

学 位 論 文 題 名

Adenovirus-mediated CTLA4Ig Gene Therapy
in Cardiac Xenotransplantation

(異種心臓移植における CTLA4Ig 遺伝子導入の効果)

学位論文内容の要旨

[背景と目的]ハムスター心臓をラットに移植する concordant 異種心臓移植モデルでは、コブラヴェノムファクターによる補体抑制と cyclosporine (CsA)の組み合わせによる T細胞抑制, 抗 IgM 抗体, サイクロフォスファミドや deoxyspergualin (DSG)などの組み合わせにより移植心の長期生着が得られる. CTLA4Ig は同種移植において T 細胞の CD28/B7 副刺激路を阻害することによって, グraftの長期生着をもたらすのみではなく免疫寛容をも誘導することが報告されている. われわれは, 移植初期に DSG と CsA の継続投与を行うことによってハムスター心臓がラット内で長期生着することを報告した. 本研究では concordant 異種心臓移植モデルにおける CTLA4Ig の移植心生着延長とその機序について検討した.

[材料と方法]ルイスラット, ゴールデンシリアンハムスターを用い, ハムスターの心臓をラットの腹部に異所性に移植した. AdexCTLA4Ig 作成は E1, E3 領域を除いた組み換えアデノウイルスベクターにマウス CTLA4-ヒト IgG 遺伝子を組み込んだ AdexCTLA4Ig, 及びコントロールとして CTLA4Ig 活性部分に LacZ を組み込んだ AdexLacZ を使用した. それぞれのアデノウイルスは, Nakagawa らの方法に準じ 293 細胞により組み換え増殖させ, 精製した. 免疫抑制処置により以下の 5 群に分けた.

1) 無治療群(生理食塩水, n=6), 2) DSG 単独群(n=8), 3) CsA+DSG 群 (n=12), 4) CTLA4Ig +DSG 群 (n=7), 5) LacZ+DSG (n=6). CsA+DSG 群は CTLA4Ig+DSG 群の拒絶日と同日に犠牲死させた標本を使用した. 無治療以外の実験動物に DSG を移植日前日より移植後 7 日目まで 5mg/kg/日, CsA を移植日より移植後 90 日まで 15mg/kg/日, 後足に筋肉内注射した. AdexCTLA4Ig と AdexLacZ は移植日 7 日前に 1×10^9 plaque-forming units (p.f.u.)をラットの尾静脈より静脈内投与した. ラットの眼窩静脈より移植後, 0 日, 3 日, 7 日, 拒絶日に採血した. 血清 CTLA4Ig 濃度測定は ELISA プレートにヤギ抗ヒト IgG 抗体をコーティングし, 1%ウシ血清アルブミンでブロック後, 100-10000 倍に希釈したサンプル, ハムスター抗 CTLA4 単クローン抗体(4F10)の上清, ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ハムスター-IgG 抗体の順番で反応させ, O-フェニレンジアミンに

て発色させ、ELISA リーダー490nm 波長にて吸光度測定した。異種反応性血清 IgM, IgG 抗体価は HAK シリアンハムスター腎細胞を固定した ELISA プレートで測定した。摘出した心臓は長軸に垂直に分割し、1 片はパラフィン包埋とし、ヘマトキシリンとエオジン染色を作成し、他の 1 片は液体窒素で凍結し、IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, 補体 C3 免疫染色標本を作成した。グラフト生着期間の比較は F 検定をした上で、Student's t 検定により検定し、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。数値の表記は平均値±標準偏差とした。

【結果】ラットの血中 CTLA4Ig 濃度は移植時全例で $20 \mu\text{g/ml}$ 以上を維持し、1 例のみ拒絶時 $10 \mu\text{g/ml}$ 以下だった。グラフト生着期間は無治療群で 3.7 ± 0.5 日、DSG 群で 12.4 ± 0.9 日、LacZ 群で 11.0 ± 0.0 日だった。CsA+DSG 群は全例拒絶されず、100 日以上で死亡した。CsA+DSG 群のグラフト生着期間は 139.3 ± 9.8 日で、他の 4 群に比し、延長した ($p < 0.0001$)。CTLA4Ig+DSG 群のグラフト生着期間は 23.6 ± 6.0 日で、CsA+DSG 群以外の他の 3 群と比し、延長した ($p < 0.0002$)。拒絶時 IgM 抗体価は CsA+DSG 群に比し CTLA4Ig+DSG 群で高値を示したが ($p < 0.0001$)、他の IgG 抗体価には有意差を認めなかった。組織学的検討では、CTLA4Ig+DSG 群は組織間隙の強い出血、浮腫、細胞浸潤を認め、CsA+DSG 群は軽度細胞浸潤を認めたが、心筋および脈管は正常像を呈した。CTLA4Ig+DSG 群は拒絶時のグラフトの血管内皮に IgM が陽性であったが、CsA+DSG 群は陰性だった。C3 染色では両群とも陽性だった。IgG 染色は両群とも陰性だった。

【考察】同種移植では CD28/B7 の副刺激経路が TCR 主刺激シグナルと同時に刺激されて、T 細胞の活性化と増殖をもたらす。本研究では CD28 より B7 に親和性の強い CTLA4Ig を CD28/B7 副刺激ブロッカーとして用いた。同種心臓移植において、アデノウイルスベクターで遺伝子導入することにより CTLA4Ig の血中濃度を高く保ち、 $10 \mu\text{g/ml}$ 以上血中 CTLA4Ig 濃度があれば十分末梢リンパ球を抑制すると報告されている。我々の異種心臓移植モデルでは 7 例中 6 例で拒絶時に $10 \mu\text{g/ml}$ 以上の血中濃度を保っていた。AdexCTLA4Ig と DSG の組み合わせにより DSG 単独、もしくは DSG と AdexLacZ の組み合わせよりも生着時間が延長したことは、同種心臓移植と同様に異種心臓移植においても副刺激シグナルがグラフト生着延長に重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。DSG と AdexCTLA4Ig の組み合わせでは拒絶時には異種反応性 IgM 抗体価は上昇しており、免疫染色では血管内皮に IgM の沈着が認められた。CTLA4Ig は CyA ほどには異種反応性 IgM の上昇を抑えることができず、補体沈着も抑制しないことから、グラフトは IgM 沈着とそれに続く補体経路の活性化により拒絶されたものと推測される。DSG と CsA の組み合わせでは、異種反応性 IgM 抗体価は拒絶時に上昇せずグラフト内沈着も認めなかったことは、この時点での IgM 抑制がグラフト長期生着に重要な役割を担っていることが示唆される。異種移植においては同種移植に比し、高濃度の CTLA4Ig 濃度が必要なのか、あるいは、CD28/B7 の副経路

の阻害だけでT細胞の活性化を抑制することができるのか、本研究では明らかにすることはできなかった。しかし、アデノウイルスを使用し、比較的高濃度のCTLA4Igを得たのにも関わらず、IgMの上昇および拒絶を招いたことは、後者の可能性を示唆するものである。CD28/B7経路に加えて他の副刺激経路を同時に抑制する事により、長期生着が得られるのかを検討することが、今後の課題の一つである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 北 畠 顕
副 査 教 授 川 口 秀 明

学 位 論 文 題 名

Adenovirus-mediated CTLA4Ig Gene Therapy in Cardiac Xenotransplantation

(異種心臓移植における CTLA4Ig 遺伝子導入の効果)

本研究では concordant 異種心臓移植モデルにおける CTLA4Ig の移植心生着延長とその機序について検討した。AdexCTLA4Ig 作成は E1, E3 領域を除いた組み換えアデノウイルスベクターにマウス CTLA4-ヒト IgG 遺伝子を組み込んだ AdexCTLA4Ig, 及びコントロールとして CTLA4Ig 活性部分に LacZ を組み込んだ AdexLacZ を使用した。免疫抑制処置により以下の 5 群に分けた。1) 無治療群(生理食塩水, n=6), 2) DSG 単独群(n=8), 3) CsA+DSG 群 (n=12), 4) CTLA4Ig+DSG 群 (n=7), 5) LacZ+DSG (n=6)。CsA+DSG 群は CTLA4Ig+DSG 群の拒絶日と同日に犠牲死させた標本を使用した。無治療以外の実験動物に DSG を移植日前日より移植後 7 日目まで 5mg/kg/日, CsA を移植日より移植後 90 日まで 15mg/kg/日, 後足に筋肉内注射した。AdexCTLA4Ig と AdexLacZ は移植日 7 日前に 1×10^9 plaque-forming units (p. f. u.) をラットの尾静脈より静脈内投与した。ラットの眼窩静脈より移植後, 0 日, 3 日, 7 日, 拒絶日に採血した。血清 CTLA4Ig 濃度測定は ELISA プレートにヤギ抗ヒト IgG 抗体をコーティングし, 1%ウシ血清アルブミンでブロック後, 100-10000 倍に希釈したサンプル, ハムスター抗 CTLA4 単クローン抗体(4F10)の上清, ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ハムスターIgG 抗体の順番で反応させ, 0-フェニレンジアミンにて発色させ, ELISA リーダー490nm 波長にて吸光度測定した。異種反応性血清 IgM, IgG 抗体価は HAK シリアンハムスター腎細胞を固定した ELISA プレートで測定した。摘出した心臓は長軸に垂直に分割し, 1 片はパラフィン包

埋とし、ヘマトキシリンとエオジン染色を作成し、他の1片は液体窒素で凍結し、IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, 補体 C3 免疫染色標本を作成した。結果：ラットの血中 CTLA4Ig 濃度は移植時全例で $20 \mu\text{g/ml}$ 以上を維持し、1例のみ拒絶時 $10 \mu\text{g/ml}$ 以下だった。グラフト生着期間は無治療群で 3.7 ± 0.5 日、DSG 群で 12.4 ± 0.9 日、LacZ 群で 11.0 ± 0.0 日だった。CsA+DSG 群は全例拒絶されず、100 日以上で死亡した。CsA+DSG 群のグラフト生着期間は 139.3 ± 9.8 日で、他の4群に比し、延長した ($p < 0.0001$)。CTLA4Ig+DSG 群のグラフト生着期間は 23.6 ± 6.0 日で、CsA+DSG 群以外の他の3群と比し、延長した。拒絶時 IgM 抗体価は CsA+DSG 群に比し CTLA4Ig+DSG 群で高値を示したが、他の IgG 抗体価には有意差を認めなかった。組織学的検討では、CTLA4Ig+DSG 群は組織間隙の強い出血、浮腫、細胞浸潤を認め、CsA+DSG 群は軽度細胞浸潤を認めたが、心筋および脈管は正常像を呈した。CTLA4Ig+DSG 群は拒絶時のグラフトの血管内皮に IgM が陽性であったが、CsA+DSG 群は陰性だった。C3 染色では両群とも陽性だった。IgG 染色は両群とも陰性だった。以上の結果より、1) ラット同種心移植においては血清 CTLA4Ig 濃度が $10 \mu\text{g/ml}$ 以上で拒絶反応が抑制されるが、異種心移植では同濃度で移植心拒絶がみられた。2) AdexCTLA4Ig+DSG 群では拒絶時の異種反応性 IgM 抗体は上昇しており、免疫染色で IgM と C3 の血管内皮沈着を認めた。このことは IgM 沈着、それに続く補体経路の活性化が拒絶をもたらすことを示唆した。3) CD28/B7 副刺激経路を抑制することにより異種移植片長期生着が得られる可能性がある。公开发表に際して、川口教授から CTLA4Ig 単独投与群の有無、CsA とアデノウイルスベクターの問題点、新しいベクターの使用計画について、北島教授からは、遺伝子導入効率は確認の有無、直接投与の問題点、その投与量と投与間隔について、安田教授からは、異種移植と同種移植の拒絶のメカニズムの違いは、遺伝子導入を用いた理由、IgM 抗体と IgG 抗体の発現時期など質問がなされた。これらの質問に対し、申請者は実験結果と関連論文を引用し、誠実にかつおおむね妥当な回答をなし得た。この論文は concordant 異種心移植モデルで CTLA4Ig を用い、移植心生着延長をはかるとともにその機序について検討したものであり、異種心臓移植の研究に寄与するものである。審査員一同は、この研究が関連領域研究の進展に与える成果を評価し、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）を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。