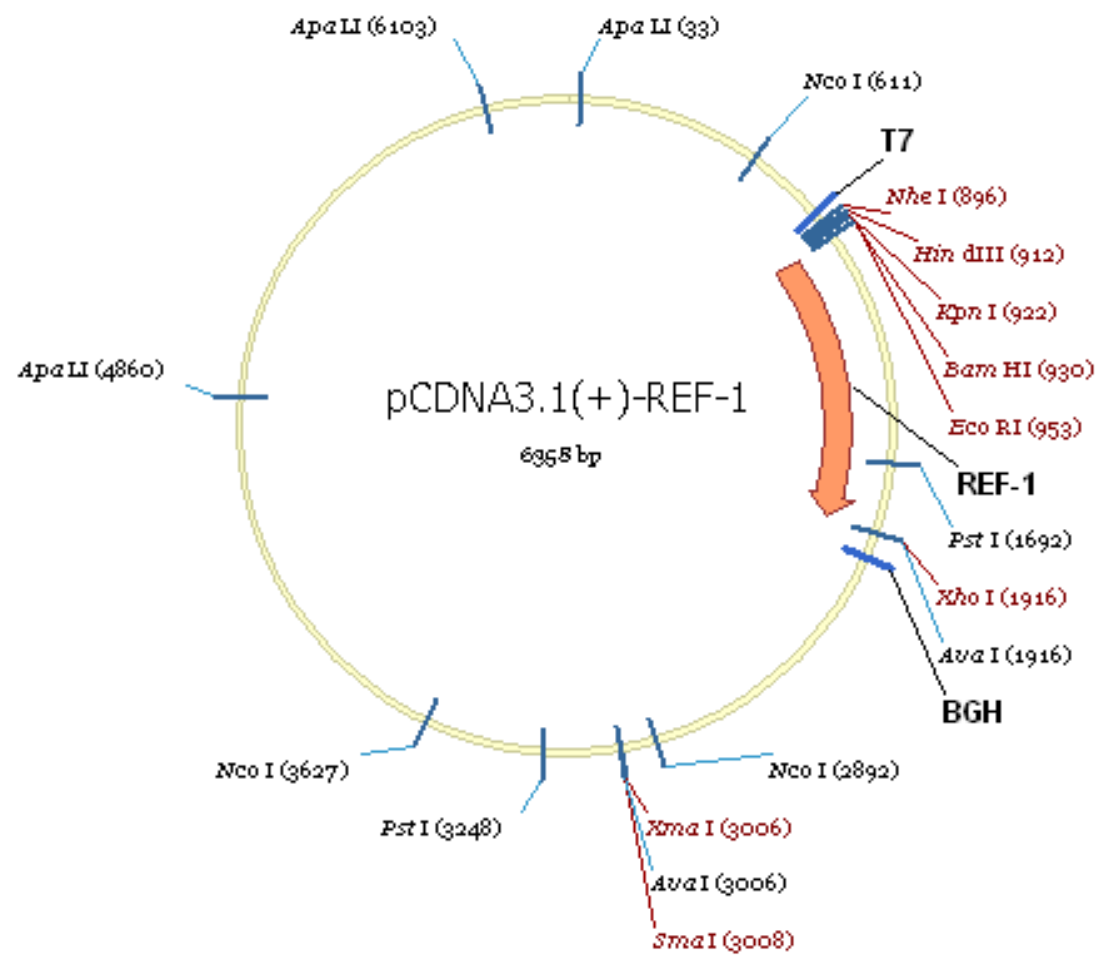


図2 ベクター-pcDNA3.1-APE1の構図

表 3. APE1 cDNA シーケンスの結果

ATGCCGAAGCGTGGGAAAAAGGGAGCGGTGGCGGAAGACGGGGATGAGCTCAGGACAGAGCCAGAGGCCAAGAA
GAGTAAGACGGCCGCAAAGAAAAATGACAAAGAGGCAGCAGGAGAGGGCCCAGCCCTGTATGAGGACCCCCCAGA
TCAGAAAACCTCACCCAGTGGCAAACCTGCCACACTCAAGATCTGCTCTTGGAATGTGGATGGGCTTCGAGCCTG
GATTAAGAAGAAAGGATTAGATTGGGTAAAGGAAGAAGCCCCAGATATACTGTGCCTTCAAGAGACCAAATGTTC
AGAGAACAACACTACCAGCTGAACTTCAGGAGCTGCCTGGACTCTCTCATCAATACTGGTCAGCTCCTTCGGACAA
GGAAGGGTACAGTGGCGTGGGCTGCTTTCCCGCCAGTGCCCACTCAAAGTTTCTTACGGCATAGGCGATGAGG
AGCATGATCAGGAAGGCCGGGTGATTGTGGCTGAATTTGACTCGTTTGTGCTGGTAACAGCATATGTACCTAAT
GCAGGCCGAGGTCTGGTACGACTGGAGTACCGGCAGCGCTGGGATGAAGCCTTTCGCAAGTTCCTGAAGGGCCT
GGCTTCCCGAAAGCCCCTTGTGCTGTGTGGAGACCTCAATGTGGCACATGAAGAAATTGACCTTCGCAACCCCAA
GGGGAACAAAAAGAATGCTGGCTTCACGCCACAAGAGCGCCAAGGCTTCGGGGAATTACTGCAGGCTGTGCCAC
TGGCTGACAGCTTTAGGCACCTCTACCCCAACACACCCTATGCCTACACCTTTTGGACTTATATGATGAATGCTCG
ATCCAAGAATGTTGGTTGGCGCCTTGATTACTTTTTGTTGTCCCACTCTCTGTTACCTGCATTGTGTGACAGCAA
GATCCGTTCCAAGGCCCTCGGCAGTGATCACTGTCCTATCACCTATACCTAGCACTGTGA

第7項 プラスミド DNA の増幅と抽出

遺伝子発現を制御するためのプラスミド DNA を増幅するために使用するコンピテントセルは塩化カルシウム法により調製し、トランスフォーメーション可能な *E.coli*DH5a コンピテントセルとした。コンピテントセルへのプラスミド DNA の導入はヒートショック法に基づいて行い、100 μ l *E.coli*DH5a コンピテントセルに 1 μ l recombinant plasmid DNA を添加して、ゆっくり混合した。氷上で 30 分置いた後、42°Cの温水に 90 秒入れ、その後すぐに氷上で 2 分間冷却させた。800 μ l LB 培地を添加して、37°Cで 1 時間インキュベーションした。LB 培地から 200 μ l を取り出して、ピューロマイシンの板に塗って 37°C 12 時間培養した。培養した *E.coli*DH5a コンピテントセルを 5ml LB 培地に移して 12 時間培養した。

コンピテントセルからのプラスミド DNA の抽出には、プラスミド抽出キット D1150 を使用した。まず、100ml の培養液を 2500 r/min で遠心分離した。上清液を破棄した後、沈殿物に細胞溶解のための試薬を添加して緩やかに混合し、DNA の沈殿を遊離させた。2500 r/min で遠心分離して、上清液だけを分取した。上清液に Endotoxin Removal Reagent を混合して、氷上で 2 分間置き、溶液が透明に変化したのを確認後に 37°Cの温水中に 5 分間置いた。溶液を振動懸濁した後、2500 r/min で遠心分離して DNA 層とエンドトキシン層を分離させた。DNA 層だけを分取して、Binding buffer を添加して十分に混ぜた後、吸着筒に入れて 2 分間室温に置いた。2500 r/min で遠心分離した後、吸着筒に洗浄液を入れて 500 r/min 遠心分離した。吸着筒に再度洗浄液を入れて 2500 r/min で遠心分離した後、50°Cのインキュベーターの中に 5 分間置いた。吸着筒を遠心管上に載せ、2ml 洗浄液を入れて室温で 5 分置いた後、2500 r/min で遠心分離して得られたサンプルを回収した。

第8項 細胞への遺伝子導入

上記項目で構築したプラスミド DNA をモデル肝細胞 L-02 に導入するために、L-02 細胞をトランスフェクションの 1 日前に 6 ウェルプレート (1 \times 10⁶細胞/ウェル) に播種した。細胞が 90%コンフルエントに達したのを確認した後、培地を交換した。培地交換 2 時間後、7.5 μ g のプラスミド DNA を 250 μ l の OPTI-MEM 培地に加えて完全に混合した。10 μ l の Lipofectamine 2000 溶液を新たな 250 μ l の OPTI-MEM に加え、穏やかに混合して室温で 5 分間放置した。プラスミド DNA と OPTI-MEM 培地の混合液と Lipofectamine 2000 を混合して 500 μ l とし、室温で 20 分間放置した。プラスミド DNA と OPTI-MEM 培地の混合液と Lipofectamine 2000 の混合液を 6 ウェルプレートの各ウェルに加えて前後穏やかに混合した後、5%CO₂、37°C条件下で培養した。6 時間後、培地を交換した (各ウェルに 2 ml) 。48 時間後、遺伝子発現の検出のために細胞を回収した。

第9項 リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析

APE1 遺伝子のノックダウンあるいは過剰発現を誘導させる目的で各種ベクターを導入した細胞において APE1 遺伝子の発現が制御されているか否かを確認するためにリアルタイム PCR 法を実施した。まず、Trizol 法で Total cellular RNA 抽出し、10 μ L の RNA を用いて逆転写反応を実施して cDNA 化した。なお、GAPDH 遺伝子を相対定量分析の内部標準として使用した。定量反応システムでは、12.5 μ L の SYBR Premix Ex Taq、1 μ L の PCR Forward Primer、1 μ L の PCR Reverse Primer、2 μ L の cDNA サンプル、8.5 μ L の超純水をそれぞれ加えて反応液を総容量 25 μ L とし、各サンプルについて同一の反応液を 3 つ準備した。なお、このリアルタイム PCR で用いたプライマーの配列を表 4 に示した。増幅は、プレ変性 (Pre-denaturation) を 95°C で 30 秒を実施した後、95°C で 5 秒、60°C で 20 秒の行程を合計で 40 サイクル行った。2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法を用いて、APE1 mRNA の発現相対比を計算した。

表 4. 本研究のリアルタイム PCR で使用したプライマーのシーケンス

| Gene | Sequence (5' -> 3') | Amplicon Size |
|-------|-----------------------------|---------------|
| APE1 | FP: ACGGGGAAGAACCCAAGTC | 127 |
| | RP: GGTGAGGTTTTCTGATCTGGAG | |
| GAPDH | FP: GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT | 197 |
| | RP: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG | |

第 10 項 Western blotting 法によるタンパク質発現解析

APE1 遺伝子のノックダウンあるいは過剰発現を誘導させる目的で各種ベクターを導入した細胞において APE1 遺伝子の発現がタンパク質レベルで制御されているか否かを確認するために Western blot 法を実施した。まず、培養後に回収された細胞を PBS で洗浄し(2 回)、培養細胞に溶解バッファーを加えた。ソニケーションを使用して細胞を破碎した後、2500 r/min 遠心分離した。上清を新しいチューブに移して、沈殿物は破棄した。サンプル中のタンパク質含有量は BCA 法により定量した。電気泳動用試薬とサンプルを 100°C で 5 分間加熱してタンパク質を変性させた後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (150V、45 分) を行った。0.1mA の定電圧条件下で Western blotting を 60 分間実施してゲルからメンブレンにタンパク質を転写後、メンブレンを 5% スキムミルク-TBST 溶液に入れて、室温で 1 時間ブロッキングした。希釈した抗 APE1 一次抗体(1:800 希釈)あるいは抗 GAPDH 一次抗体 (1:800 希釈)を入れて、緩やかに振盪しながら 4°C で一晩インキュベートした。メンブレンを TBST で洗浄後、二次抗体 (1:5000 希釈) を加え、37°C で 1 時間、恒温シェーカーでインキュベートした。メンブレンを PBS で洗浄後、ECL 試薬を用いて化学発光反応を行い、その発光をフィルムに現像して可視化した。Color development 法を実施して、タンパク質発現相対を計算した。Image J (Image Processing and Analysis in Java) 画像解析ソフトウェアでグレー値と APE1/GAPDH の APE1 発現を計算したデータを取得した。

第 11 項 ELISA 法による炎症関連因子の産生量の解析

APE1 遺伝子のノックダウンあるいは過剰発現を誘導させた細胞からの炎症関連因子の分泌量を評価する目的で、細胞培養上清液の IL-1、IL-6、IL-10、TNF α 、INF- γ およびその他の炎症性因子の含有量を ELISA 法 (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) によって定量した。100 μ l の標準と細胞培養上清液を準備して、ウェルに添加してから 2 時間室温でインキュベートした。溶液をウェルから吸引して、ウェルを 4 回洗浄した。100 μ l の組換えモノクローナル抗体をウェルに添加して、室温で 1 時間インキュベートした。溶液をウェルから吸引して、ウェルを 4 回洗浄した。ウェルに 100 μ l の希釈した HRP コンジュゲートを添加した後、室温で 30 分間インキュベートした。溶液をウェルから吸引して、ウェルを 4 回洗浄した。ウェルに 100 μ l の発色基質を添加して、暗所でプレートに現像した。ウェルに 100 μ l の停止液を添加した後、吸光度を解読して、プレートを評価した。曲線適合統計ソフトを使用して、標準の濃度と OD 値に従ってプロットした。次に、サンプルの濃度を OD 値に従って標準曲線を用いて算出し、結果として相対発現レベル (relative expression level) も算出した。

第 12 項 Annexin V-FITC/PI double labeling 法による細胞のアポトーシスの解析

APE1 遺伝子のノックダウンあるいは過剰発現を誘導させた細胞におけるアポトーシスを呈した細胞の割合を評価するために、Annexin V-FITC/PI double-staining apoptosis test kit を用いたフローサイトメトリー法によるアポトーシス細胞の検出を行った。各グループの細胞を回収して、サンプルを 2500 r/min で遠心分離し、上清液と細胞破片を除去した。細胞を再び懸濁し、Annexin V-FITC 及び PI を添加して細胞を蛍光染色した。暗室で 20 分間インキュベートした後、PBS 300 μ l をサンプルに添加して、フローサイトメーターで各細胞における FITC および PI の蛍光色素の蛍光強度を測定した。

第 13 項 Bioinformatics 法で APE1 のタンパク質間相互作用を予測と分析

APE1 と相互作用するタンパク質を明らかにするために、STRING website (Version: 10.5)を用いた解析を実施した。その結果に基づいて、APE1 タンパク質間相互作用の視覚的ネットワーク図を作成した。また、SPSS 17.0 を使用して APE1 タンパク質間相互作用の相関係数を計算した。STRING website は、5090 種の生物に関する 2460 万のタンパク質のデータソースを基盤として合計 20 億以上の機能的なタンパク質間相互作用を記録しているデータベースである。そのデータソースは、Human Protein Reference Database (HPRD)、BioGRID や Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) などの複数のオンラインデータベース、実験データ、PubMed などの文献データベースから収集されたものである。STRING では、様々なカテゴリに属する膨大な情報をデータソースから抽出し、2 種類のタンパク質間の機能的な関連を探索することによってタンパク質間の機能的な相互関係を解析する仕組みをもつシステムである。

第 14 項 統計分析

統計分析には SPSS 17.0 を使用した。測定データは平均±標準偏差(mean)として表示した。一元配置分散分析 (one way analysis of variance) 及び t 検定と f 検定を使用して、群間の平均の差を比較した。P 値が 0.05 未満の結果を統計的有意とみなした。

第3章 結果

第1項 肝移植患者の末梢血における発現変動遺伝子のスクリーニング

Gene Expression Omnibus (GEO) データベースの中から、9名の免疫寛容の誘導をみとめた肝移植患者の末梢血の遺伝子発現プロファイリング (GSM124753, GSM124834, GSM124836, GSM124845, GSM124851, GSM124853, GSM124646, GSM124850, GSM124648)と、8名の免疫寛容の誘導をみとめなかった患者の末梢血の遺伝子発現プロファイリング (GSM124863, GSM124833, GSM124575, GSM124748, GSM124838, GSM124840, GSM124842, GSM124675)を選択した。そして、免疫寛容の誘導をみとめた群とみとめなかった群との間で遺伝子発現を比較し、発現変動した遺伝子の抽出を図った。その結果、免疫寛容の誘導をみとめた肝移植患者において高発現している遺伝子は13種類存在した(図3)。なかでも、APE1、MS4A6A, PTGDR, NFATC3, SH2D1B, ATG4C は、免疫寛容の誘導をみとめた9名の患者すべてにおいて高発現していた。これらの高発現遺伝子群の中で、特に APE1 は移植と免疫に関する報告が多くなされているタンパク質である。APE1 は、DNA修復とレドックス制御の機能を有する酵素であり、細胞の修復、抗炎症、アポトーシスの抑制に関与することが報告されている。また、東京大学人工臓器・移植外科における以前の研究では、APE1 は、ラット肝臓移植モデルにおいて虚血によって引き起こされる酸化ストレスの誘導を抑制し、肝細胞の再生に影響することを見出した[82]。近年のマウス脾細胞を用いた研究では、APE1 は臓器移植の際、抗原提示細胞を介してヘルパーT細胞の反応を調節する役割を有することを示唆する報告もある[79]。免疫寛容には、拒絶反応の原因となるアロ免疫応答が関与しており、本研究における遺伝子発現データ解析において肝移植の免疫寛容の患者で APE1 遺伝子が高発現していることから、APE1 の発現変動が肝移植の免疫寛容に関与していると考えられた。そこで、本研究では APE1 遺伝子を後続の研究の対象に選択した。

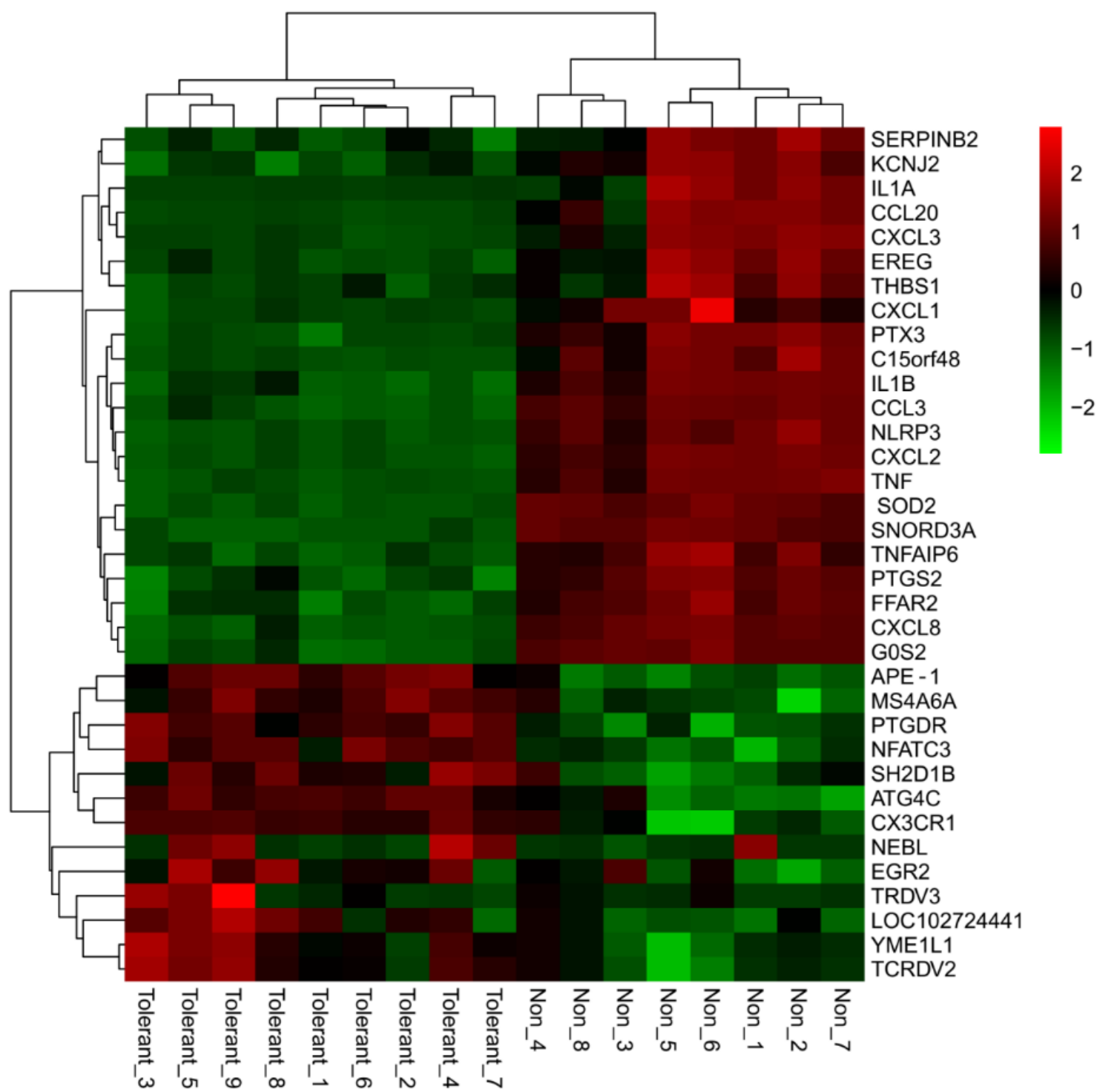


図3. 肝移植患者における免疫寛容に関連する発現変動遺伝子のスクリーニング

第2項 APE1 shRNA ベクター構築とサイレンシング効率の評価

APE1shRNA の配列がベクターに挿入されたことを確認するために、各種ベクターのシーケンシングを実施した。その結果、プラスミドのシーケンシング結果から4種類の APE1 shRNA についてそれぞれのベクターが構築されたことを確認した (図 4A)。各種ベクターの作用により L-02 細胞における APE1 の発現を低下させた細胞を樹立するために、これら4種類の shAPE1 ベクターをそれぞれ L-02 細胞に形質導入し、shAPE1 安定的導入細胞をピューロマイシン耐性 (600 µg/mL) に基づいて選択した。同時に、negative control vector (shNC) を導入した L-02 細胞をコントロールとして使用した。各種 L-02 細胞における APE1 mRNA の発現を評価するためにリアルタイム PCR を実施した結果、shRNA_1, shRNA_2, shRNA_3, shRNA_4 の各種ベクター導入細胞における APE1 mRNA 発現はコントロール(shNC 導入細胞)よりも有意に低かった ($P < 0.05$) (図 4B)。また、Western blotting を実施した結果、shRNA_1, shRNA_2, shRNA_3, shRNA_4 の各種ベクター導入細胞における APE1 タンパク質の発現は、コントロール(shNC 導入細胞)よりも有意に低かった (図 4C)。各種ベクター導入細胞におけるタンパク質発現低下の傾向は、mRNA の発現低下の傾向と一致していた。以上の結果は、導入した shRNA による APE1 遺伝子発現の干渉効果が L-02 細胞において有効に作用していることを示唆している。これら shRNA ベクターの中で、APE1 shRNA_1 が L-02 細胞において最も顕著なサイレンシング効果を示したことから、その後の実験では APE1 shRNA_1 導入細胞を使用した。

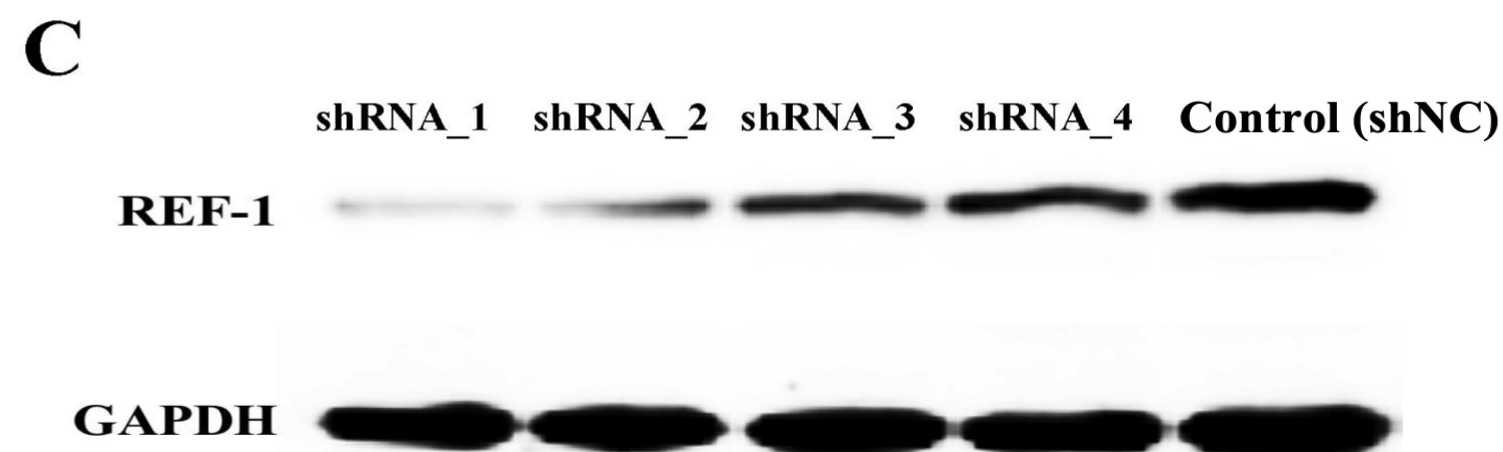
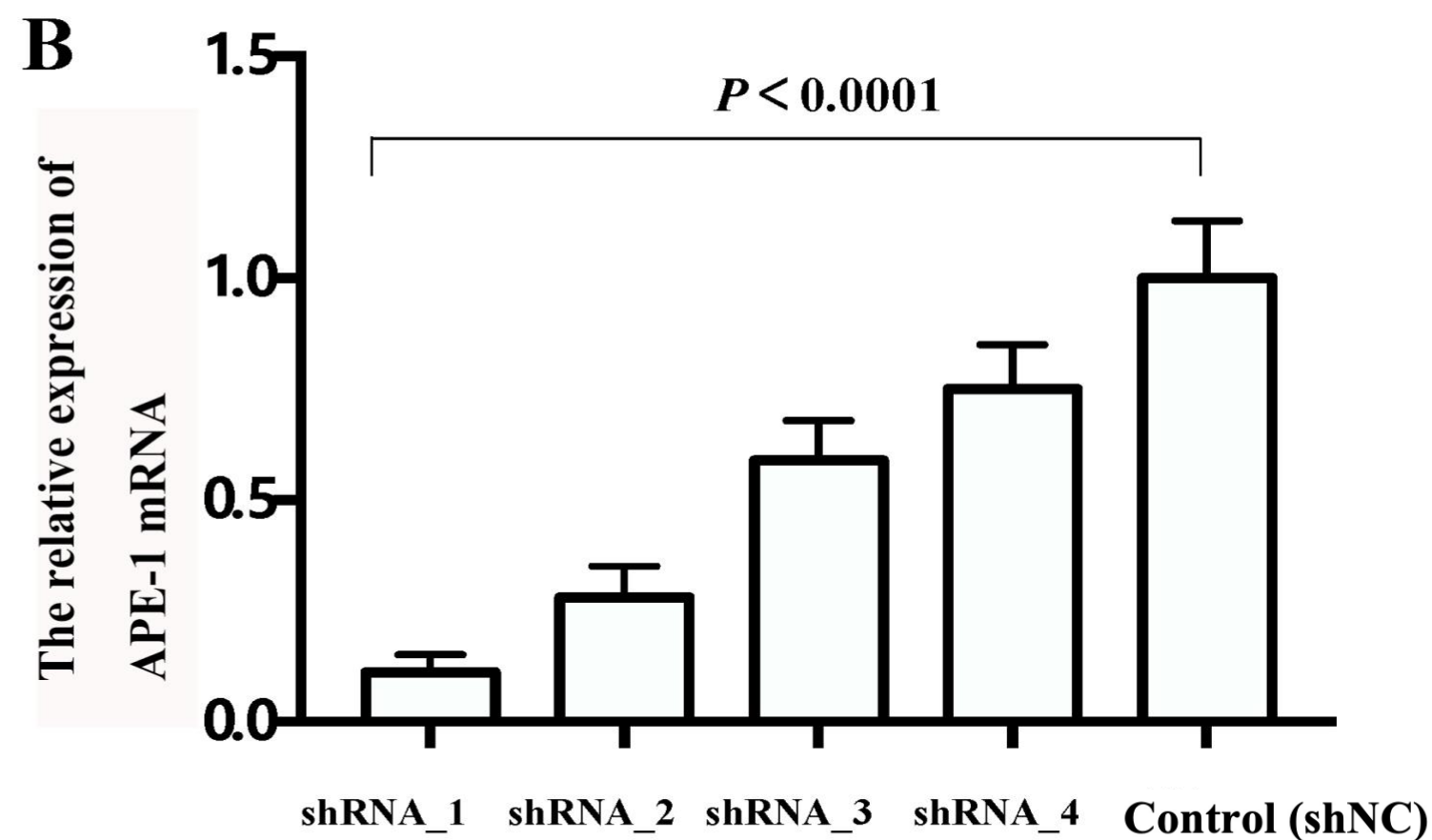
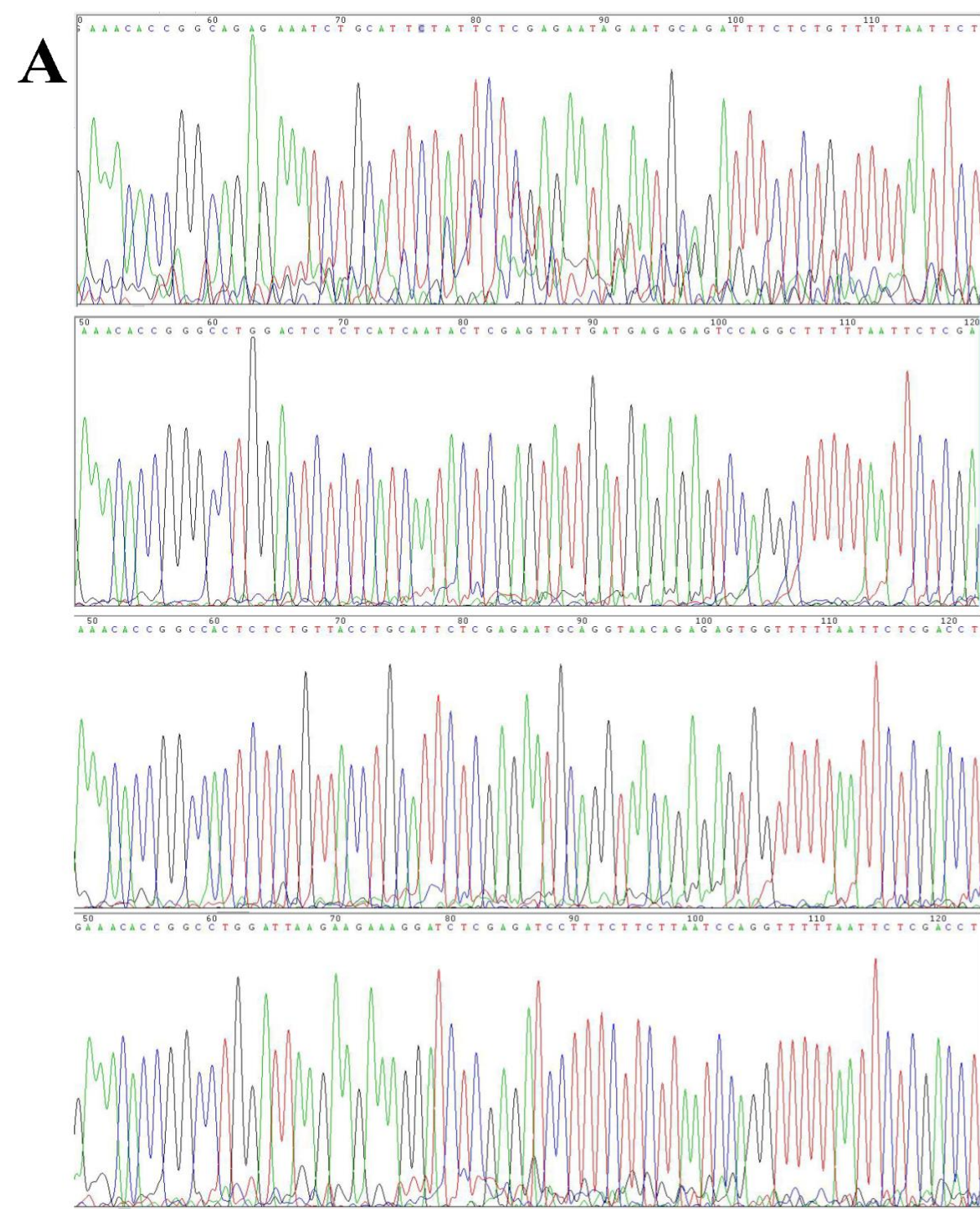


図4. APE1 shRNA ベクターの構築とサイレンシング効果の評価。(A) APE1 shRNA ベクターのシーケンシング結果。(B-C) APE1 shRNA ベクターあるいは shNC ベクターを安定的に導入した L-02 細胞における APE1 遺伝子の発現を評価した qRT-PCR およびウエスタンブロット解析の結果。

第3項 APE1 過剰発現ベクターの構築と効率の評価

L-02 細胞において APE1 遺伝子の過剰発現を誘導させるために、APE1 遺伝子を組み込んだベクターの構築を試みた。前項と同様にシーケンシングを実施し、APE1 過剰発現ベクターが構築されたことを確認した (図 5A)。L-02 細胞に遺伝子導入し、安定的形質導入が達成された細胞に対してリアルタイム PCR による APE1 mRNA の発現解析を実施した。その結果、APE1 過剰発現ベクター導入細胞における mRNA の発現は対照よりも有意に高かった ($P < 0.001$ 図 5B)。加えて、ウェスタンブロッティングの結果、APE1 タンパク質の発現に関しても過剰発現ベクター導入細胞の方が対照より有意に高く、mRNA レベルでの検出と一致していた (図 5C)。以上の結果は、構築されたベクターが APE1 過剰発現ベクターとして L-02 細胞において機能していることを示唆している。

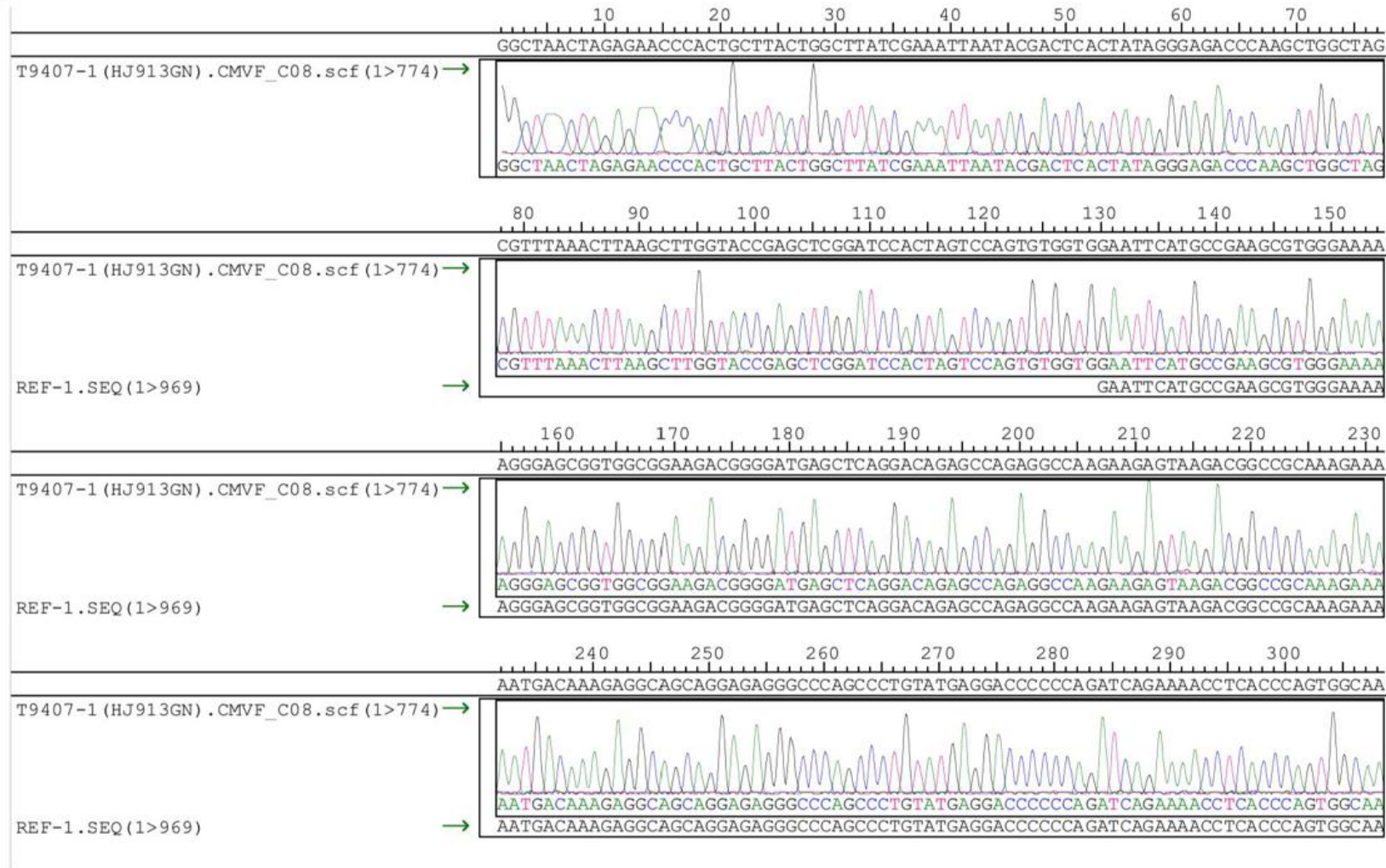
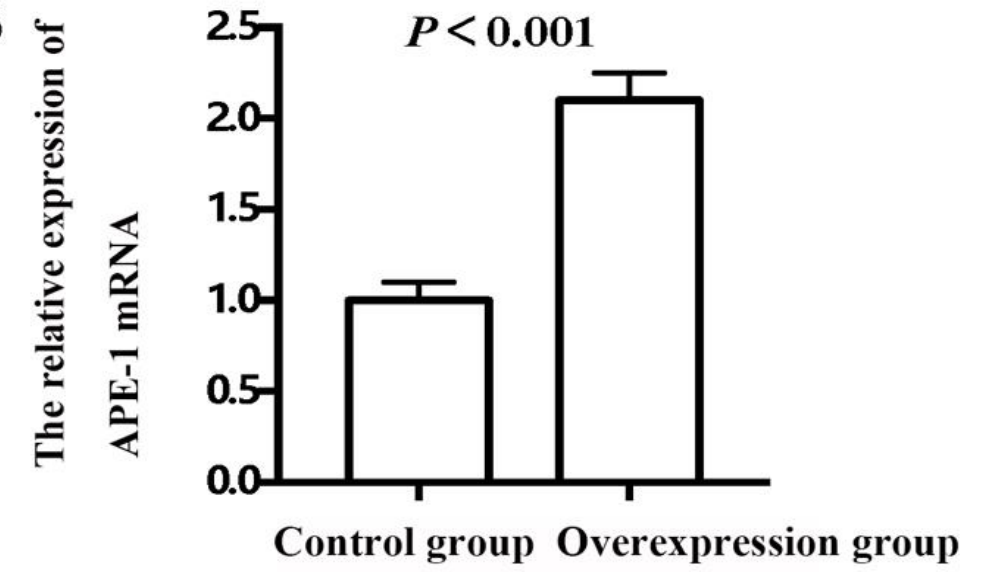
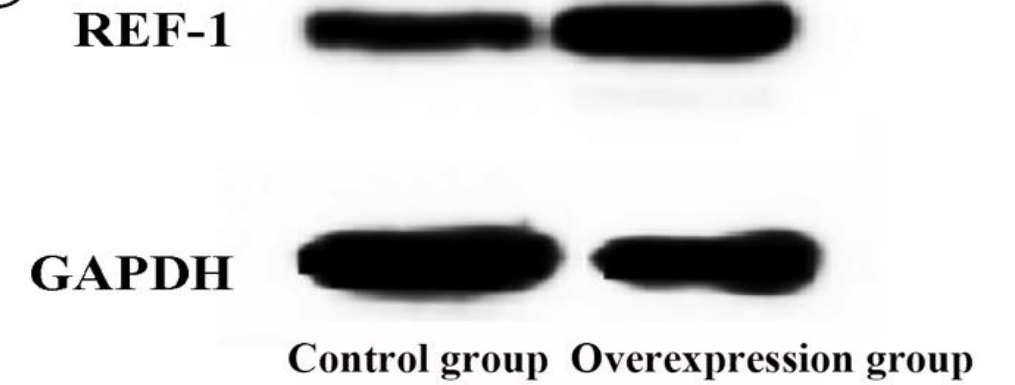
A**B****C**

図5. APE1 過剰発現ベクターの構築と効率の評価。(A) APE1 shRNA ベクターのシーケンス結果。(B-C) APE1 過剰発現ベクターを安定的に導入した L-02 細胞における APE1 遺伝子の発現を評価した qRT-PCR およびウエスタンブロット解析の結果。

第4項 L-02細胞における APE1 発現変動と炎症反応関連因子の発現と変化

L-02細胞での各種炎症関連因子の発現における APE1 の発現変動の影響を明らかにする目的で、L-02細胞のコントロール、APE1サイレンシング細胞、APE1過剰発現細胞における各種炎症性因子 (IL-1 β 、IL-10、TNF α 、IFN- γ) の分泌量を ELISA 法により解析した。その結果、IL-1 β 、IL-10、TNF α および IFN- γ の発現が APE1サイレンシング細胞で有意に増加し、APE1過剰発現細胞で有意に減少した (P < 0.05) (図6)。また、各炎症関連因子 (IL-1 β 、IL-10、TNF α 、IFN- γ) の結果を、分散分析によりコントロール、APE1サイレンシング細胞、APE1過剰発現細胞の3群間の平均の差 (F値) と P値で示した。F値が大きいほど、有意差がある事が示した。以上の結果から、APE1の発現変動が L-02細胞における炎症性因子の発現に寄与することが示唆された。

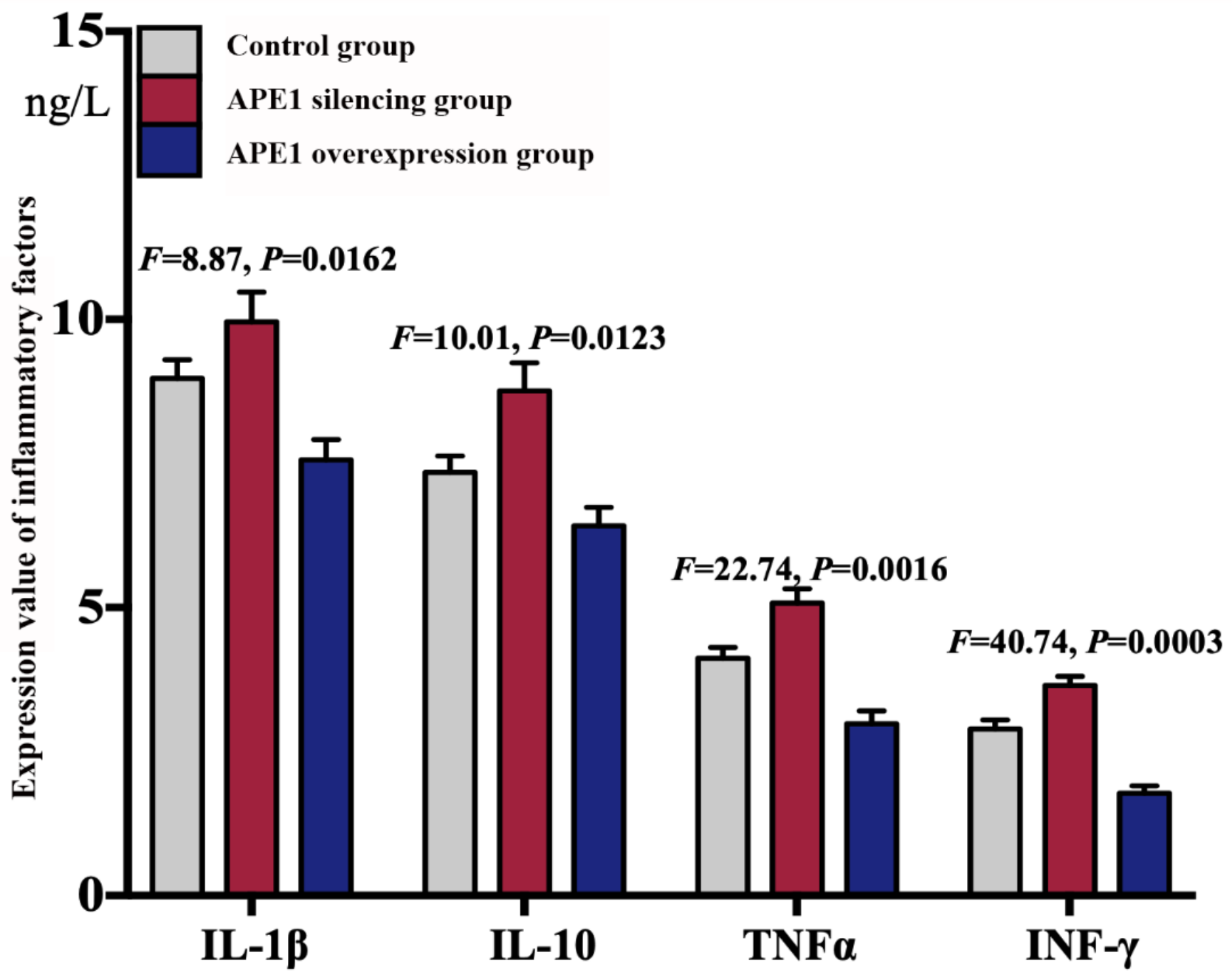
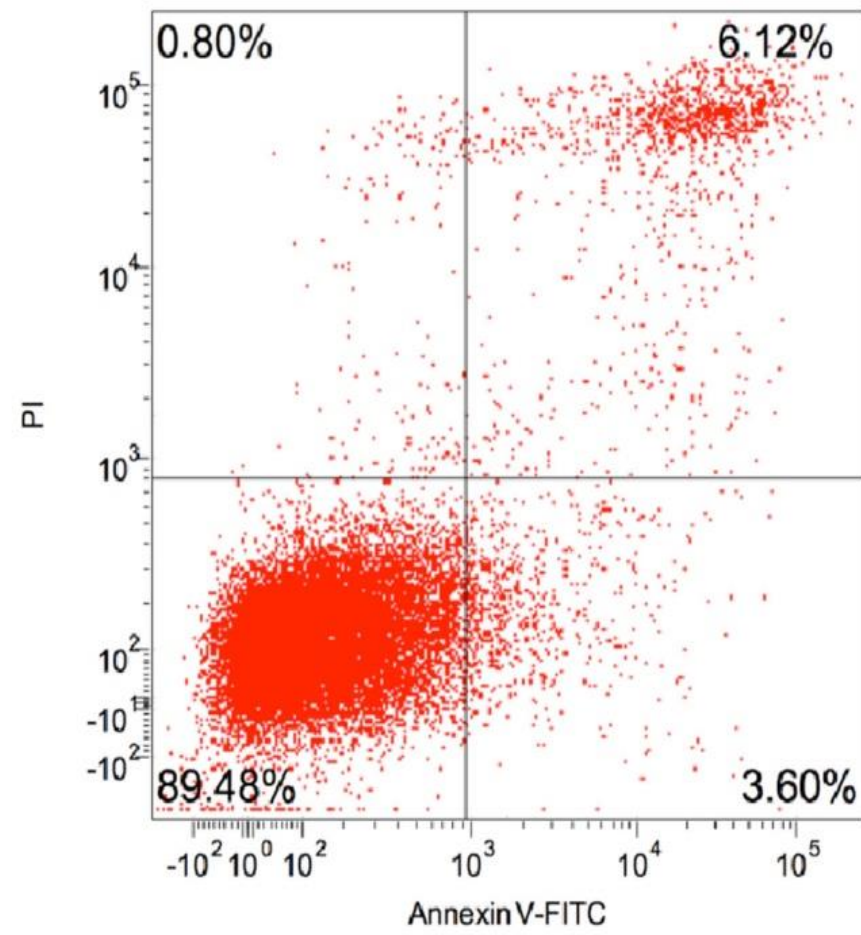


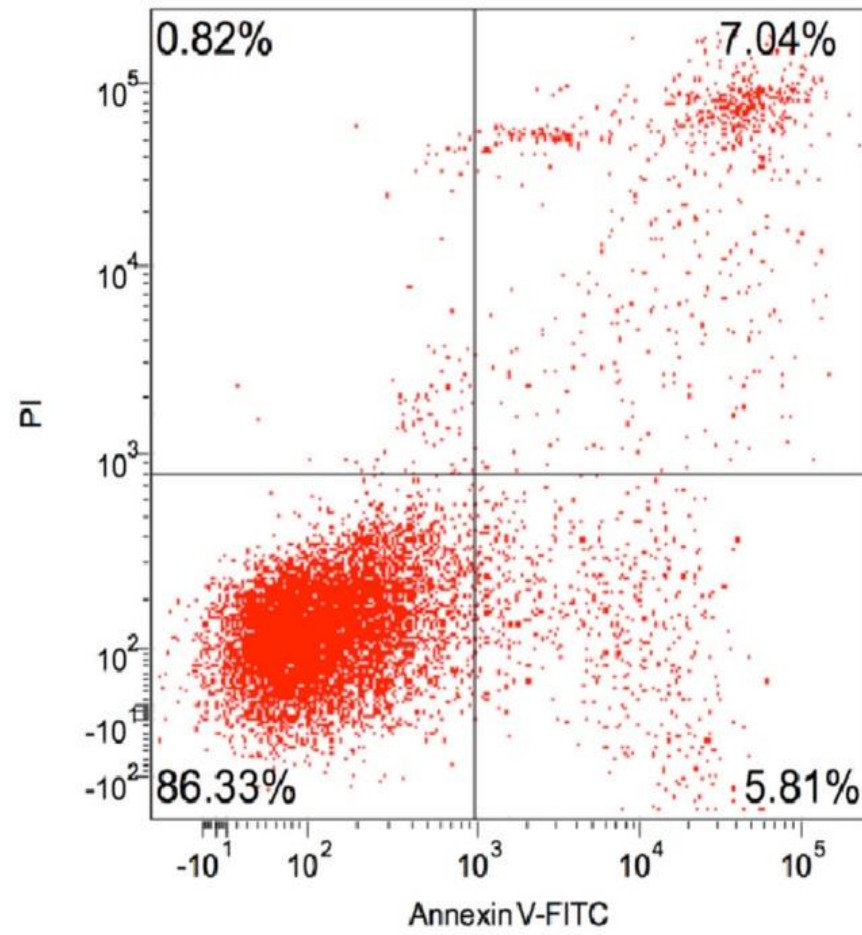
図 6. L-02 細胞における炎症性因子の産生に対する APE1 発現のサイレンシングおよび APE1 過剰発現の効果の評価。

第5項 L-02細胞における APE1 の発現変動とアポトーシスの誘導との関連性

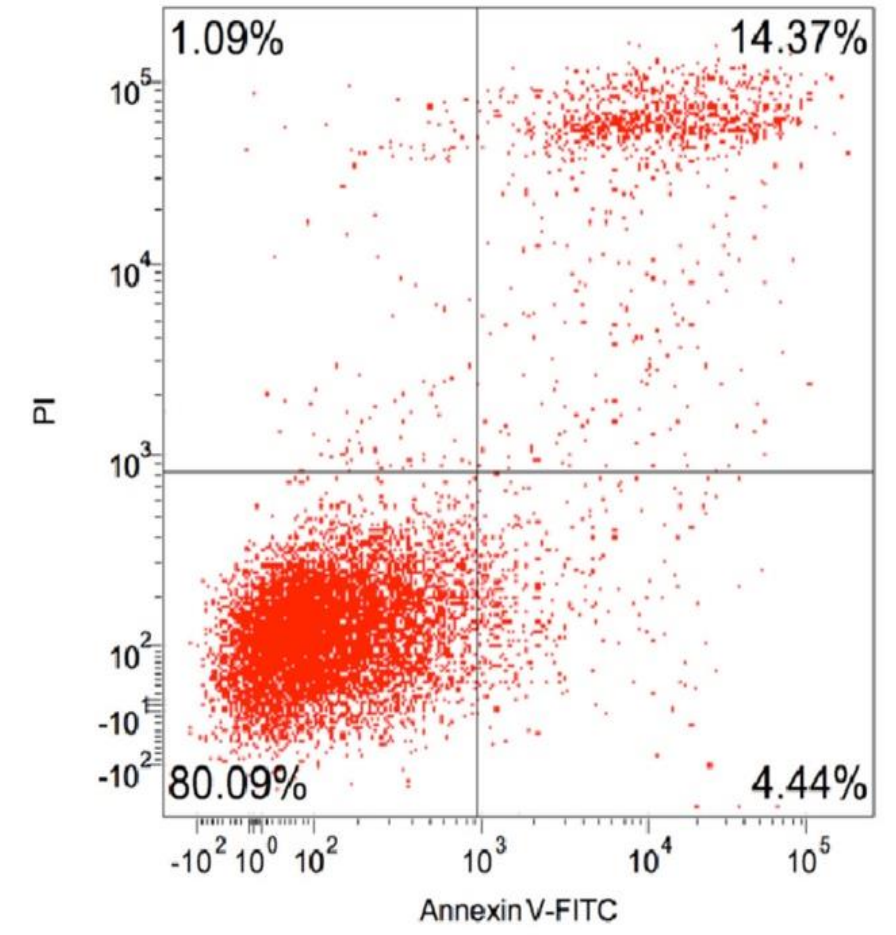
L-02細胞における APE1 の発現変動がアポトーシスの誘導に及ぼす影響を評価するために、L-02細胞（コントロール）、APE1サイレンシング細胞、APE1過剰発現細胞におけるアポトーシスの誘導について Annexin V-FITC/PI double-labeling 法により解析した。本法で得られる結果は、Annexin V-FITC陽性かつPI陰性細胞が初期アポトーシスを誘導した細胞を意味し、Annexin V-FITC陽性かつPI陽性細胞が後期アポトーシスを誘導した細胞を意味している。Annexin V-FITC陽性かつPI陰性細胞の割合と Annexin V-FITC陽性かつPI陽性細胞の割合の合計を各グループのアポトーシス率と定義した。その解析の結果、L-02細胞のコントロールで平均（ 13.24 ± 0.23 ）%、APE1サイレンシング細胞で平均（ 19.75 ± 0.39 ）%、APE1過剰発現細胞で平均（ 10.61 ± 0.36 ）%であった。APE1の過剰発現はアポトーシスを誘導したL-02細胞の割合を有意に減少させ、APE1サイレンシングはアポトーシスを誘導したL-02細胞の割合を有意に増加させた。本研究で得られた結果は、Annexin V-FITC/PI double-labeling 法を10回実行した。分散分析ではL-02細胞（コントロール）、APE1サイレンシング細胞、APE1過剰発現細胞の3群間の平均の差（F値）が得られた。F値が大きいほど、有意差がある事が示した（ $F = 192.6$ 、 $P < 0.01$ ）。なお、APE1サイレンシング細胞の初期アポトーシス細胞及び後期アポトーシス割合はそれぞれ14.37%と4.44%となり、初期及び後期の双方ともAPE1過剰発現細胞やコントロールより有意に増加したが、後期アポトーシス細胞の割合の増加がより顕著であった（図7）。以上の結果から、APE1の発現はL-02細胞のアポトーシスを抑制する効果を有すると示唆される。



APE1 overexpression group



Control group



APE1 silencing group

図7 L-02細胞における APE1 サイレncing細胞と APE1 過剰発現細胞のアポトーシスの誘導。

第6項 Bioinformatics 法による APE1 のタンパク質間相互作用の予測解析

STRING website (Version: 10.5)を用いて、APE1 のタンパク質間相互作用 (protein-protein interaction network) を予測した。その結果、図 8A に示すように、APE1 は炎症性免疫応答関連タンパク質 (ANP32A、FEN1、HMGB2、LIG1、MUTYH、NTHL1、OGG1、PCNA、POLB、SET) との潜在的な相互作用があることが示唆された。APE1 と各種タンパク質との潜在的な相互関係の強弱を意味する相関係数は図 8B に示す通りとなった。前述した炎症性免疫応答関連タンパク質と APE1 との相関係数は平均 0.975 という高値となり、APE1 と各種炎症性免疫応答関連タンパク質との潜在的相互関係は強いことが示唆された。

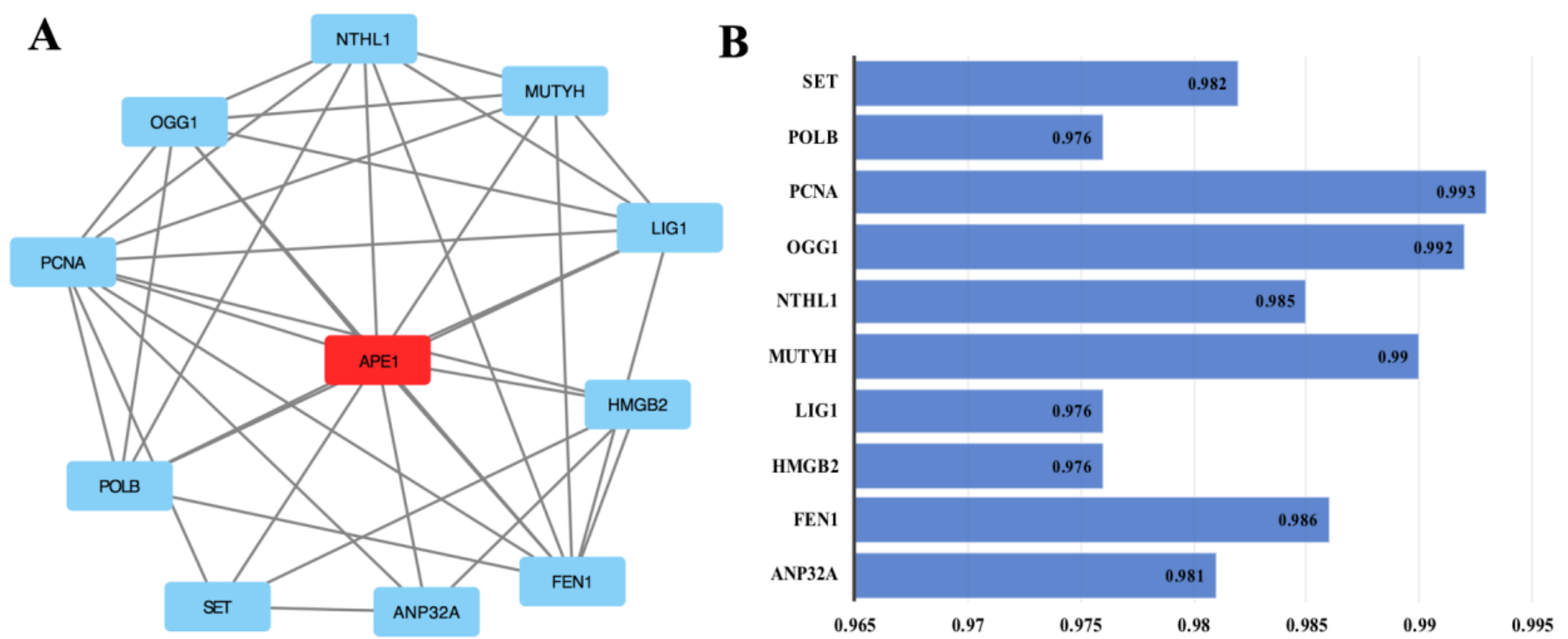


図 8. APE1 と相互作用するタンパク質の予測解析。(A) APE1 タンパク質間相互作用ネットワークの予測結果。(B) タンパク質と APE1 の相関の強さを相関係数で示す。

第4章 考察

肝移植は現在の末期肝不全の治療として最も成功している治療法である[61-64]。移植治療における最大の問題は移植臓器に対する拒絶反応であるが、現在までに進歩を遂げてきた免疫抑制に関する技術により、レシピエントにおける移植片に対する拒絶反応を制御できるようになってきた。その結果、肝移植の短期治療成績が向上している[65-68]。しかし、免疫抑制薬は慢性拒絶反応に対して著しい効果をもたらさなかった[69-71]。また、長期的な免疫抑制剤の投与は慢性毒性の誘発の可能性があり[72-74]。以上の背景から、レシピエントにおける移植片に対する免疫寛容を誘導することが臓器移植の成功に大きな役割を有するとされる。そして、レシピエントにおいて免疫寛容が誘導されるメカニズムの解明や免疫寛容を効率的に誘導する手法の開発が重要な課題だと考えられる。

近年の肝移植研究では、計画的免疫抑制剤の減量と中止が試行されている。これらの患者は、免疫不全などを起こすことなく免疫抑制薬から完全に離脱して、体内の移植片は安定的に機能を発揮していると報告された[75]。これらの症例は、臨床では免疫抑制剤離脱と呼ばれている[76]。免疫抑制剤離脱を達成して免疫寛容を誘導したとされる患者における拒絶や免疫に関する特徴をとらえることができれば、免疫寛容の誘導に寄与する因子の解明につながる。しかし、現状では移植後に免疫寛容が誘導される詳細な機構の解析は不十分であり、免疫抑制剤離脱を達成する肝移植患者を臨床的に選別する方法は存在しない。現在までにさまざまな種類の網羅的検出技術の出現によりハイスループットスクリーニングが可能になり、免疫寛容に関する潜在的な標的遺伝子の研究も大幅に進展した。そのような網羅的遺伝子解析技術を移植患者由来の検体に対して実施することにより、種々の遺伝子の発現変動と移植患者の予後との関連性を明らかにできると考えられた。しかし、臨床での免疫抑制剤離脱は少数であり、多くの患者は長期にわたり免疫抑制剤の服用を余儀なくされている。そのため、免疫抑制剤離脱を基準とした症例群の構築は十分に行えず、遺伝子発現解析による比較評価が難しいのが現状である。一方、近年では論文を投稿する際に、NCBIが管理している遺伝子発現のデータベースであるNCBI Gene Expression Omnibus (GEO)に研究で得られたマイクロアレイデータを登録する事が要求される[78]。当該データベースには、多様な背景や疾患を有する症例の遺伝子発現解析データが蓄積されていることから、免疫寛容の誘導を基準として肝移植患者の遺伝子発現解析データを収集し、発現変動遺伝子の評価が可能であると考えられた。本研究では、免疫寛容の誘導をみとめた肝移植患者と免疫寛容の誘導をみとめなかった肝移植患者の末梢血の遺伝子発現プロファイルデータをGEOから抽出した。R言語プログラム(R version 3.2.5)を使用して各サンプルの遺伝子から発現変動遺伝子を分析した結果、免疫寛容をみとめた患者で高発現する遺伝子としてAPE1、MS4A6A、PTGDR、NFATC3、SH2D1B、ATG4Cを同定した。

APE1 は他のタンパク質に比べて移植と炎症に関する知見を多く有する。Akhter N らの研究は、APE1 の阻害剤 (E3330) を使って APE1 とヘルパーT 細胞の関係を分析した結果、APE1 は MHC に影響するレドックス調整機能があり、抗原提示細胞を介してヘルパーT 細胞の反応を調節する事を示した[79]。ヘルパーT 細胞は免疫応答の T細胞活性制御に関わっており、APE1 が移植後の臓器に影響する可能性もある事も示唆する。これらの背景から、本研究では APE1 遺伝子の高発現が肝移植での免疫寛容の誘導に関与していると考え、APE1 の機能に関する細胞実験を実施した。pLKO.1 プラスミドを用いて構築した APE1shRNA_1サイレンシングベクターと APE1 過剰発現ベクターを導入して、APE1shRNA_1サイレンシング細胞と APE1 過剰発現細胞を樹立した。APE1shRNA_1サイレンシングは、L-02 細胞における炎症反応因子(IL-1 β 、IL-10、TNF α 、INF- γ) の発現に有意な上方制御をもたらした。それに対して、APE1 の過剰発現は、L-02 細胞の炎症性因子の発現に有意な下方制御をもたらした。これらの結果は、APE1 が L-02 細胞の炎症性因子の発現の制御に関与することを示唆している。なお、IL-10 は炎症を誘導する機能と共に炎症を抑制する機能を有するとされており、APE1 の発現によって誘導される IL-10 の発現低下が及ぼす免疫学的効果は複雑であると考えられる。従って、APE1 の発現変動による IL-10 産生量の変化に関する詳細な理解には更なる解析が必要である。一方、Annexin V-FITC/PI double-labeling 法によりコントロール細胞、APE1 サイレncing 細胞、APE1 過剰発現細胞におけるアポトーシス率を解析した。その結果、L-02 細胞における APE1 発現のサイレンシングは、L-02 細胞のアポトーシス誘導を亢進させた。対して、L-02 細胞における APE1 過剰発現は、L-02 細胞のアポトーシス誘導を低下させた。この結果は、APE1 の発現性の変化がアポトーシスの誘導に関連することを示唆している。APE1 は、塩基除去修復の機構に関与することが明らかとなっている[80]。APE1 の減少により DNA 損傷を修復する能力が低下することは、アポトーシスの誘導亢進の重要な原因となると考えられる。

拒絶反応には、免疫応答、細胞障害などの多くの生理現象の誘導に関わるため、免疫寛容を達成するにはそれらの総括的な制御が重要となる。APE1 は、動脈硬化、手術などの酸化ストレス誘導環境下で抗酸化ストレス機能を誘導する遺伝子として細胞の修復に寄与することが知られている[81]。Guo L らの研究では、肝移植後の肝再生や虚血損傷における APE1 の役割の解明が試みられた。その結果、ラットの肝臓移植片への APE1 遺伝子の導入は、肝再生を加速させるとともに、移植後の損傷や炎症反応を抑制したことを証明した[82]。結論として、APE1 の高発現による肝細胞の再生の亢進は肝移植後に起こる肝障害などの回避を可能にすることを示唆した。本研究では、APE1 の発現が免疫寛容を誘導している患者において高発現していることを見出した。また、ヒト肝臓細胞株を使用して、APE1 遺伝子が炎症性因子の発現とアポトーシスの誘導に影響を及ぼすことを証明した。肝移植後の移植片において APE1 遺伝子の高発現が誘導されることは、肝移植後の肝再生が促進される

とともに、炎症因子の産生とアポトーシスの誘導が抑制されることにつながると考えられる。今後の研究において、肝移植患者の移植後の移植片において APE1 の発現を誘導する方法を確立することができれば、肝移植後の免疫寛容の誘導につながると期待される。一方、Zhang P らの研究では、肝移植モデルラットの移植片において術後早期から APE1 遺伝子の発現誘導がみとめられているが、同時にアポトーシスの誘導もみとめられるという結果を示した[83]。この結果は、移植後初期の移植片においては、APE1 の発現誘導と移植片に対する拒絶反応が同時に発生していることを示唆している。APE1 の発現による炎症性因子の産生やアポトーシスの誘導の抑制効果は、APE1 の発現の持続的誘導が必要であると考えられる。

本研究では、APE1 の生理学的機能を解明する目的で、STRING website (Version: 10.5)を用いたタンパク質間相互作用 (protein-protein interaction network) の予測解析を実施した。その結果、APE1 は ANP32A、FEN1、HMGB2、LIG1、MUTYH、NTHL1、OGG1、PCNA、POLB、SET と潜在的な相互作用をもつことを示した。さらに、APE1 と炎症性免疫応答関連タンパク質の関係は相関係数が平均 0.975 と非常に強いことを示唆した。今回の結果から、移植後に発現する APE1 が他のタンパク質と連動して、拒絶反応を抑制している可能性を示唆する。例えば、エンドヌクレアーゼ(FEN1)は、塩基除去修復 (BER 経路)で特異の DNA を切断する酵素。APE1 はエンドヌクレアーゼ(FEN1)の酵素活性化を増強する[84]。最近の研究では、FEN1 の変異は自己免疫、慢性炎症に関与することが示された [85]。また、DNA 修復酵素である OGG1 は、APE1 との相互作用をする[86]。OGG1 の阻害は、炎症を抑制する効果をもつことが報告されている[87]。本研究の結果から、APE1 と他のタンパク質との相互作用が肝移植後の移植片で発生し、最終的な免疫寛容の誘導につながる可能性が考えられる。

本研究では、APE1 が肝移植後に免疫寛容を誘導した患者の PBMC において高発現することを見出した。私は上述の通り APE1 は、ヒト肝臓細胞 (L-02) における炎症性サイトカインの産生やアポトーシスに誘導の抑制に関与することを示した。また、APE1 が 10 種類の免疫応答関連タンパク質との間に潜在的な相互作用の関係性を有することを示した。以上の本研究の成果は、APE1 が肝移植後の移植組織の生着に重要な役割を果たす現象に関与することを示唆し、免疫寛容の誘導に関するバイオマーカーの候補になりうることを期待させるものとなった。

本研究の成果のみでは、APE1 を免疫寛容の誘導と関連性を有するバイオマーカーとして採用するには課題を有する。一つは、本研究で採用した免疫寛容を誘導した症例の数はわずかであるため、免疫寛容を誘導した肝移植症例における APE1 の高発現と免疫寛容の誘導との相関性に関する信頼性が十分ではない。OT を達成し免疫寛容を誘導したとされる症例に関する遺伝子発現解析や関連するデータの蓄積を実施し、十分な症例数による再解析を実施することにより APE1 の発現性と OT との関連性に関する信頼性を向上させる必要がある。また、本研究では APE1 の発現変動が移植後の拒絶反応に関連する肝細胞の

アポトーシスの誘導や炎症性因子の産生に及ぼす効果を示したが、APE1 が免疫寛容に及ぼす分子レベルでの効果やそのメカニズムに関する詳細は明らかにできていない。免疫寛容の誘導における APE1 の直接的な効果を分子レベルで解明するためには、これまでの研究で樹立された免疫寛容を誘導する臓器移植動物モデルなどの活用が有効であると考えられる [20]。動物モデルにおける免疫寛容の誘導過程や誘導後における APE1 の発現変動の追跡は、免疫寛容の誘導と APE1 の発現性との関連性をより直接的かつ詳細に解明できる。さらに、APE1 の遺伝子発現を制御した動物において免疫寛容誘導モデルを樹立することができれば、生体内での免疫寛容の誘導における APE1 の発現の生理学的効果に関する理解につながると考えられる。

第5章 総括と今後の展望

肝移植後 OT の末梢血のマイクロアレイデータから、APE1 遺伝子が免疫寛容の誘導をみとめた患者で高発現することを見出した。そして、APE1shRNA_1 サイレンシングベクターと APE1 過剰発現ベクターによる肝細胞での APE1 の発現変動の誘導は、炎症性因子の発現とアポトーシスの誘導に影響を及ぼすことを示した。さらに、APE1 と他のタンパク質との潜在的な相互作用が、肝移植後の免疫寛容の誘導に対して重要な役割を果たすことを示唆した。今後の研究においては、APE1 が本研究で示唆された潜在的相互作用因子と関連して、肝移植後の長期的な免疫寛容の誘導を達成する機構を明らかにする必要がある。

引用文献

- 1 Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Nakayama N, Oketani M, Umeshita K, Uemoto S, Mochida S, Tsubouchi H, Kokudo N. Outcomes after living donor liver transplantation for acute liver failure in Japan: Results of a nationwide survey. *Liver Transpl.* 18:1069-1077,2012.
- 2 Matsui Y, Sugawara Y, Yamashiki N, Kaneko J, Tamura S, Togashi J, Makuuchi M, Kokudo N. Living donor liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Hepatol Res.* 38:987-996, 2008.
- 3 Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Takazawa Y, Aoki T, Hasegawa K, Sakamoto Y, Koike K, Kokudo N. Living-donor liver transplantation for autoimmune hepatitis and autoimmune hepatitis-primary biliary cirrhosis overlap syndrome. *Hepatol Res.* 42:1016- 1023, 2012.
- 4 Gonzalez SA, Perrillo RP. Hepatitis B Virus Reactivation in the Setting of Cancer Chemotherapy and Other Immunosuppressive Drug Therapy. *Clin Infect Dis.* 62 Suppl 4(Suppl 4):S306-13, 2016.
- 5 Jadlowiec CC, Taner T. Liver transplantation: Current status and challenges. *World J Gastroenterol.*;22(18):4438-45 2016.
- 6 Feng S, Bucuvalas J. Tolerance after liver transplantation: Where are we? *Liver Transpl.* 23(12):1601-1614, 2017.
- 7 Dhanasekaran R. Management of Immunosuppression in Liver Transplantation. *Clin Liver Dis.* 21(2):337-353, 2017.
- 8 Cai J, Terasaki PI. Induction immunosuppression improves long-term graft and patient outcome in organ transplantation: an analysis of United Network for Organ Sharing registry data. *Transplantation.* 90(12):1511-5, 2010.
- 9 Castroagudín JF, Molina E, Varo E. Calcineurin inhibitors in liver transplantation: to be or not to be. *Transplant Proc.* 43(6):2220-3 2011.
- 10 Stucker F, Ackermann D. Immunsuppressiva - Wirkungen, Nebenwirkungen und Interaktionen [Immunosuppressive drugs - how they work, their side effects and interactions]. *Ther Umsch.* 68(12):679-86 2011.
- 11 Strassburg CP, Bahr MJ, Becker T, Klempnauer J, Manns MP. Fortschritte in der Immunsuppression [Progress in immunosuppression]. *Chirurg.* 79(2):149-56, 2008.

- 12 Lucey MR, Terrault N, Ojo L, et al. Long-term management of the successful adult liver transplant: 2012 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the American Society of Transplantation. *Liver Transpl.* 19(01): 3–26, 2013.
- 13 Liu XQ, Hu ZQ, Pei YF, Tao R. Clinical operational tolerance in liver transplantation: state-of-the-art perspective and future prospects. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 12(1):12-33, 2013.
- 14 Orlando G, Soker S, Wood K. Operational tolerance after liver transplantation. *J Hepatol.* 50(6):1247-57, 2009.
- 15 Alex Bishop G, Bertolino PD, Bowen DG, McCaughan GW. Tolerance in liver transplantation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 26(1):73-84, 2012.
- 16 Levitsky J. Operational tolerance: past lessons and future prospects. *Liver Transpl.* 17(3):222-32, 2011.
- 17 Du X, Chang S, Guo W, Zhang S, Chen ZK. Progress in Liver Transplant Tolerance and Tolerance-Inducing Cellular Therapies. *Front Immunol.* 24;11:1326, 2020.
- 18 Liu XQ, Hu ZQ, Pei YF, Tao R. Clinical operational tolerance in liver transplantation: state-of-the-art perspective and future prospects. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 12(1):12-33, 2013.
- 19 Bontha SV, Fernandez-Piñeros A, Maluf DG, Mas VR. Messengers of tolerance. *Hum Immunol.* 79(5):362-372, 2018.
- 20 Vionnet J, Sánchez-Fueyo A. Biomarkers of immune tolerance in liver transplantation. *Hum Immunol.* 79(5):388-394, 2018.
- 21 Mastoridis S, Martínez-Llordella M, Sanchez-Fueyo A. Biomarkers and immunopathology of tolerance. *Curr Opin Organ Transplant.* 21(1):81-7, 2016.
- 22 Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI. A 'biomarker signature' for tolerance in transplantation. *Nat Rev Nephrol.* 6(10):606-13, 2010.
- 23 Wieland E, Olbricht CJ, Süsal C, Gurrachaa P, Böhler T, Israeli M, Sommerer C, Budde K, Hartmann B, Shipkova M, Oellerich M. Biomarkers as a tool for management of immunosuppression in transplant patients. *Ther Drug Monit.* 32(5):560-72, 2010.
- 24 Kurian SM, Whisenant TC, Mathew JM, Miller J, Leventhal JR. Transcriptomic studies in tolerance: Lessons learned and the path forward. *Hum Immunol.* 79(5):395-401, 2018.

- 25 Martínez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M et al. A. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant.* 7(2):309-19, 2007.
- 26 Kawasaki MIM, Koshihara T, Fujino M, et al. Gene expression profile analysis of the peripheral blood mononuclear cells from tolerant living-donor liver transplant recipients. *Int Surg* 92: 276–286, 2007.
- 27 Pons JA, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A, et al. FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation.* 86: 1370–1378, 2008.
- 28 Tell G, Quadrifoglio F, Tiribelli C, Kelley MR. The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme. *Antioxid Redox Signal.* 11(3):601-20, 2009.
- 29 Li M, Wilson DM 3rd. Human apurinic/aprimidinic endonuclease 1. *Antioxid Redox Signal.* 20(4):678-707, 2014.
- 30 Zhang Y, Wang J. Anticancer clinical utility of the apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1 (APE/Ref-1). *Chin J Cancer.* 29(3):333-9, 2010.
- 31 Kelley MR, Georgiadis MM, Fishel ML. APE1/Ref-1 role in redox signaling: translational applications of targeting the redox function of the DNA repair/redox protein APE1/Ref-1. *Curr Mol Pharmacol.* 5(1):36-53, 2012.
- 32 McIlwain DW, Fishel ML, Boos A, Kelley MR, Jerde TJ. APE1/Ref-1 redox-specific inhibition decreases survivin protein levels and induces cell cycle arrest in prostate cancer cells. *Oncotarget.* 9(13):10962-10977, 2017.
- 33 Luo M, Delaplane S, Jiang A, Reed A, He Y, Fishel M, Nyland RL 2nd, Borch RF, Qiao X, Georgiadis MM, Kelley MR. Role of the multifunctional DNA repair and redox signaling protein Ape1/Ref-1 in cancer and endothelial cells: small-molecule inhibition of the redox function of Ape1. *Antioxid Redox Signal.* 10(11):1853-67, 2008.
- 34 Choi S, Joo HK, Jeon BH. Dynamic Regulation of APE1/Ref-1 as a Therapeutic Target Protein. *Chonnam Med J.* 52(2):75-80, 2016.
- 35 Fishel ML, Wu X, Devlin CM, Logsdon DP, Jiang Y, Luo M, He Y, Yu Z, Tong Y, Lipking KP, Maitra A, Rajeshkumar NV, Scandura G, Kelley MR, Ivan M. Apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1 (APE1/Ref-1) redox function negatively regulates NRF2. *J Biol Chem.* 290(5):3057-68, 2015.

- 36 Zhang Y, Wang J, Xiang D, Wang D, Xin X. Alterations in the expression of the apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE1/Ref-1) in human ovarian cancer and identification of the therapeutic potential of APE1/Ref-1 inhibitor. *Int J Oncol.* 2009.
- 37 Nyland RL, Luo M, Kelley MR, Borch RF. Design and synthesis of novel quinone inhibitors targeted to the redox function of apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox enhancing factor-1 (Ape1/ref-1). *J Med Chem.* 53(3):1200-10, 2010.
- 38 Georgiadis MM, Luo M, Gaur RK, Delaplane S, Li X, Kelley MR. Evolution of the redox function in mammalian apurinic/aprimidinic endonuclease. *Mutat Res.* 643(1-2):54-63, 2008.
- 39 Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, Semenza GL, Evans DB, Watowich SS, Gallick GE. HIF-1alpha, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene.* 24(19):3110-20, 2005.
- 40 Thakur S, Sarkar B, Cholia RP, Gautam N, Dhiman M, Mantha AK. APE1/Ref-1 as an emerging therapeutic target for various human diseases: phytochemical modulation of its functions. *Exp Mol Med.* 46(7):e106, 2014.
- 41 Bapat A, Fishel ML, Kelley MR. Going ape as an approach to cancer therapeutics. *Antioxid Redox Signal.* 11(3):651-68, 2009.
- 42 Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* 18(7):1905-14, 1999.
- 43 Gaiddon C, Moorthy NC, Prives C. Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 in vivo. *EMBO J.* 18(20):5609-21, 1999.
- 44 Tell G, Pellizzari L, Cimarosti D, Pucillo C, Damante G. Ref-1 controls pax-8 DNA-binding activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 252(1):178-83, 1998.
- 45 Sardar Pasha SPB, Sishtla K, Sulaiman RS, Park B, Shetty T, Shah F, Fishel ML, Wikel JH, Kelley MR, Corson TW. Ref-1/APE1 Inhibition with Novel Small Molecules Blocks Ocular Neovascularization. *J Pharmacol Exp Ther.* 367(1):108-118, 2018.

- 46 Fishel ML, Xia H, McGeown J, McIlwain DW, Elbanna M, Craft AA, Kaimakliotis HZ, Sandusky GE, Zhang C, Pili R, Kelley MR, Jerde TJ. Antitumor Activity and Mechanistic Characterization of APE1/Ref-1 Inhibitors in Bladder Cancer. *Mol Cancer Ther.* 1947-1960, 2019.
- 47 Fishel ML, Wu X, Devlin CM, Logsdon DP, Jiang Y, Luo M, He Y, Yu Z, Tong Y, Lipking KP, Maitra A, Rajeshkumar NV, Scandura G, Kelley MR, Ivan M. Apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1 (APE1/Ref-1) redox function negatively regulates NRF2. *J Biol Chem.* 290(5):3057-68, 2015.
- 48 Cardoso AA, Jiang Y, Luo M, Reed AM, Shahda S, He Y, Maitra A, Kelley MR, Fishel ML. APE1/Ref-1 regulates STAT3 transcriptional activity and APE1/Ref-1-STAT3 dual-targeting effectively inhibits pancreatic cancer cell survival. *PLoS One.* 7(10):e47462, 2012.
- 49 Xie J, Li Y, Kong J, Li C. Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1/Redox Factor-1 Could Serve as a Potential Serological Biomarker for the Diagnosis and Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2019 Apr;77(4):859-866.
- 50 Puglisi F, Barbone F, Tell G, Aprile G, Pertoldi B, Raiti C, Kelley MR, Damante G, Sobrero A, Beltrami CA, Di Loreto C. Prognostic role of Ape/Ref-1 subcellular expression in stage I-III breast carcinomas. *Oncol Rep.* 9(1):11-7, 2002.
- 51 Di Maso V, Avellini C, Crocè LS, Rosso N, Quadrifoglio F, Cesaratto L, Codarin E, Bedogni G, Beltrami CA, Tell G, Tiribelli C. Subcellular localization of APE1/Ref-1 in human hepatocellular carcinoma: possible prognostic significance. *Mol Med.* 13(1-2):89-96, 2007.
- 52 Noike T, Miwa S, Soeda J, Kobayashi A, Miyagawa S. Increased expression of thioredoxin-1, vascular endothelial growth factor, and redox factor-1 is associated with poor prognosis in patients with liver metastasis from colorectal cancer. *Hum Pathol.* 39(2):201-8, 2008.
- 53 Kim JS, Kim JM, Liang ZL, Jang JY, Kim S, Huh GJ, Kim KH, Cho MJ. Prognostic significance of human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE/Ref-1) expression in rectal cancer treated with preoperative radiochemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 82(1):130-7, 2012.

- 54 Puglisi F, Aprile G, Minisini AM, Barbone F, Cataldi P, Tell G, Kelley MR, Damante G, Beltrami CA, Di Loreto C. Prognostic significance of Ape1/ref-1 subcellular localization in non-small cell lung carcinomas. *Anticancer Res.* 21(6A):4041-9, 2001.
- 55 Sun Z, Zhu Y, Aminbuhe, Fan Q, Peng J, Zhang N. Differential expression of APE1 in hepatocellular carcinoma and the effects on proliferation and apoptosis of cancer cells. *Biosci Trends.* 12(5):456-462, 2018.
- 56 Unnikrishnan A, Raffoul JJ, Patel HV, Prychitko TM, Anyangwe N, Meira LB, Friedberg EC, Cabelof DC, Heydari AR. Oxidative stress alters base excision repair pathway and increases apoptotic response in apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox factor-1 haploinsufficient mice. *Free Radic Biol Med.* 46(11):1488-99, 2009.
- 57 Choi S, Joo HK, Jeon BH. Dynamic Regulation of APE1/Ref-1 as a Therapeutic Target Protein. *Chonnam Med J.* 52(2):75-80, 2016.
- 58 Augusto VS, Rodrigues AJ, Reis GS, Silveira AP, de Castro e Silva O Jr, Mente ED, Jordão AA Jr, Evora PR. Evaluation of oxidative stress in the late postoperative stage of liver transplantation. *Transplant Proc.* 46(5):1453-7, 2014.
- 59 Liu D, Luo G, Luo C, Wang T, Sun G, Hei Z. Changes in the Concentrations of Mediators of Inflammation and Oxidative Stress in Exhaled Breath Condensate During Liver Transplantation and Their Relations With Postoperative ARDS. *Respir Care.* 60(5):679-88, 2015.
- 60 Kamada N. Transplantation tolerance and immunosuppression following liver grafting in rats. *Immunol Today.* 6(11):336-42, 1985.
- 61 Tanaka T, Sugawara Y, Kokudo N. Liver transplantation and autoimmune hepatitis. *Intractable Rare Dis Res.* 4(1):33-8, 2015.
- 62 Akamatsu N, Sugawara Y, Kokudo N. Living donor liver transplantation for patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer.* 3(2):108-18, 2014.
- 63 Bodzin AS, Baker TB. Liver Transplantation Today: Where We Are Now and Where We Are Going. *Liver Transpl.* 24(10):1470-1475, 2018.
- 64 N, Sugawara Y, Kokudo N. Living donor liver transplantation for patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer.* 3(2):108-18, 2014.

- 65 Hibi T, Eguchi S, Egawa H. Evolution of living donor liver transplantation: a global perspective. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 25(8):388-389, 2018.
- 66 Meirelles Júnior RF, Salvalaggio P, Rezende MB, Evangelista AS, Guardia BD, Matielo CE, Neves DB, Pandullo FL, Felga GE, Alves JA, Curvelo LA, Diaz LG, Rusi MB, Viveiros Mde M, Almeida MD, Pedroso PT, Rocco RA, Meira Filho SP. Liver transplantation: history, outcomes and perspectives. *Einstein (Sao Paulo).* 13(1):149-52, 2015.
- 67 Levitsky J, Feng S. Tolerance in clinical liver transplantation. *Hum Immunol.* 79(5):283-287, 2018.
- 68 Al-Wedaie F, Farid E, Tabbara K, El-Agroudy AE, Al-Ghareeb SM. T-regulatory cells in chronic rejection versus stable grafts. *Exp Clin Transplant.* 13 Suppl 1:170-6, 2015.
- 69 Koo J, Wang HL. Acute, Chronic, and Humoral Rejection: Pathologic Features Under Current Immunosuppressive Regimes. *Surg Pathol Clin.* 11(2):431-452, 2018.
- 70 Feng S, Bucuvalas JC, Demetris AJ, Burrell BE, Spain KM, Kanaparthi S, Magee JC, Ikle D, Lesniak A, Lozano JJ, Alonso EM, Bray RA, Bridges NE, Doo E, Gebel HM, Gupta NA, Himes RW, Jackson AM, Lobritto SJ, Mazariegos GV, Ng VL, Rand EB, Sherker AH, Sundaram S, Turmelle YP, Sanchez-Fueyo A. Evidence of Chronic Allograft Injury in Liver Biopsies From Long-term Pediatric Recipients of Liver Transplants. *Gastroenterology.* 155(6):1838-1851.e7, 2018.
- 71 Demetris AJ, Bellamy CO, Gandhi CR, Prost S, Nakanuma Y, Stolz DB. Functional Immune Anatomy of the Liver-As an Allograft. *Am J Transplant.* 16(6):1653-80, 2016.
- 72 Knechtle SJ, Kwun J. Unique aspects of rejection and tolerance in liver transplantation. *Semin Liver Dis.* 29(1):91-101, 2009.
- 73 Simpson E. Medawar's legacy to cellular immunology and clinical transplantation: a commentary on Billingham, Brent and Medawar (1956) 'Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance'. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 370(1666):20140382, 2015.
- 74 Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature.* 172:603-606, 1953
- 75 Bontha SV, Fernandez-Piñeros A, Maluf DG, Mas VR. Messengers of tolerance. *Hum Immunol.* 79(5):362-372, 2018.

- 76 Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Orlando G, Tisone G, Lerut J, Benítez C, Pons JA, Parrilla P, Ramírez P, Bruguera M, Rimola A, Sánchez-Fueyo A. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest.* 118(8):2845-57, 2008.
- 77 Bohne F, Martínez-Llordella M, Lozano JJ, et al. Intra-graft expression of genes involved in iron homeostasis predicts the development of operational tolerance in human liver transplantation. *J Clin Invest.* 122:368-382, 2012.
- 78 Clough E, Barrett T. The Gene Expression Omnibus Database. *Methods Mol Biol.*1418:93-110, 2016.
- 79 Akhter N, Takeda Y, Nara H, Araki A, Ishii N, Asao N, Asao H. Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1/Redox Factor-1 (Ape1/Ref-1) Modulates Antigen Presenting Cell-mediated T Helper Cell Type 1 Responses. *J Biol Chem.* 4;291(45):23672-23680 2016.
- 80 Feng Z, Kochanek S, Close D, Wang L, Srinivasan A, Almhizia AA, Iyer P, Xie XQ, Johnston PA, Gold B. Design and activity of AP endonuclease-1 inhibitors. *J Chem Biol.* 19;8(3):79-93, 2015.
- 81 Di Maso V, Mediavilla MG, Vascotto C, Lupo F, Baccarani U, Avellini C, Tell G, Tiribelli C, Crocè LS. Transcriptional Up-Regulation of APE1/Ref-1 in Hepatic Tumor: Role in Hepatocytes Resistance to Oxidative Stress and Apoptosis. *PLoS One.* 2015 Dec 1;10(12):e0143289, 2015.
- 82 Guo L, Haga S, Enosawa S, Naruse K, Harihara Y, Sugawara Y, Irani K, Makuuchi M, Ozaki M. Improved hepatic regeneration with reduced injury by redox factor-1 in a rat small-sized liver transplant model. *Am J Transplant.* 4(6):879-87, 2004.
- 83 Zhang P, Du X, Sun Z, Xu L. Expression of redox factor-1 in early injury period after liver transplantation in rat model. *Cell Mol Immunol.* 6(4):309-13, 2009.
- 84 Ranalli TA, Tom S, Bambara RA. AP endonuclease 1 coordinates flap endonuclease 1 and DNA ligase I activity in long patch base excision repair. *J Biol Chem.*277(44):41715-24, 2002.
- 85 Zheng L, Dai H, Zhou M, Li M, Singh P, Qiu J, Tsark W, Huang Q, Kernstine K, Zhang X, Lin D, Shen B. Fen1 mutations result in autoimmunity, chronic inflammation and cancers. *Nat Med.* 13(7):812-9, 2007.

- 86 Vodicka P, Stetina R, Polakova V, Tulupova E, Naccarati A, Vodickova L, Kumar R, Hanova M, Pardini B, Slyskova J, Musak L, De Palma G, Soucek P, Hemminki K. Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects. *Carcinogenesis*. 8(3):657-64, 2007.
- 87 Sampath H, Lloyd RS. Roles of OGG1 in transcriptional regulation and maintenance of metabolic homeostasis. *DNA Repair (Amst)*. 81:102667, 2019.
- 88 Xie L, Guo K, Lu S, Wang N, Wang Y, Chen H, Liu J, Jia W. Diabetic nephropathy in mice is aggravated by the absence of podocyte IRE1 and is correlated with reduced kidney ADH1 expression. *Ann Transl Med*. 9(8):636, 2021.
- 89 Saxton RA, Tsutsumi N, Su LL, Abhiraman GC, Mohan K, Henneberg LT, Aduri NG, Gati C, Garcia KC. Structure-based decoupling of the pro- and anti-inflammatory functions of interleukin-10. *Science*. 2021 Mar 19;371(6535):eabc8433.

謝辞

本論文は筆者が東京大学医学研究科外科専攻博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。

本研究を遂行するにあたり、多大なる御指導、御支援、御協力をいただいた指導教官である東京大学大学院医学系研究科外科学専攻 臓器病態外科学講座 肝胆膵外科学/人工臓器・移植外科学 教授長谷川潔先生に深謝の意を表します。

並びに、当助教 唐子堯先生には本論文のデザイン設計、論文執筆に関して、細部にわたりご指導いただきました。

当助教 稲垣善則先生には、基本的な実験の使い方に始まり、実験の進め方を御指導いただきました。ここに深謝の意を表します。そして、共同研究である本研究の遂行にあたり、多大なるご協力を頂いた Beijing Shijitan Hospital 肝胆膵外科 孫志鵬先生、張平先生ならびに当教室の皆様に深謝致します。

これまで私を温かく見守り、そして辛抱強く支援して下さった両親に対しては深い感謝の意を表します。

そのほか多くの人に支えられて論文を完成させることができました。この場を借りて御礼申し上げます。

本研究は以下の支援により実施された。

The Beijing Municipal Education Commission general scientific research project (no. KM202010025008), Opening Foundation of Beijing Key Lab of Therapeutic Cancer Vaccines (no. 2019-JS04), the Foundation of Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University (no. 2019-C10), and grants- in-aid from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan.