

ラット肝移植モデルにおける
Modified Clamp Technique によるアデノウイルス
ベクターを用いた CD40Ig 遺伝子導入法の開発研究

学位論文内容の要旨

序論)

急性拒絶反応の成立に重要な T 細胞の活性化には, T-cell receptor を介したドナー抗原提示のほか, 副刺激シグナルが必要であるが, この副刺激を遮断することによりドナー抗原特異的免疫寛容を誘導する試みがなされている. 我々は CD40-CD154 シグナルをターゲットとして CD40Ig 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター(AdCD40Ig)を世界に先駆けて開発し, ラット肝移植モデルにおいて全身投与で用い, 移植肝の長期生着とドナー種特異的な免疫寛容が導入されることを証明した. しかし, アデノウイルスベクターの全身投与は, ウイルスの全身散布に起因する肝機能障害などの臓器障害や産生物質に対する免疫反応, それに引き続き起こる炎症反応などを惹起させることが知られている. 従ってこれらの副作用を軽減させるために, より少ないベクター量でしかも十分な遺伝子導入効率を得ることが重要で, 安全な投与経路, 投与方法について研究を進める必要がある. 今回, 我々はラット肝移植モデルにおいて AdCD40Ig を Clamp Technique(CT)を用いた ex-vivo 経路での遺伝子導入し, 長期生着を得るために必要なベクター量, 保存時間について検討した. 本研究では, より簡便な方法を模索するため, 門脈と肝動脈の両脈管より還流液を注入する CT 原法を改め, 肝動脈はあらかじめ結紮し還流液全量を門脈より注入する Modified Clamp Technique(MCT)を開発した.

方法)

LEW ラット, ACI ラットをそれぞれレシピエント, ドナーとして用い同所性肝移植を行った. レシピエントは, 投与するアデノウイルスベクター量, 投与経路, そして MCT 法を用いた場合にはその保存時間により, 8 群に分けられた. 対照として無治療群を作成した(Group1). レシピエントへ全身投与する群では, AdCD40Ig をリンゲル液で総量 1ml に希釈した液を肝移植直後に静注した.(Group2: 1×10^8 pfu, Group5: 5×10^8 pfu). MCT 法を用いて遺伝子導入した群では, 肝摘出後, 肝上下の肝静脈を遮断した後, AdCD40Ig をリンゲル液で摘出肝重量の 40%に相当する量に希釈し門脈より注入した. 注入によりグラフトが膨張した後, 門脈を遮断した(Group3: 1×10^8 pfu, Group6: 5×10^8 pfu). これらのグラフトは 4°C で 10 分間保存した後, 脈管のクランプを解除, リンゲル液を門脈より注入しグラフト内のウイルス溶液を洗い流した後, レシピエントに同所性に移植した. Group7 (5×10^8 pfu) では, CT の作業をリンゲル液の代わりに UW 液を用い, 冷保存時間を 3 時間とした. Flush out 群(Group4: 1×10^8 pfu, Group8: 5×10^8 pfu)においては, 脈管の遮断は行わなかったため, 門脈より注入したウイルス溶液は肝臓内にトラップされることなく肝静脈より排出された. これらのグラフトも 10 分の冷保存期間を経てリンゲル液で wash out した後, 移植した. 以上の実験群において, グラフト生存率, 血中 CD40Ig 濃度(7日目), 肝

機能、遺伝子導入効率 (HumanIgG 染色) を検討した。また長期生着をみた群では、ドナー種特異的免疫寛容導入の有無を確認するため皮膚移植を施行した。皮膚移植片は、肝移植のドナー種である ACI ラットと 3rd Party である BN ラットの皮膚を用いた。

結果)

グラフト生存率: Group1 の移植肝は 2 週間以内に全て拒絶された。ベクター量を 1×10^8 pfu に設定した群のうち、Group 2 (全身投与) では全例が、Group3 (MCT) では 6 匹中 4 匹に 100 日以上長期生着を見、両群に有意差は無かった。Group4 (Flush out) では全ての動物は 4 週間以内に死亡した。一方、ベクター量を 5×10^8 pfu に設定した群のうち、Group5 (全身投与) では 6 匹中 5 匹が 4 週以内に死亡した。Group6 (MCT) ではグラフト生存の中央値は 55.5 日と有意に延長し、6 匹中 2 匹は 100 日以上長期生着をみた。Group7 (MCT 3 時間) では全例が 100 日以上生存した。Group8 (Flush out) では、全ての動物は 4 週間以内に死亡した。

血中 CD40Ig 濃度: 投与方法に関わらず、移植後 7 日目にピークに達し、各群の 7 日目の血中濃度を比較した。 1×10^8 pfu に設定した群では、Group 2 (全身投与) と Group3 (MCT) の濃度はほぼ同等であり、有意差は無かった。一方、 5×10^8 pfu に設定した群では、Group7 (MCT 法 3 時間)、Group6 (MCT)、Group5 (全身投与) の順に高く、この 3 群間にはいずれも有意差を認めた。

肝機能: 4 日目の ALT, AST を比較した。長期生着の得られた群のうち、全身投与群 (Group2: 1×10^8 pfu) では無治療群と有意差無く高値であったのに対し、MCT 法を用いた操作によりグラフトの長期生着が得られた Group3 (1×10^8 pfu)、Group6 (5×10^8 pfu)、Group7 (5×10^8 pfu、3 時間冷保存) では、有意に低値であった。

肝臓への遺伝子導入効率: ベクター量に関わらず、遺伝子導入効率は MCT 法 (Group3, Group6) がレシピエント全身投与 (Group2, Group5) を上回り、さらに 5×10^8 pfu (Group7) では 3 時間の冷保存期間をおくことで更に導入効率は向上した。

皮膚移植: Group2, 3, 6, 7 より計 6 匹を選択し皮膚移植を行った。BN の皮膚移植片が全て 4 週間以内に拒絶されたのに対し、ACI の移植片は全例で 40 日以上生着をみた。

考察)

これまで ex-vivo 経路の遺伝子導入においては、Clamp Technique を用いて 3 時間以上の冷保存時間を設定することにより肝細胞とウイルスベクターとの接触機会が増え、遺伝子導入効率が向上するとの報告がなされていた。今回我々は、ラット肝移植モデルにおいて AdCD40Ig を MCT を用いた ex-vivo 経路での遺伝子導入し、長期生着を得るために必要なベクター量、保存時間について検討したが、その結果、保存時間を僅か 10 分としても、全身投与した場合とほぼ同等の免疫抑制効果を得ることができることを証明した。ウイルスベクターの肝細胞への導入には Coxsackie-Adenoviral Receptor (CAR) を介する経路が一般に知られているが、本実験で見られた極短時間での導入は、CAR 以外に静水圧による物理的な導入機序の存在を示唆するものと考えられた。今後、移植医療において遺伝子治療が用いられるためには安全性と簡便性の確保が最も重要である。今回我々が開発した MCT は、ウイルスベクターの全身散布を避けることができる点、簡便でありわずか 10 分の処置により十分な遺伝子導入が得られる点、長期の冷保存期間を必要とせず虚血再灌流障害を回避できる点、肝機能障害が軽減できる点などで、これまでの方法より優れていると考える。今後、この手法を臨床の移植医療に応用するためには、大動物の移植実験で遺伝子導入効率や免疫抑制効果、そして安全性などを更に詳しく検討する必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 有 賀 正
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

ラット肝移植モデルにおける Modified Clamp Technique によるアデノウイルス ベクターを用いた CD40Ig 遺伝子導入法の開発研究

抗原提示における副刺激を遮断することによりドナー抗原特異的免疫寛容を誘導する試みがなされている。これまで CD40-CD154 シグナルをターゲットとした CD40Ig 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (AdCD40Ig) をラット肝移植モデルにおいて全身投与で用い、移植肝の長期生着とドナー種特異的な免疫寛容が導入されることが証明されているが、ベクターの全身投与は、ウイルスの全身散布に起因する臓器障害や免疫反応を惹起させることが知られている。これらの副作用を軽減させるために、より少ないベクター量で十分な遺伝子導入効率を得るための研究を進める必要がある。本研究ではラット肝移植モデルにおいて AdCD40Ig を Modified Clamp Technique (MCT) を用いた ex-vivo 経路での遺伝子導入し、長期生着を得るために必要なベクター量、保存時間について検討した。その結果、MCT では保存時間を 10 分としても、ベクターを全身投与した場合とほぼ同等の免疫抑制効果を得ることができ、肝細胞に対する障害もより少なかった。更に、保存時間を 3 時間と延長させることにより移植臓器の長期生着に必要なベクター量を半分に減らすことが可能であった。

審査にあたっては、まず有賀教授より、(1)肝臓の血管内は既に液体で満たされているため、クランプすることによりむしろベクターが末梢まで行き届かない可能性があるのではないか (2)急性拒絶反応を回避できた個体については、免疫抑制作用はどのくらい持続されるのか等の質問があった。それに対し、(1)肝門部から末梢の肝表面にかけて肝組織像を切り出し検鏡したが、肝臓全体にわたり陽性細胞が分布しており末梢にもベクターが浸透していることが確認されたこと (2)300 日以上を経ても移植肝および皮膚移植片の生着を見ており、ラットの平均寿命が約 2 年であることを考慮した場合、一生涯に渡り免疫抑制作用が維持される可能性がある と解答があった。浅香教授から、(1)遺伝子導入効率を肝組織の免疫染色で確認しているが、何らかの方法で定量化すべきではないか (2)臓器保存時間を 3 時間に延長することで遺伝子導入率が向上するメカニズムは何か [3]MCT の安全性を肝機能のみで検討しているが、そのみで優位を結論付けるのは拙速ではないか 等の質問があった。それに対し、(1)染色の濃淡により導入判断が困難な細胞もあり正確な導入効率の算出には専用の解析ソフトの利用を今後検討する (2)保存時間が延長されることにより肝細胞とウイルスベクターの接触時間が長くなることにより感染・導入機会が増えた結果と考える [3]肝機能には、拒絶反応・アデノウイルスベクターの細胞障害性・臓器保存に伴う肝細胞障害が複雑に

関与しており、確かに肝機能のみで MCT の有意を判断するのは拙速であると考え、有意性を示す一つの根拠になりうる と解答があった。藤堂教授から、(1)遺伝子治療の安全性を確保するために、他にどのような試みがなされているか(2)クランプすることにより何故導入効果が向上するのか[3]MCT を臨床応用する場合、実際にはどのような方法が考えられるのか 等の質問があった。これに対し、(1)アデノウイルスバクターの導入効率を向上させる試みとしてヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の併用、また ex-vivo 経路で遺伝子導入する方法では、プラスミドを用いたエレクトロポレーションにより臓器に導入する方法が研究されているものの、いずれも十分な効果を挙げておらず未だ途上段階あること(2)短時間での導入効率の向上は、従来考えられている Cocksakie -Adenoviral Receptor を介する感染経路以外に、静水圧による物理的な導入機序が働いた可能性が高いこと [3]海外における脳死肝移植では8時間程度の冷保存時間を経て移植されている事実より MCT での3時間冷保存は実際的事実であること、しかし本邦における生体肝移植では臓器保存時間は短時間であり肝切離面が広範囲に露出していることより、グラフト内に一定の静水圧を維持するためには特別な循環回路の開発が必要になるとの解答があった。

この論文は肝移植に遺伝子治療を応用するために、アデノウイルスの効率性を確保しつつ、その危険性を最小限に抑えるための遺伝子導入を開発したもので、今後、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)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。