

学位論文題名

遺伝子導入療法を用いた
同種神経移植における拒絶反応抑制

学位論文内容の要旨

同種神経移植については数多くの実験的研究が行われているが、通常拒絶反応抑制のために免疫抑制剤の長期全身投与を要し、それによる副作用が問題となる。

近年新たな免疫抑制物質として、可溶性融合蛋白 CTLA4Ig が注目されている。CTLA4Ig は細胞接着分子を介した T 細胞活性化に必要なシグナル 2 を阻害することにより急性拒絶反応を抑制することが報告されている。この CTLA4Ig 遺伝子を組み込んだ adenovirus vector (AdCTLA4Ig)を用いた遺伝子導入療法により同種神経移植の拒絶反応を抑制できる可能性がある。本研究では AdCTLA4Ig の局所及び全身投与が同種神経移植における拒絶を抑制可能か、また 2 つの投与法には拒絶反応抑制効果に差があるかどうかを検討した。

<材料と方法>

AdCTLA4Ig を精製し、 10^9 PFU/ml (plaque forming units per ml) 台の virus 溶液を得た。実験動物は週齢 7~10 週、体重 250~300g の雄 ACI ラット (*RT1^a*) と雄 Lewis ラット (*RT1^b*) を使用し、ACI を donor に、Lewis を recipient に用いた。Donor から採取した坐骨神経 15mm を recipient の坐骨神経に作成した 5mm の gap に移植した。実験群は syngeneic 群 (n=10, Lewis to Lewis)、allogeneic 非治療群 (n=10)、allogeneic 局所投与群 (n=10)、allogeneic 全身投与群 (n=10) を設定した。局所投与群は術中 AdCTLA4Ig (3×10^8 PFU) を移植神経に直接注射し、全身投与群は術直後に AdCTLA4Ig (1×10^9 PFU) を静注した。局所投与群は術後 1、2 週で移植神経の CTLA4Ig 発現を免疫組織科学的染色により観察した。全身投与群は投与後 3、7、10、14、21 日に CTLA4Ig 血中濃度を測定した。拒絶反応の評価は術後 2、8 週で各群 5 匹ずつ移植神経を採取し H-E 染色後光顕によって組織病理学的評価を行い、Büttermeyer の示す評価法を用いて拒絶の grade を定量化した。術後 8、16 週では各群の motor nerve conduction velocities (MNCV) の測定を行い、各ラットの反対側の坐骨神経 MNCV 値により標準化した。

各群の組織病理学的、電気生理学的評価より得られた値の平均は ANOVA と Fisher protected least significant difference test を用いて統計学的比較検討を行った。P 値 < 0.05 で有意差有りとした。

<結果>

局所投与群の CTLA4Ig 発現は術後 1 週の移植神経内に観察された。

全身投与群では血中 CTLA4Ig 濃度は投与後 7~10 日でピークに達しその後漸減する傾向がみられたが、21 日まで高濃度を維持していた。

組織病理学的評価では、syngeneic 群の移植神経は術後 2、8 週共に正常な神経周膜構造を呈し、単核球浸潤、神経束内癒痕形成はほとんど認められなかった。術後 8 週の組織では再生有髄神経が多数認められた。一方非治療群では術後 2 週では単核球浸潤と癒痕形成が著明で、8 週では癒痕形成が高度となり神経周膜構造の破壊も認められた。局所投与群では術後 2 週では単核球浸潤、癒痕形成は比較的軽度であったが、8 週では癒痕形成が著

しく、神経周膜構造の破壊も認められた。全身投与群では術後 2 週では軽度の単核球浸潤が認められるのみで、8 週でも神経周膜構造は保たれ微細な再生有髄神経も認められた。

電気生理学的評価では術後 8 週では、非治療群と局所投与群では MNCV は測定不能であった。全身投与群の平均 MNCV 健側比は 41.2% で、syngeneic 群の平均健側比と有意差はなかった。術後 16 週に測定した全身投与群の平均 MNCV 健側比も 74.2% と良好で、syngeneic 群と有意差はなかった。

<考案>

同種神経移植の研究において、拒絶反応抑制のためには cyclosporine A や FK506 のような免疫抑制剤が重要な役割を占めている。しかしこれらの免疫抑制剤は長期間全身投与を要し、日和見感染、腎障害などの重篤な副作用が問題となる。

この問題を解決するために新たな免疫抑制療法として、T 細胞活性化のシグナル 2 を標的とした方法が研究されている。同種神経移植分野においても抗 ICAM-1 抗体、抗 LEA-1 抗体のような細胞接着分子に対するモノクローナル抗体を用いた研究が報告されているが、この場合もモノクローナル抗体の投与を一定期間要する。

そのため著者は高い免疫抑制能力を持つとされる CTLA4Ig に着目した。最近の臓器移植分野においては CTLA4Ig による移植片の長期生着や免疫寛容獲得の報告が多数みられ、著者らもラット肢移植モデルを用いて CTLA4Ig 全身投与が複合組織移植における拒絶反応抑制に有効であったことを報告している。さらに昨今は AdCTLA4Ig を用いた遺伝子導入療法も同種臓器移植の拒絶反応を抑制することが報告されているが、同種神経移植においては AdCTLA4Ig を用いた報告はなかった。

今回の研究では同種神経移植において移植神経への CTLA4Ig-gene の局所的導入が可能であることが確認された。この結果は adenovirus vector を用いた末梢神経での他の therapeutic molecules 発現を確認した過去の報告を支持するものである。しかしその一方 AdCTLA4Ig 局所投与では長期間の移植片生着は得られなかった。この理由としては、局所投与では全身投与と異なり CTLA4Ig は主に移植神経内の Schwann 細胞で発現するため、その数は必然的に限定され、発現する CTLA4Ig 量も急性拒絶反応を抑制するには不十分であった可能性が考えられる。また今回投与した部位は移植神経であったため、正常神経に導入するよりも蛋白の発現期間も短かった可能性がある。この問題を解決するためには末梢神経へ CTLA4Ig-gene をより効率よく導入可能にする vector system や持続的に導入できる局所投与法の工夫が必要であると考えられる。

一方 AdCTLA4Ig 全身投与では非治療群に比して拒絶反応は有意に軽度で、電気生理学的回復も syngeneic 群と同様に認められた一方、副作用の発現は認められなかった。また今回 AdCTLA4Ig 単回投与後の CTLA4Ig 血中濃度は、過去の文献で示された CTLA4Ig 蛋白多数回投与よりも長期に高濃度を維持できた。そのため AdCTLA4Ig 全身投与は長期間拒絶抑制効果を維持することが可能で、recipient へのストレスは他の免疫抑制療法よりも軽度であると考えられる。今回の結果より AdCTLA4Ig 全身投与による遺伝子導入療法は、従来と異なり少ない投与回数で同種神経移植における拒絶反応抑制が可能であると結論できる。

本研究より AdCTLA4Ig 局所投与では移植神経への CTLA4Ig-gene 導入は可能であったが、移植片の長期生着は得られなかった。一方 AdCTLA4Ig 全身投与では単回投与で拒絶反応抑制が確認され、同種神経移植における新たな免疫抑制療法の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 福 島 菊 郎

学 位 論 文 題 名

遺伝子導入療法を用いた

同種神経移植における拒絶反応抑制

同種神経移植については数多くの実験的研究が行われているが、通常拒絶反応抑制のために免疫抑制剤の長期全身投与を要し、それによる副作用が問題となる。近年新たな免疫抑制物質として、可溶性融合蛋白 CTLA4Ig が注目されている。CTLA4Ig は細胞接着分子を介した T 細胞活性化に必要なシグナル 2 を阻害することにより急性拒絶反応を抑制することが報告されている。この CTLA4Ig 遺伝子を組み込んだ adenovirus vector (AdCTLA4Ig) を用いた遺伝子導入療法により同種神経移植の拒絶反応を抑制できる可能性がある。本研究の目的は AdCTLA4Ig 全身投与及び局所投与を用いた遺伝子導入療法により同種神経移植の拒絶反応を抑制可能か、また AdCTLA4Ig 全身投与と局所投与で拒絶反応抑制効果に差があるかを明らかにすることである。

AdCTLA4Ig を精製し、 10^9 PFU/ml (plaque forming units per ml) 台の virus 溶液を得た。実験動物は週齢 7~10 週、体重 250~300g の雄 ACI ラット (*Rt^l*) と雄 Lewis ラット (*RT^l*) を使用し、ACI を donor に、Lewis を recipient に用いた。Donor から採取した坐骨神経 15mm を recipient の坐骨神経に作成した 5mm の gap に移植した。実験群は syngeneic graft 群 (n=10, Lewis to Lewis)、allogeneic graft 非治療群 (n=10)、allogeneic graft 局所投与群 (n=10)、allogeneic graft 全身投与群 (n=10) の 4 群を設定した。局所投与群は術中 AdCTLA4Ig (3×10^8 PFU) を移植神経に直接注射し、全身投与群は術直後に AdCTLA4Ig (1×10^9 PFU) を静注した。遺伝子導入の確認は AdCTLA4Ig 局所投与後の移植神経での CTLA4Ig 蛋白発現を免疫組織化学的染色にて確認した。全身投与後の血中 CTLA4Ig 濃度は ELISA 法により測定した。拒絶反応の評価は術後 2,8 週で移植神経を採取し、H-E 染色後光顕によって組織病理学的評価を行い、拒絶の grade を定量評価した。電気生理学的評価としては術後 8,16 週で坐骨神経の神経伝導速度を測定した。

AdCTLA4Ig 局所投与後は移植後 1 週で移植神経に CTLA4Ig 蛋白の発現が認められ、移植神経への CTLA4Ig-gene 局所的導入が示された。しかし組織病理学的評価では術後 2 週では非治療群よりも拒絶所見は軽度であったが、8 週では非治療群と同程度で、移植片の長期間の生着は得られなかった。また術後 8 週の神経伝導速度も測定不能であった。一方全身投与群では、血中 CTLA4Ig 濃度は投与後 7~10 日でピークに達し、その後漸減する傾向がみられたが、21 日まで高濃度を維持していた。また組織病理学的には、術後 2,8 週ともに非治療群に比較して拒絶所見は軽度であった。電気生理学的にも術後 8, 16 週ともに syngeneic graft 群と同等の神経伝導速度の回復が認められた。

審査にあたり副査福島教授より拒絶反応の観察期間、神経伝導速度の測定方法、神経伝導速度の回復状態について、副査上出教授より神経移植における免疫反応、局所投与方法の改善策について、主査三浪教授より今回着目した CD28-B7 間以外の細胞接着分子の利用、AdCTLA4Ig の投与時期の検討について、また今回観察した 16 週以後に免疫寛容が得られるかについて質問があり、申請者はこれらの質問に対して今回行った動物実験の結果と過去の文献を引用し適切に回答した。

この論文は同種神経移植における拒絶反応抑制のために新たな免疫抑制物質を用い、また新たな投与方法として遺伝子導入療法を用いて組織病理学的、電気生理学的検討を行った独創的な研究であり、AdCTLA4Ig を用いた拒絶反応抑制の可能性を明らかにした点で同種神経移植分野に大きく寄与した。この AdCTLA4Ig を用いてさらに追加の基礎的実験が行われれば、同種神経移植における新たな免疫抑制療法の臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過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）の学位を受ける資格を有するものと判定した。