

学位論文題名

Blockade of T cell costimulatory signals using adenovirus vectors prevents both the induction and the progression of experimental autoimmune myocarditis

(T細胞活性化補助シグナルの遮断による
実験的自己免疫性心筋炎の治療効果の検討)

学位論文内容の要旨

I. 背景

ヒト心筋炎は若年者の突然死の主要死因の一つであり、しばしばコクサッキーウイルスによる感染がその原因と考えられる。ウイルス性心筋炎の病態は完全にはわかっていないが、心臓の抗原特に心筋ミオシンに対する自己免疫機序がその進展に関与していると考えられている。ルイスラットを心筋ミオシンで感作すると多核巨細胞の出現と極めて重症な心病変を特徴とする実験的自己免疫性心筋炎(EAM)を発症することが報告されている。EAMの急性期の心病変はヒト巨細胞性心筋炎及びヒトウイルス性心筋炎に類似し、又、その慢性期には拡張型心筋症に類似した心病変をきたすことから、ヒト巨細胞性心筋炎、ヒトウイルス性心筋炎、拡張型心筋症の疾患モデルと考えられる。EAMは抗原感作ラットのT細胞を正常同系ラットに移入することにより疾患転嫁が可能であることよりT細胞依存性の自己免疫性疾患であることが報告されている。

一方、T細胞活性化にはT細胞レセプターを介した主要シグナルと補助シグナルが必要であり、主要シグナル単独ではT細胞は活性化せずアナジーに陥ることが知られている。複数の補助シグナルが存在する中で、T細胞上のCD28、CD40Lと抗原提示細胞上のB7、CD40を介したシグナルが重要とされている。キメラ蛋白であるCTLA4IgはCD28とB7による補助シグナルを阻害することが報告されており、同様にCD40IgはCD40LとCD40による補助シグナルを阻害すると考えられるが、EAMにおけるこれら経路の遮断による治療効果の報告はない。効果的にこの経路を遮断する目的で我々はCTLA4Ig、CD40Igを組み込んだアデノウイルスベクターAdexCTLA4Ig、AdexCD40Igを作成した。以前我々はAdexCTLA4Igのマウス静脈内投与により高濃度のCTLA4Igが長期間産生されることを報告している。

II. 目的

AdexCTLA4Ig、AdexCD40Igを用いて、免疫時同時投与あるいは発症後投与におけるEAMの治療効果とその有効性の機序を検討すること。

III. 方法

1) AdexCTLA4Ig及びAdexCD40Igをルイスラットに静脈内投与した際のCTLA4Ig及びCD40Igの血中濃度をELISA法で測定した。2) 心筋ミオシンとCFAを混和したものをル

イスラットに皮下注して EAM を作成した。3) EAM の心臓における各共刺激分子の発現を RT-PCR 法、免疫染色法により確認した。4) 治療実験では、免疫と同時に AdexCTLA4Ig(CT0 群)、AdexCD40Ig(CD0 群)、または対照として AdexLacZ(EAM 群)を静脈内投与した。免疫 21 日後(炎症極期)に犠牲死させ肉眼的検討、心体重比測定、組織学的検討を行い重症度の評価を行った。又、有効性の機序を調べる目的で、各群における 5) RPA 法及び ELISA 法による心組織中サイトカイン測定、6) ELISA 法による血中抗ミオシン IgG1、IgG2a 抗体価測定、7) サイミジン取り込みによる抗原特異的リンパ球増殖能測定、8) ELISA 法による抗原特異的リンパ球サイトカイン産生能測定を行った。9) 更に、発症後の治療効果の検討として、AdexCTLA4Ig(CT14 群)、AdexCD40Ig(CD14 群)、または AdexCTLA4Ig と AdexCD40Ig の併用(CT14+CD14 群)の免疫 14 日後投与による治療効果の検討も行った。

IV. 結 果

1) AdexCTLA4Ig 及び AdexCD40Ig をラットに静脈内投与した際の CTLA4Ig 及び CD40Ig の血中濃度はいずれも 100 μ g/ml 以上の高濃度を示し投与後 21 日後においても維持されていた。2) EAM 群の心臓では肉眼的には心臓の腫大と心臓表面の変色、組織学的には多数の炎症性細胞浸潤を伴う広範な心筋壊死像が観察された。3) RT-PCR 法により心臓における B7-1、B7-2、CD28、CD40、CD40L の mRNA レベルでの発現は、正常対照群と比較すると EAM 群において有意に亢進していた。また免疫染色法による B7-1、B7-2、CD40 の EAM 群の心臓における発現は、多数の浸潤した炎症細胞とその周囲の少数の心筋細胞にも認められた。4) AdexCTLA4Ig、AdexCD40Ig 治療群では、免疫と同時に投与すると、肉眼的検討、心体重比測定、組織学的検討いずれにおいてもほぼ完全に心筋炎の発症を抑制した。5) 心組織中サイトカイン産生の検討では、正常対照群と比較して EAM 群では IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10 などの各種サイトカインの増加が認められ、CT0、CD0 群ではその増加が抑制されていた。6) 血中抗ミオシン IgG1、IgG2a 抗体価測定では正常対照群と比較して EAM 群では IgG2a/IgG1 比の増加が認められ、CT0、CD0 群ではその増加が抑制されていた。7) 抗原特異的リンパ球増殖能測定では、正常対照群と比較して EAM 群で抗原量依存的に増殖能の増加が認められ、CT0、CD0 群ではその増加が抑制されていた。またその際の ConA に対する反応性は各群で同程度に保持されていた。8) 抗原特異的リンパ球サイトカイン産生能測定では IFN- γ 、TNF- α の産生は正常対照群と比較して EAM 群で抗原量依存的に産生の増加が認められ、CT0、CD0 群ではその増加が抑制されておりこれらサイトカインの EAM の発症における重要性が示唆された。9) 又、免疫 14 日後投与(発症後)における治療効果の検討では、EAM 群と比較して各群とも完全ではないが有意に治療効果が認められ、特に CD14 群よりも CT14 群及び CT14+CD14 群において有効であったが、CT14 群と CT14+CD14 群間で差は認められなかった。

V. 考 察

本研究により、AdexCTLA4Ig、AdexCD40Ig による EAM の治療効果が示された。その治療効果は免疫と同時に投与するとほぼ完全に発症を抑制した。EAM 群と比較して CT0、CD0 群では心臓における炎症細胞浸潤とひき続く各種サイトカインの産生、血中抗ミオシン抗体産生がほぼ完全に抑制されおり、又、EAM 群と比較して CT0、CD0 群では抗原特異的リンパ球増殖能の増加が抑制されている一方で、ConA に対する反応性は各群で同程度に保持されていたことより、その有効性の機序は抗原特異的な T 細胞のアナジーであることが示唆された。更に EAM において炎症が始まるとされる 12 日目以降の投与でも、特に AdexCTLA4Ig 又は AdexCTLA4Ig と AdexCD40Ig 併用投与により有意な治療効果が認められ、心筋炎の治療に対する本法の臨床的有用性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 北 畠 顕

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

Blockade of T cell costimulatory signals using adenovirus vectors prevents both the induction and the progression of experimental autoimmune myocarditis

(T細胞活性化補助シグナルの遮断による
実験的自己免疫性心筋炎の治療効果の検討)

心筋炎は若年者の突然死の主要死因の一つであり、有効な治療法が確立されていない疾患である。ルイスラットを心筋ミオシンで感作すると、多核巨細胞の出現と極めて重症な心病変を特徴とする実験的自己免疫性心筋炎(EAM)を発症することが報告されている。EAMは巨細胞性心筋炎、ウイルス性心筋炎、拡張型心筋症の疾患モデルと考えられ、又、T細胞依存性の自己免疫疾患であることが報告されている。

一方、抗原特異的なT細胞活性化にはT細胞レセプターを介した主要シグナルと補助シグナルが必要であり、主要シグナル単独ではT細胞は活性化せずアナジーに陥ることが知られている。複数の補助シグナルが存在する中で、B7/CD28、CD40/CD40Lのシグナルが重要とされている。キメラ蛋白であるCTLA4IgはB7とCD28による補助シグナルを阻害することが報告されており、同様にCD40IgはCD40とCD40Lによる補助シグナルを阻害すると考えられるが、EAMにおけるこれら経路の遮断による治療効果の報告はない。アデノウイルスベクターAdexCTLA4Ig、AdexCD40Igは効果的にこれらの経路を遮断することが可能と考えられる。本研究は、EAMの発症機序の解明と、新たな治療法の開発を目的として、AdexCTLA4Ig、AdexCD40Igを用いたT細胞活性化補助シグナルの遮断によるEAMの治療効果とその有効性の機序の検討を行っている。

AdexCTLA4IgまたはAdexCD40Igをラットに静脈内投与した際のCTLA4Ig、CD40Igの血中濃度はいずれも100 μ g/ml以上の高濃度を示し、投与21日後においても維持されていた。EAM群では肉眼的には心臓の腫大と心臓表面の変色、組織学的には多数の炎症性細

胞浸潤を伴う広範な心筋壊死像が観察された。AdexCTLA4IgまたはAdexCD40Igを免疫と同時に投与する治療群(それぞれCT0群、CD0群)では、肉眼的検討、心体重比測定、組織学的検討いずれにおいてもほぼ完全に心筋炎の発症を抑制した。心組織中サイトカイン産生の検討では、正常対照群と比較してEAM群ではIL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10などの各種サイトカインの増加が認められ、CT0、CD0群ではその増加が抑制されていた。血中抗ミオシンIgG1、IgG2a抗体価測定では正常対照群と比較してEAM群ではIgG2a/IgG1比の増加が認められ、CT0、CD0群ではその増加が抑制されていた。抗原特異的リンパ球増殖能測定では、正常対照群と比較してEAM群で抗原量依存的に増殖能の増加が認められ、CT0、CD0群ではその増加が抑制されていた。またその際のConAに対する反応性は各群で同程度に保持されていた。免疫後14日目投与における治療効果の検討では(CT14群、CD14群)、EAM群と比較して各群とも完全ではないが有意に治療効果が認められた。特にCD14群よりもCT14群及びAdexCTLA4IgとAdexCD40Igの併用投与群(CT14+CD14群)において有効であった。CT14群とCT14+CD14群間で統計的有意差は認められなかった。

これらの実験結果から、AdexCTLA4IgまたはAdexCD40Igは免疫と同時に投与するとほぼ完全にEAMの発症を抑制し、又、その有効性の機序は抗原特異的なT細胞のアナジーであることが示唆されたこと、更に、発症後の投与でも、特にAdexCTLA4Ig又はAdexCTLA4IgとAdexCD40Igの併用投与により有意な治療効果が認められ、心筋炎の治療に対する本法の臨床的有用性が示唆されたことを考察している。

学位論文の公開発表に際して副査の上出教授からEAMの発症機序に関してと、他の薬剤による治療実験との比較について、副査の北畠教授からはAdexCTLA4IgとAdexCD40Igの治療効果の相違と、臨床応用する際の問題点について、主査の小野江教授からは発症後投与におけるAdexCTLA4IgとAdexCD40Igの治療効果の相違の機序と、マウスにおけるEAMモデルについての質問があったが、申請者は実験結果に基づいて、また文献的知識を駆使して誠実かつ、概ね適切に回答し得た。

本研究は、AdexCTLA4IgまたはAdexCD40Igが心筋炎の新たな治療法の一つと成りうる可能性を持つことを明らかとし、臨床応用へ向けての展開に重要な寄与をしようるものと評価される。

審査員一同は、申請者の豊富な学識に併せて、この研究が心筋炎治療の進展に与える成果を評価し、申請者が博士(医学)を受けるに十分な資格を有するものと判定した。