

学位論文題名

Induction of donor-specific tolerance by adenovirus mediated CD40Ig gene therapy in rat liver transplantation.

(ラット肝移植モデルにおいてアデノウイルスベクターによる CD40Ig 遺伝子導入により誘導されたドナー特異的免疫寛容)

学位論文内容の要旨

1. 研究の目的

臓器移植後の拒絶反応における抗原認識において CD28-CD80/86、CD40-CD40L (CD154) に代表される costimulatory pathway は免疫抑制及び免疫寛容の誘導に重要な役割を担っていると考えられている。これまでの動物実験においては CD40L に対するモノクローナル抗体を投与し、この経路からの信号を遮断することで移植臓器の生着が延長することが確かめられているが、十分な免疫抑制効果を得るためには長期にわたり頻回な投与を必要とした。

我々はアデノウイルスに CD40Ig 遺伝子を組み込んだ新規アデノウイルスベクター AdCD40Ig を作製、ラット肝アロ移植モデルに投与することで、簡便かつ効果的にこの CD40-CD40L の信号伝達を阻害、免疫抑制を得る方法を開発、検討した。

2. 方法

ACI ラット (RT1^{av1}) から LEW ラット (RT1^l) への同所性肝移植を行い、術直後に AdCD40Ig を陰茎静脈より静注投与した。AdCD40Ig はヒト IgG の Fc 領域とマウス CD40 の cDNA 断片を連結させたコスミドカセットを E1、E3 領域を欠損させ増殖能を欠落させた 5 型アデノウイルスとともに 293 細胞に共感染させ作製した。E-coli. β -galactosidase 遺伝子を発現させる AdLacZ をコントロールベクターとした。実験群は同系移植コントロール群 (G-I)、無治療群 (G-II)、AdLacZ 1×10^9 pfu 投与群 (G-III)、AdCD40Ig 1×10^8 pfu 投与群 (G-IV)、 5×10^8 pfu 投与群 (G-V)、 1×10^9 pfu 投与群 (G-VI) の 6 群、各 6 個体とした。動物が死亡した時点でグラフトが拒絶されたと定義し生着期間を比較した。グラフトならびにそれ以外の臓器を採取、病理学的に検討した。経時的に血液を採取、血中 CD40Ig 濃度を ELISA 法をもちいて測定した。また生化学検査も施行した。無処置のラットに AdLacZ を投与し計画的に犠牲死させ Xgal 染色キットを用いて肝における β -gal の発現及び肝機能に与える影響を検討した。G-I、II、III、IV、V と同様に処置されたラットを術後 4、7 日目で犠牲死させ肝及びそれ以外の臓器における CD40Ig の発現を抗ヒト IgG 抗体を用いた免疫組織学的手法により検討した。術後 108、306 日で犠牲死させた個体のグラフトにおいても同様に CD40Ig の発現を観察した。長期生存例に対し ACI あるいは BN ラットから採取した皮膚片を移植し脱落までの生着期間を観察した。

3. 結果

同系移植コントロール群 (G-I) は全例 300 日以上生存した。無治療群 (G-II)、AdLacZ 投

与群 (G-III) のグラフト生着期間の中央値 (MST) はそれぞれ 9、10 日であった。AdCD40Ig 5×10^8 pfu 投与群 (G-V) で MST=13 日と若干の生着期間延長がみられた ($p < 0.05$ vs. G-II, G-III and G-IV)。 1×10^9 pfu 投与群 (G-VI) では 118 日目で犠牲死させた 1 例を除いて全例 300 日以上のグラフト生着が得られた。 ($p < 0.05$ vs. G-II, G-III, G-IV and G-V) 血中 CD40Ig 濃度は AdCD40Ig 投与量依存性で、 1×10^9 pfu 投与群で投与後 7 日目に $1518 \pm 236 \mu\text{g/ml}$ の最高値を示し、術後 112 日目でも $13.6 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ を保っていた。死亡した個体から得られたグラフトは広範な壊死と著明な単核球浸潤という典型的な急性拒絶像を呈していた。G-VI で術後 4、7 日目に採取したグラフトでは単核球の浸潤は見られるものの血管や胆管、肝細胞配列は良く保たれていた。118、306 日生存の個体から採取したグラフトにおいては拒絶像は全くみられなかった。AdLacZ 投与後の肝細胞での β -gal の発現率は投与後 3 日目で $50.6 \pm 6.1\%$ のピーク値となり 3 週後まで観察された。CD40Ig の肝細胞での発現率は 5×10^8 pfu 投与群 (G-V) で術後 4 日目に $11.8 \pm 5.2\%$ 、 1×10^9 pfu 投与群 (G-VI) で術後 7 日目に $51.7 \pm 0.3\%$ と最大値を示した。306 日生存のグラフトにおいても僅かながらその発現が認められた。無処置の個体に対して AdLacZ を投与したところ 7 日目に AST、ALT の上昇をみたが 14 日目にはほぼ正常値まで回復した。長期生存した G-VI の 5 個体に移植したドナーと同系の皮膚片は全て 150 日以上生着したのに対し、third party のものは全て 27 日以内に拒絶された。

4. 考察

今回我々はラット肝移植モデルにおいてアデノウイルスによる CD40Ig 遺伝子導入治療が長期グラフト生着を可能とするとともにドナー特異的免疫寛容をももたらすことを示した。

これまで CD40-CD40L の信号伝達を阻害し免疫抑制を獲得する方法として抗 CD154mAb の投与がラット心モデル、マウス、ラ氏島、皮膚モデル、あるいはサル腎移植モデルで検討されその優れたグラフト生着延長効果が報告されている。しかし長期にわたって抗体を投与し続けなければならないことや、サル及びヒト臨床治験において血栓形成による副作用が報告され問題となった。また可溶性の CD40IgG を利用する方法は至適効果を得るためには大量投与が必要でその経済効率が問題であった。我々の開発した新しい治療法は単回のベクター投与のみで十分な CD40Ig 産生が得られ、かつ強力な免疫抑制効果をもたらし、明らかな副作用も認めなかった。

これまで TGF- β 、IL-10、Fas-L を遺伝子導入することでラット心、肝、腎移植における免疫抑制効果が検討されているがその効果は十分なものではなかった。また CTLA4Ig 遺伝子導入でラット肝アログラフトが 100 日以上生着したとの報告もあるが免疫寛容が得られるまでには至らなかった。これに対し CD40Ig 遺伝子導入は 300 日以上のラット肝グラフト生着を可能とするとともに抗原特異的な免疫寛容ももたらした。

遺伝子導入においてはベクターの選択も重要である。リポソーム、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス等のベクターと比べアデノウイルスは肝グラフトに特異的に高い親和性と発現率を有する一方でウイルスそのものに対する宿主の反応から、例えば AdLacZ は 3-4 週の短期間で駆除されてしまうという問題がある。ところが CD40Ig の持つ免疫抑制効果はその発現期間を 16 週以上に延長することが明らかとなった。また 1×10^9 pfu 程度の投与量では重篤な肝障害や死亡例は見られずその安全性も確認された。

病理学的検討においては興味深い所見が得られた。長期生存が得られた G-VI では移植後の短期間には完全な免疫抑制状態が存在するわけではなく、グラフトに対する単核球浸潤がみられた。最近の文献では免疫寛容の獲得にはアロ抗原によって活性化された T 細胞のアポトーシスが重要な役割を担っているとする報告もありこのモデルでも同様の事象が関与している可能性が示唆された。

これらの事実より AdCD40Ig 遺伝子導入は有効な治療法の一つとなりうると考えられ、イヌやサル等の大動物での実験を経て臨床応用が期待されるものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦
副 査 教 授 藤 堂 省
副 査 教 授 上 出 利 光

学位論文題名

Induction of donor-specific tolerance by adenovirus mediated CD40Ig gene therapy in rat liver transplantation.

(ラット肝移植モデルにおいてアデノウイルスベクターによる
CD40Ig 遺伝子導入により誘導されたドナー特異的免疫寛容)

臓器移植後の拒絶反応における抗原認識において CD28-CD80/86、CD40-CD40L (CD154) に代表される costimulatory pathway は免疫抑制及び免疫寛容の誘導に重要な役割を担っていると考えられている。これまでの様々な動物実験において CD40L に対するモノクローナル抗体が移植臓器の生着を延長することが確かめられているが、長期にわたり頻回な投与が必要とされている。申請者はアデノウイルスに CD40Ig 遺伝子を組み込んだ新規アデノウイルスベクター AdCD40Ig を作製、ラット肝アロ移植モデルに投与、簡便かつ効果的にこの CD40-CD40L の信号伝達を阻害、抗原特異的免疫寛容を獲得する方法を開発、検討した。

AdCD40Ig はヒト IgG の Fc 領域とマウス CD40 の cDNA 断片を連結させたカセットを 5 型アデノウイルスゲノムに組み込み作製した。ACI から LEW ラット への同所性肝移植を行い、術直後にベクターを静注投与した。無治療群、AdLacZ 投与群のラットは全例 11 日以内に死亡したのに対し 1×10^9 pfu 投与群では 118 日目で犠牲死させた 1 例を除いて全例 300 日以上グラフト生着が得られた。血中 CD40Ig 濃度の推移を測定したところ、血中 CD40Ig 濃度は AdCD40Ig 投与量依存性で、 1×10^9 pfu 投与群で投与後 7 日目に $1518 \pm 236 \mu\text{g/ml}$ の最高値を示し、術後 112 日目でも $13.6 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ であった。主要臓器を採取、病理学的検討を行ったところ、アログラフト無治療群術後 7 日目のグラフトは広範な壊死と著明な単核球浸潤という典型的な急性拒絶像を呈していた。AdCD40Ig 治療群では術後 7 日目に採取したグラフトでは単核球の浸潤は見られるものの血管や胆管、肝細胞配列は良く保たれていた。118 日生存の個体から採取したグラフトにおいては拒絶像は全くみられなかった。無処置のラットに AdLacZ を投与し肝における発現を、またグラフト肝及びそれ以外の臓器における CD40IgG の発現を免疫組織学的手法により検討した。AdLacZ 投与

後の肝細胞での β -gal の発現率は投与後 3 日目で $50.6 \pm 6.1\%$ のピーク値となり 3 週後まで観察された。CD40Ig の肝細胞での発現率は 1×10^9 pfu 投与群で術後 7 日目に $51.7 \pm 0.3\%$ と最大値を示した。118 日生存のグラフトにおいても 6.4% の発現が認められた。長期生存例に対し ACI あるいは BN ラットから採取した皮膚片を移植し脱落までの生着期間を観察した。ドナーと同系の皮膚片は全て 60 日以上生着したのに対し、third party のものは全て 27 日以内に拒絶された。ベクターの肝機能に与える影響を検討した。無処置の個体に対して AdLacZ を投与したところ 7 日目に AST、ALT の上昇をみたが 14 日目にはほぼ正常値まで回復した。以上より申請者の開発した新しい治療法は単回のベクター投与で強力な免疫抑制効果と抗原特異的寛容をもたらし、明らかな副作用も認めなかったことから新たな免疫抑制療法として有望であると考えられた。

審査にあたってまず上出教授より、1. 投与量による CD40Ig 血中濃度の格差、2. 投与経路による発現の違い等の質問があった。1. CD40Ig にウイルスの進入に対する免疫抑制効果もあり一定濃度を超えると感染及び発現率が非常に高くなる、また使用ベクターの titer のばらつきが考えられる、2. 門脈経路、大循環経路でウイルスの感染率に違いが出ることは推測されることであり現在至適投与経路について検討中であること等の回答があった。小柳教授からはアデノウイルスの臨床応用へ向けての問題点について質問があった。これに対して、既に米国では臨床治験が行われているが肝不全を発症したとの報告もあり大動物でのさらなる検討が必要であると返答があった。藤堂教授からは同じ costimulatory pathway を阻害する CTLA4Ig との効果、機序の違いを問う質問があった。自身の実験 data を示しラット肝移植モデルでは AdCD40Ig でのみ免疫寛容が得られたこと、文献を引用し in-vitro の実験で CD40-CD40L をブロックしたときに Tcell の apoptosis が誘導されること等両者の効果、機序について相違点が示された。

この論文は遺伝子療法により CD40-CD40L costimulatory pathway を阻害することで免疫寛容が誘導されたこと示した世界で初めての報告であり高く評価された。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し大学院課程における研鑽や取得単位等と併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。