

Prolonged cardiac allograft survival in rats systemically injected adenoviral vectors containing CTLA4Ig-gene

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 北, 雄介 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1132

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 279号	学位授与年月日	平成11年 3月26日
氏名	北 雄 介		
論文題目	Prolonged cardiac allograft survival in rats systemically injected adenoviral vectors containing CTLA4Ig-gene (アデノウイルスベクターを用いた CTLA4Ig 遺伝子導入によるラッ ト移植心の生着延長効果)		

博士(医学) 北 雄 介

論文題目

Prolonged cardiac allograft survival in rats systemically injected adenoviral vectors containing CTLA4Ig-gene

(アデノウイルスベクターを用いたCTLA4Ig遺伝子導入によるラット移植心の生着延長効果)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

拒絶反応時、T細胞の活性化には、T細胞受容体を介する第一のシグナル以外に接着分子を介する第二のシグナルが必要で、とりわけB7/CD28 pathwayは重要である。CTLA4はCD28のホモログであり、活性化した細胞障害性T細胞(CTL)に発現する膜結合型蛋白で、B7に高い親和性を示すCTLA4IgはヒトCTLA4の細胞外ドメインとヒトIgG1のFc部分を結合させた可溶性の組換え融合蛋白であり、競合的にB7と結合してT細胞の活性化を抑えるため、この投与によって拒絶反応が抑制される。しかし、効果は一過性であり、反復投与が必要となる。近年、遺伝子治療の観点から効果的な遺伝子導入法が研究され、我々はアデノウイルスベクターにCTLA4Ig cDNAを組み込んだAxCAhCTLA4Ig(adCTLA4Ig)を作成し、ラット同種心移植モデルに用いたところ、一回の導入により著明な生着延長を得た。本研究ではadCTLA4Ig投与による免疫抑制効果とその作用機序について解析した。

〔方法〕

雄DAラット(RT-1^a)をドナー、Lewis(RT-1^b)をレシピエントとし、カフ法を用いて頸部異所性同種心移植を施行した。移植直後にレシピエント尾静脈より 1×10^9 plaque forming units (pfu)のadCTLA4Igを静注した(Group 2)。コントロールベクターとして β -ガラクトシダーゼ遺伝子を組み込んだAxCALacZを用いた(Group 1)。また、Lewis間の同種同系移植の無処置群をGroup 3とし、以下の事項について検討した。

(1)移植心の生着日数。(2)adCTLA4Ig投与後の血清中に遊離されたCTLA4Ig蛋白濃度の経時変化(ELISA法)。(3)ヘマトキシリン エオジン染色およびCD4とCD8、CD2とCD25の二重免疫染色による移植片への浸潤細胞の検討。(4)末梢血中リンパ球のコンカナバリンA(Con A)刺激に対する反応。経時的に末梢リンパ球を分離しCon A刺激下に2日間培養後活性化の程度をフローサイトメトリーにて解析。(5)adCTLA4Ig投与3日後のラット血清を加えた際の、DAリンパ球に対するLewis T細胞のMLR反応。(6)浸潤リンパ球のサイトカインmRNAの発現。移植後5日目に移植片を摘出し、密度勾配遠心法にて浸潤リンパ球を分離し逆転写PCR法により、IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-10のmRNA発現を検討。

〔結果〕

- (1) Group 1 (n=15)では全例5~7日で拒絶されたが、Group 2 (n=15)の中央値は27日(生着期間20~62日)であり、著明な生着延長がみられた。
- (2) 血清CTLA4Ig濃度は投与後3~7日で最高51~93 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に達し、49日以上検出された。
- (3) Group 2の組織所見では、血管周囲リンパ球浸潤の著明な抑制を認め、CD4、CD8陽性細胞、活性化リンパ球(CD2、CD25両陽性細胞)の浸潤抑制がみられた。

- (4) Con A刺激による末梢リンパ球の活性化について、Group 2はGroup 1に比較して低下しており、CD 4、CD25両陽性細胞の減少がみられた。CD 8では有意差はなかった。
- (5) adCTLA4Ig投与3日後のラット血清は、MLR反応を有意に抑制した。
- (6) 浸潤リンパ球のPCRでは、タイプ1ヘルパーT細胞(Th1)が産生するIL-2、IFN- γ は抑制され、タイプ2ヘルパーT細胞(Th2)が産生するIL-4、IL-10は抑制されなかった。

[結論]

以上の結果より、アデノウイルスベクターを用いたCTLA4Ig遺伝子導入により、血中に多量のCTLA4Igが遊離され、ラット移植心の生着を延長させることができた。そのラットの末梢リンパ球はCon A刺激による活性化が著しく低下していることが示された。作用機序としてB7/CD28のシグナル阻害とともに、Th1とTh2の相互作用においてTh2優位となった結果、Th1を抑えてCTLの活性化を抑制することも考えられた。

論文審査の結果の要旨

移植において問題となる拒絶反応を回避する最も理想的な方略は、ドナー特異的免疫抑制の導入である。このためには、拒絶反応に大きく関与するT細胞の抗原特異的免疫抑制が求められ、クローン欠失およびアネルギーの導入法が研究されている。アネルギーに関しては、T細胞の活性化に必要なT細胞受容体を介する第一のシグナルと第二のシグナルの中、第二のシグナルのみを阻害することにより誘導されることが知られている。そこで、代表的な第二シグナルを伝達するB7/CD28分子の相互作用を阻害する研究が、B7分子に高親和性を示す可溶性CTLA4Igを用いて行われている。しかし、CTLA4Igの投与による拒絶反応の抑制効果は一過性であり、反復投与が必要となる。申請者らは、近年、遺伝子治療で注目されているアデノウイルスベクターにCTLA4Ig cDNAを組み込んだAxCAhCTLA4Ig(adCTLA4Ig)を作成し、1回の静注投与で長期にCTLA4Igを発現させることを目指した。本研究では、この方法によるラット同種心移植モデルの拒絶反応抑制効果とその作用機序を検討している。

方法としては、雄DAラット(RT-1⁺)をドナー、雄Lewisラット(RT-1⁻)をレシピエントとして、カフ法により頸部異所性同種心移植を施行した。移植直後に 1×10^9 pfuのadCTLA4Igを静注した群をグループ2とした。コントロールとして β -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを投与した群をグループ1、Lewis間の同種同系移植を行った群をグループ3とした。得られた主な結果は以下の通りである。

- (1) 移植心の生着日数：コントロールベクターを投与されたグループ1では5~7日で移植心は拒絶された。これに対して、adCTLA4Igを投与されたグループ2の移植心の平均生着日数は27日と著明な生着延長が認められた。(2) 血清CTLA4Ig濃度：adCTLA4Ig投与後、3~7日で51~93 μ g/mlと最高値に達し、14日以降から減少したが、49日以上検出可能であった。(3) 組織所見：グループ1では移植3、5日で血管周囲単核細胞の浸潤を認め、免疫組織化学的にCD4、CD8陽性細胞、活性化T細胞(CD2、CD25両陽性細胞)が浸潤していることが判明した。これに対し、グループ2ではこの細胞浸潤が著明に抑制された。(4) 末梢血リンパ球のCon Aに対する反応性：グループ2ではCD4およびCD8陽性T細胞とも反応性が低下しており、グループ1に比し、顕著にCD25陽性細胞が減少していた。(5) adCTLA4Ig投与ラット血清のMLRに与える影響：adCTLA4Ig投与3日後のラット血清は、DAリンパ球のMLR反応を有意に抑制した。(6) 移植心に浸潤したリンパ球によるサイトカイン mRNAの発現：移植5日後の浸潤リ

ンパ球では、グループ2でTh1型のサイトカインIL-2、IFN- γ mRNAの発現が抑制され、Th2型のIL-4、IL-10mRNAは抑制を受けなかった。

以上の結果より、申請者は、アデノウイルスベクターにより CTLA4Ig を遺伝子導入することで、比較的長期に渡り血中に CTLA4Ig が遊離され、これによりラット移植心の生着を延長させることが可能であることを示した。さらに、その作用機序として、B7/CD28相互作用の阻害と共にTh2が優位となりTh1が抑制されることも関与する可能性を示唆した。

審査委員会では、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入法により、1回の投与で、著明に拒絶反応を抑制できた点、および CTLA4Ig による免疫抑制の機序に関して新たな知見を示した点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) ヒトのCTLA4Ig遺伝子をラットの遺伝子治療に選んだ理由
- 2) 投与するアデノウイルスベクターの量 (1×10^9 pfu) を決定した根拠は
- 3) このウイルスベクター投与でラットにヒトCTLA4Igに対する抗体はできないか
- 4) 移植前にadCTLA4Igを投与した場合の実験結果について
- 5) Ex vivoで心臓にadCTLA4Igを感染させた場合の移植の結果について
- 6) 末梢血リンパ球のアネルギーの状態をCon A刺激で検討した理由
- 7) この方法で誘導したアネルギーの抗原特異性について
- 8) 移植心に浸潤したリンパ球によるサイトカイン産生を免疫組織化学的に検討したか
- 9) この方法でTh1細胞が選択的に抑制される理由
- 10) 移植心の生着を更に延長させるための方略は
- 11) この方法に胸腺摘出を併用することは移植心の生着延長に効果があるか
- 12) 移植心に浸潤したT細胞以外の白血球の浸潤の状態はどうか
- 13) このアデノウイルスベクターの投与による肝細胞の細胞毒性は
- 14) 血中CTLA4Igが経時的に減少する主な原因は
- 15) 何故、一度導入されたアネルギーが長期に維持されず、拒絶反応が出現してくるのか
- 16) MLRに添加した血清の影響は、グループ1、2、3間で比較したか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 小出 幸夫

副査 教授 藤田 公生 副査 助教授 宮本 愛