

学位論文題名

アデノウイルスベクターを利用したCTLA4Ig 遺伝子
導入によるラット同種腎移植片生着延長効果

学位論文内容の要旨

同種臓器移植では、ドナーのpassenger leukocyteが宿主リンパ系組織へ遊走し、direct pathwayを介してアロ特異的T細胞応答が惹起されるため、拒絶反応初期にはdirect pathwayによる免疫反応が重要視されている。professional APCである樹状細胞(dendritic cell: DC)は、MHC class I/IIのほか、ICAM-1, CD40, CD80, CD86などの副刺激を伝達する表面抗原を多量に発現し、passenger leukocyteの本体であるとされている。一方、T細胞が抗原を認識し活性化するにはAPC上のMHCからの主刺激に加えてCD28/CD80,86を代表とする副刺激が必須であるが、この副刺激をブロックすることにより抗原特異的な免疫学的寛容性が誘導されることが知られている。CTLA4Igは、CD80,86への強力な親和性による副刺激ブロックから臓器移植片の生着延長効果が諸家より報告されており、近年CTLA4Ig遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター(AdexCTLA4Ig)を用いてのCTLA4Ig遺伝子導入による安定した生着延長効果も各移植モデルにて報告されている。本研究では、MHC完全不一致のラット同種腎移植モデルにおいて、AdexCTLA4Ig全身投与により移植片生着延長効果が得られるか(実験1)、さらにCTLA4Ig遺伝子を導入したドナー由来のDCを移植前投与することにより移植片生着延長効果が得られるか(実験2)、について検討した。

(実験1)以下の3群を設定し、LEWをドナー、WKAHをレシピエントとし、腎移植を施行した。Group I (n=5): 無処置コントロール腎移植群、Group II (n=14): 腎移植直後にAdexCTLA4Ig 1×10^9 PFU全身投与(i.v.)群、Group III (n=4): 腎移植直後にコントロールウイルスのAdexHUM 1×10^9 PFU全身投与(i.v.)群。各群の移植腎平均生着日数は、Group I 7.8 ± 1.5 日、Group II $> 74.9 \pm 38.3$ 日(14例中9例が100日以上)の長期生着)、Group III 10.0 ± 1.4 日で、AdexCTLA4Ig投与群で特異的腎移植片生着延長効果が認められた。

次にGroup IIの100日以内拒絶例の原因検索のため、移植4日目の血液サンプルで抗アデノウイルス中和抗体(IgG, IgM)、及び血清CTLA4Ig濃度をELISA法にて測定した。血中CTLA4Ig濃度は、長期生着例は $195.721 \pm 148.498 \mu\text{g/ml}$ に対し、拒絶例は $23.041 \pm 16.103 \mu\text{g/ml}$ と有意に低い値を示した($P=0.0063$)。一方、ラット血清中の抗アデノウイルスIgG量と血中CTLA4Ig濃度を比較すると、CTLA4Ig濃度の低い拒絶群のラットはすべて長期生着群より抗アデノウイルスIgGが高い値を示した($P=0.0095$)。このことから、100日以内拒絶例ではアデノウイルスの既往感染があり、既存の中和抗体により

CTLA4Ig遺伝子の導入が妨げられ、十分なCTLA4Igの産生がなされなかった可能性が示唆された。Group IIの100日以上腎移植片生着モデルにおける免疫学的不応答性のドナー特異性を確認するために、皮膚移植を行った。長期生着ラットでは腎移植ドナーではないthird partyのACIラットの皮膚は約2週間で拒絶されたが、腎移植ドナーと同系のLEWラットの皮膚は拒絶されず、ドナー特異的免疫学的寛容性が誘導されていると考えられた。Group IIの100日以上生着例の移植腎の病理組織には、リンパ球を主体とする炎症細胞の軽微な浸潤を認めるのみだった。

(実験2) ラット脾から調整したDCへのアデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率を評価するために、Adex lacZ感染後のDCをX-gal染色にて観察した。単離したばかりのDCではlacZの発現を認めなかったが、GM-CSF 1000U/ml添加mediumでの3日間培養DCでは、1000MOIではほぼ100%のlacZ発現を認めた。次に、単離したDCとAdexCTLA4Ig1000MOIを遺伝子導入したDCの細胞表面抗原をFlow cytometryにて検討した。遺伝子導入後もMHC Class II, OX-62抗原の発現に変化はなかった。導入CTLA4Ig遺伝子産物の発現については1次抗体は用いず抗ヒトIgG抗体のみで検討した。その結果、感染前のDCに対して1次抗体としてCTLA4Igを用いた場合と同レベルの発色がほとんどの細胞に得られており、DC上のCD80, CD86が自ら産生したCTLA4Igと結合している事が確認された。Adex CTLA4Ig感染後DCのアロ刺激能をMLRにて検討したところ、1000MOIの感染で約70%の抑制を示した。実験1と同じ組み合わせのラットアロ腎移植を用いてCTLA4Ig遺伝子を導入したドナーDCの前投与を行った。Group IV(n=5): 移植7日前にドナーDC 2×10^6 をラットへ全身投与(i.v.)した群, Group V(n=12): AdexCTLA4遺伝子導入48時間後のドナーDC 2×10^6 をラットへ移植7日前に全身投与(i.v.)した群, Group VI(n=4): コントロールAdexHUM遺伝子導入48時間後のドナーDC 2×10^6 をラットへ移植7日前に全身投与(i.v.)した群, 平均生着期間は, Group IVでは 5.0 ± 0.7 日, Group Vでは 7.1 ± 1.2 日, Group VIでは 4.8 ± 0.9 日だった。Group IVのDCのみの術前投与では、促進型急性拒絶反応が誘導されていることが推察された。一方、CTLA4Igを導入したDCを術前投与したGroup Vでは、促進型急性拒絶反応は誘導されないものの急性拒絶反応にてGraft lossに至った可能性が考えられた。したがって、CTLA4Igを導入したDCの術前投与は十分な免疫学的寛容を誘導できていない可能性が考えられた。これを確認するため、Group Vの腎移植4日目のラットのリンパ節T細胞のドナーAPCに対するMLR反応を行った。その結果、未感作T細胞と比較してGroup VのT細胞の反応性は低い傾向にあったものの、有意の反応性は維持されていた。

本研究において、CTLA4Ig遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを全身投与することにより、多くは安定した腎移植片生着延長効果を認めた。しかし一部ではアデノウイルスの既往感染によると考えられるAdexCTLA4Igの感染効率の低いラットでは、十分な生着延長効果を得られない例もあった。現在、アデノウイルスベクターは免疫反応と細胞毒性を抑えたタイプの作製が試みられているが、AdexCTLA4Igの全身投与の問題点は、上記の既往感染以外にも強力な非特異的免疫抑制が一定期間かかってしまうことにもある。その点、DCにCTLA4Ig遺伝子を導入する方法では、中和抗体の影響からの回避が可能で、より安全にドナー特異的免疫学的寛容性を誘導するには有効な手段であると思われる。今後は、投与細胞数、投与経路、他の免疫抑制法との併用など検討し、臨床応用出来るよう検討していきたいと考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

アデノウイルスベクターを利用した CTLA4Ig 遺伝子 導入によるラット同種腎移植片生着延長効果

申請者は、T細胞抗原応答の際の副刺激ブロックにより抗原特異的免疫学的寛容性が誘導されることに注目し、ラット同種腎移植モデルにおいて、AdexCTLA4Ig全身投与(実験1)、ドナー由来のCTLA4Ig遺伝子導入樹状細胞(DC)の移植前投与(実験2)、による移植片生着延長効果について検討した。(実験1)の結果、AdexCTLA4Ig全身投与は移植片生着延長効果を示したが、その成績はCTLA4Igの血中濃度に左右され、血中濃度が低い症例ではアデノウイルス既往感染による中和抗体によりCTLA4Ig遺伝子導入が阻害された可能性が示唆された。(実験2)の結果、DCへのAdexCTLA4Igによる遺伝子導入はin vitro解析では、有効に副刺激をブロックしていると思われた。しかしその移植前投与では移植片生着延長効果は得られなかった。副刺激ブロックが不完全だった、indirect pathwayの関与が大きかったなどの原因が推定された。

発表の後、吉木敬教授と以下のような質疑応答があった。問：AdexCTLA4Ig感染DCの投与細胞数及び刺激回数は適切だったか。答：ラット1頭当たり 2×10^6 の細胞を1回だけ投与した。脾臓からの調整効率からそれが限界だった。改良するためには、DCをline化する必要が有る。問：抗アデノウイルス抗体による遺伝子導入阻害は、ヒトでも起こり得るのか。答：今回使用したアデノウイルスベクターは一部の膜蛋白を合成してしまうタイプであり、中和抗体を産生させてしまう可能性が充分あるので基本的には反復投与は不可。当然ヒトでも同じことである。問：CD80,86以外のブロックによる移植成績向上の可能性はあるか。答：文献的には、CD40/CD40Lのブロックが有効であるとの報告もある。また上出利光教授と以下のような質疑応答があった。問：可溶性CTLA4Ig数回投与の有効性が報告されているにも関わらず、術前にAdexCTLA4Ig感染DCを投与する意義、また毒性が有るにも関わらずAdexCTLA4Ig全身投与を選択したのはどうしてか。答：術前の免疫学的寛容性の誘

導にこだわったのは、感染、出血など合併症発生の確立が高い周術期の免疫抑制剤投与量を減量する免疫抑制法を確立しなかったから。また可溶性CTLA4Ig数回投与の有効性は諸家より報告されているが、100%の移植片生着延長効果は得られておらず、長期生着例もそのほとんどが慢性拒絶反応の病理像を呈している。AdexCTLA4Igの全身投与で約3週間ほど安定したCTLA4Ig血中濃度を保つことにより、その問題は解決できると予想した。問：DC投与後にmigrationすることが予想される部位を検証したか。答：共同研究者の実験だが、Adex lacZ感染DC投与後に全臓器をX-gal染色で検証した結果、脾臓に散見されたというdataはある。問：AdexCTLA4Ig感染DC投与がhostに与える影響に関する解釈は如何に。答：強い主刺激を保ちながら副刺激を完全にブロックすることによるdirect pathwayのmodulationをもくろんだが、不十分であった。脾以外のDCのphenotypeによる差異に関して検討が必要だったかもしれない。またDCが早期にプロセスされてclass IIペプチドを供給することとなり、むしろindirect pathwayを活性化させてしまった可能性もあり、投与経路の検討も必要なのかもしれない。最後に小柳知彦教授と以下のような質疑応答があった。問：臨床応用の可能性はあるのか。答：CTLA4Ig遺伝子導入の効率化、投与経路の検討、大動物を用いての実験など問題は山積しているが、DCはdonorの末梢血から調整することによりヒトにも応用できるよう今後も検討していきたいと考えている。以上質疑に対する応答は概ね妥当であった。

この論文は、AdexCTLA4IgとDCを用いての免疫学的寛容性誘導に関する解析により考察した点が高く評価され、今後の同種腎移植における急性及び慢性拒絶反応の病因解明の一翼を担うものとして期待される。審査員一同は、これらの成績を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有する者と判定した。