

学位論文題名

GENE THERAPY MEDIATED CD40L AND CD28
COSTIMULATORY SIGNALING BLOCKADE PLUS TRANSIENT
ANTI-XENOGRAFT ANTIBODY SUPPRESSION INDUCES
LONG-TERM ACCEPTANCE OF CARDIAC XENOGRAFTS

(Concordant 異種心移植における AdCD40Ig and/or AdCTLA4Ig の
遺伝子治療と FK779の短期治療の併用による免疫抑制効果)

学位論文内容の要旨

〈序言〉

近年の遺伝子工学技術の進歩により異種臓器移植における超急性拒絶反応(HAR)は克服されつつある。しかしながら、移植後に産生される抗ドナー抗体と補体活性化により惹起される急性血管性拒絶反応(AVR)及びT細胞が主に関与する急性細胞性拒絶反応(ACR)は異種移植を臨床応用する上で未だ大きな障害となっている。AVRとACR制御する上でB及びT細胞の増殖を抑制する現行の代謝拮抗剤とカルシニューリン阻害剤の併用による免疫抑制法は有効性が報告されている。しかし、この治療戦略では免疫抑制剤を終生にわたり服用しなければならず、これら薬剤の副作用や長期にわたる汎免疫抑制による易感染性や悪性腫瘍発生の危険性を増加させるという問題がある。

T細胞と抗原提示細胞(APCs)の間にあるCD28-CD80/CD86及びCD40-CD40L副刺激シグナルはT細胞活性化及び増殖において重要な役割を果たしている。また、これら副刺激シグナルを遮断することで抗原特異的にT細胞の不応答状態(anergy)を誘導し、同種(アロ)移植で長期にわたりグラフト生着期間を延長することが報告されている。更に、CD40-CD40Lシグナルは、B細胞で免疫グロブリン(Ig)クラススイッチ、マクロファージや血小板、内皮細胞の活性化などに関与しており、これらの因子はAVRの病態において重要である。

遺伝子治療を用いた副刺激シグナル遮断法により抗原特異的な免疫抑制が得られることや終生にわたる免疫抑制剤服用を回避できる可能性がある。本研究では異種心移植において移植早期に産生される抗ドナー特異的抗体をLeflunomideの誘導体である新規代謝拮抗剤FK779を用いることで一時的に抑制し、かつ、AdCTLA4Ig(CTLA4Ig組み込みアデノウイルス)及びAdCD40Ig(CD40Ig組み込みアデノウイルス)を用いCD28-CD80/CD86及びCD40-CD40L副刺激シグナルを遮断することで引き続き起こるT細胞依存性反応を抑制する免疫抑制法で、異種グラフトの長期生着が得られるか検討した。

〈研究方法〉

Golden Syrianハムスターをドナー、LEWラットをレシピエントとし異所性心移植を行った。FK779 10 mg/kgは1% carboxyl methyl cellulose溶液に懸濁し、移植前日より一週間経口投与した。AdLacZ(β -galactosidase発現control遺伝子)、AdCTLA4Ig、AdCD40Igはそれぞれ移植直後および移植2日前にレシピエント陰茎静脈より 1×10^9 plaque forming unitを単回投与した。治療法の組み合わせより9つの実験群(n=6-8)を作成した。グラフト生着期間(中央値:MGS)、CTLA4IgとCD40Igの血中濃度の推移及びこれら遺伝子の導入効率、抗ドナー特異的IgM

抗体の推移、移植心の病理組織学的所見 (HE 染色)、グラフト内の C3 及び抗ドナー IgM 抗体の沈着、E・P-selectin 発現、Macrophage, CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞の浸潤の程度を免疫染色法で検討した。各治療群の移植心生存期間は Kaplan-Meier 法で解析し、群間の検定には log rank test を用いた。P<0.05 で優位差ありとした。

(研究結果)

無治療群とコントロール群 (AdLacZ 投与群) のグラフト生着期間中央値 (median graft survival: MGS) は 3 日であった。AdCTLA4Ig 或は AdCD40Ig の単独治療群と両者の併用群ではいずれもグラフト生着期間の延長を認めなかった (MST: 3-4 日)。FK779 単独治療群 (FK779 の 7 日間投与 + AdLacZ) で MGS は 7 日に延長した。 (p<0.05、対コントロール)。FK779 + AdCTLA4Ig 治療群は FK779 単独治療群と比較し、グラフト生着期間 (MGS: 9 日) に有意差はなかった (p=0.053)。一方、FK779 + AdCD40Ig 治療群では 6 匹中 2 匹で 100 日を超える長期生着が得られ、MGS は 30.5 日と著しく延長した (p<0.001、対コントロール群及び FK779 単独治療群)。更に、FK779 + AdCTLA4Ig + AdCD40Ig 併用群では全例が 100 日以上生着した (p<0.001、対コントロール群及び FK779 単独治療群)。

CTLA4Ig と CD40Ig の血中濃度は両者とも各遺伝子治療後 7-10 日間でピーク値に達し次第に漸減したが、FK779 + AdCTLA4Ig + AdCD40Ig 併用群では移植 105 日後も高値を維持していた (血清 CTLA4Ig 濃度: 112 ± 41 µg/ml、血清 CD40Ig 濃度: 171 ± 54 µg/ml)。

コントロール群や AdCTLA4Ig 或は AdCD40Ig 単独・併用群ではいずれも血中抗ドナー特異的 IgM 抗体の上昇を認め、移植心は拒絶時に血管内皮損傷、微細血管における血栓形成、組織の出血・広汎壊死、及び主に心外膜下への多型核細胞浸潤等、組織学的に典型的 AVR 像を呈していた。FK779 単独治療群では投薬期間中の血中抗ドナー IgM 抗体上昇は抑えられグラフトは組織学的に AVR 像を呈しなかったが、FK779 投与終了後は血中抗ドナー IgM 抗体が再上昇しグラフトは AVR により拒絶された。これらの結果は FK779 + AdCTLA4Ig 治療群でも同様であった。一方、FK779 + AdCD40Ig 治療群及び FK779 + AdCTLA4Ig + AdCD40Ig 治療群では、FK779 投与終了後も抗ドナー特異的 IgM 抗体血中濃度は上昇せず、グラフト内の IgM 及び C3 沈着や E・P-selectin 発現 (血管内皮の活性化) も抑制され AVR 像を呈さなかった。FK779 + AdCD40Ig 治療群において移植後 50 日以内に拒絶されたグラフトでは血管内皮周囲と心筋間質に CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞の浸潤を認め、ACR の像であった。100 日以上生着したグラフトでは細胞浸潤は抑制されていたが、冠動脈の内膜肥厚を認め病理学的に慢性拒絶反応の所見であった。

(考査と結論)

CD40L 及び CD28 副刺激シグナルを遮断する免疫抑制法はアロ同種臓器移植において非常に強力かつ抗原特異的な免疫抑制作用が得られることが報告されているが、本研究結果からこの方法論では異種移植における AVR を制御できないことが分かった。これは T 細胞反応を示さないヌードラット (無胸腺) でも、ハムスターやマウスの移植心の正着期間は全く延長されないという報告からも裏付けられる。即ち、異種移植における拒絶反応では T 細胞非依存性の液性反応が重要であることを示唆している。本研究ではこの問題 (抗異種抗体の産生) を新しい代謝拮抗剤を移植早期のみ使用することで解決し得、遺伝子治療による CD40L 及び CD28 副刺激シグナル遮断を併用することで、異種移植心の長期正着を得ることができた。本研究によって得られたあらたな免疫抑制法は異種臓器移植時の治療戦略をたてる上で重要であると考えられる。しかし本免疫抑制法で AVR 及び ACR を制御し長期生着を得たグラフトでは慢性拒絶反応像が認められ、慢性拒絶反応の克服法の開発が今後の課題である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

GENE THERAPY MEDIATED CD40L AND CD28 COSTIMULATORY SIGNALING BLOCKADE PLUS TRANSIENT ANTI-XENOGRAFT ANTIBODY SUPPRESSION INDUCES LONG-TERM ACCEPTANCE OF CARDIAC XENOGRAFTS

(Concordant 異種心移植における AdCD40Ig and/or AdCTLA4Ig の
遺伝子治療と FK779の短期治療の併用による免疫抑制効果)

新規代謝拮抗剤(FK779)短期治療と CTLA4Ig/CD40Ig 組込みアデノウイルスベクター (AdCTLA4Ig/AdCD40Ig)による B7 及び CD154 シグナル遮断の遺伝子治療の併用で、異種移植における急性血管性拒絶反応(AVR)や急性細胞性拒絶反応(ACR)が制御可能か否かを検討した。ハムスターからラットへの異種心移植を用いた。FK779 (10 mg/kg)は移植前日より7日間、AdCTLA4Ig 及び AdCD40Ig は各々移植当日及び2日前に単回静脈投与(10^9 PFU)した。無治療及び AdLacZ 投与群の移植心生着期間中央値(MGS)は共に3日でAVRによる拒絶であった。副刺激経路のみの群でもAVRにより3日で拒絶された。FK779 単独投与群では一時的にAVRを抑えたが、グラフトは再び7日でAVRに拒絶された。3剤併用群では全例が長期生着(MSG>100日)しAVR及びACRは完全に抑制された。しかし、長期生着グラフトには病理学的に慢性拒絶反応(CR)像を認めた。AdCTLA4Ig/AdCD40Ig 遺伝子治療併用のみではAVRを抑制することはできなかったが、FK779 短期治療と遺伝子治療の併用により、AVR及びACRの両者を抑制しうることが分かった。しかし、この治療法ではCRを免れず、CRに対する更なる治療戦略の開発が課題となった。

審査にあたっては、まず上出教授より 1) 異種心移植の長期生着に成功した他の報告の有無について、2) 長期生着した2群を比較し、血中抗異種 IgM 抗体上昇に有意差があるか。との質問があった。それに対し、1) FK779 の親薬である Leflunomide での長期生着の報告があるが、Leflunomide の半減期は14日であり、臨床応用は困難である。2) その差はない。FK779+AdCD40Ig の治療群ではIgMは上昇したが、CD40Igが内皮細胞の活性化を抑制することでグラフトが拒絶されなかった。と返答した。安田教授より、慢性拒絶反応における血管内膜の肥厚の機序として、それが純粋な免疫的な反応なのか、それとも炎症を主体とした非特異的な生体の反応なのか、また、治療法にはどのようなものが考えられるか、との質問があった。それに対し、慢性拒絶反応

のリスクファクターには免疫因子と非免疫因子がある。免疫反応により惹起された炎症により血管内皮の活性化を起し、接着因子 (E, P selectin) 及び血管平滑筋細胞 (SMC) の増殖因子 (PDGF) を出し、Macrophage など炎症細胞を接着させ、SMC を増殖させ、血管内皮の肥厚になる。治療法はまだ確立されていないが、関与する新規遺伝子の探索；T 細胞と抗原提示細胞の間の機序の解明；接着因子及び増殖因子の阻害の 3 つの方向性が考えられる。野々村教授からは、1) 慢性拒絶反応に対し今後どのような研究が考えられるか。2) 異種移植における同所性グラフトは常に正常に機能するのか、との質問があった。それに対し、1) 慢性拒絶反応を抑制する可能性のある分子を一つずつ検討すべきである。今 iNOS 阻害剤と Heme oxygenase-1 の抑制効果を検討しているところである。2) 異種間で移植された臓器は機能をするかどうかの問題は今後の課題である。藤堂教授より、1) 異種臓器移植を臨床応用するにはいろいろな問題がある。最も臨床に近い異種移植は豚島移植である。2) CD28-CD80/CD86 及び CD40-CD40L 副刺激シグナルの遮断治療法は現在、霊長類の動物実験でも良好な結果が得られており、臨床応用も期待できるとのコメントがあった。

本研究によって得られた新たな免疫抑制法は異種臓器移植時の治療戦略をたてる上で重要であると考えられ、この論文は高く評価された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。