

学 位 論 文 題 名

Persistent and Secondary Adenovirus-Mediated
Hepatic Gene Expression Using Adenovirus
Vector Containing CTLA4IgG.

(CTLA4IgG 発現アデノウイルスベクターを用いた肝臓における
アデノウイルスベクターの長期遺伝子発現およびベクター二次投与)

学位論文内容の要旨

はじめに

アデノウイルスベクターは遺伝子発現効率が高く、生体への投与が可能であるため遺伝子治療での利用が期待されているが、免疫反応を惹起するために発現期間が数週間と限られ、二次投与が困難であることがアデノウイルスベクターを臨床応用する際の問題点となっている。発現期間が数週間に限定される原因はアデノウイルス由来蛋白もしくは挿入遺伝子産物が抗原性を示すためにウイルス感染細胞が細胞障害性T細胞による排除を受けるためとされ、また、初回投与後に中和抗体が産生されることにより二次投与は無効もしくは効率が極めて低下するとされる。

今回われわれはアデノウイルスベクターに対する免疫反応を軽減する目的でCTLA4IgGを発現するアデノウイルスベクターを作成した。T細胞活性化にはT細胞レセプターが抗原提示細胞上の主要組織適合性抗原と抗原ペプチド複合体を認識する主要シグナルと補助シグナルが必要であり、主要シグナル単独ではT細胞は活性化せずアナジーに陥ることが知られている。複数の補助シグナルが存在するが、T細胞上のCD28と抗原提示細胞上のB7を介したシグナルが重要とされている。CD28のアナログであるCTLA4はB7との親和性がCD28の約20倍であり、CTLA4と免疫グロブリンFc部位の複合蛋白であるCTLA4IgGはCD28とB7による補助シグナルを阻害しT細胞を抗原特異的なアナジーに誘導可能である。可溶性CTLA4IgGを同時投与することによりアデノウイルスベクターの遺伝子発現期間を5カ月間以上に延長させることが可能であると報告されているが、この系においては少量の中和抗体が産生されるために二次投与は無効であった。

実験方法

CAGプロモーターを有するCTLA4IgG発現アデノウイルスベクター (AdexCTLA4IgG) を作製し、動物は8-10週齢の雌CBA/Jマウスを使用した。

結果

AdexCTLA4IgG 9.0×10^9 pfu をCBA/Jマウスの尾静脈から全身投与しCTLA4IgG濃度を

ELISAで測定したところ、血清中のCTLA4IgGは4日目に29.8 mg/mlと最高値を示し、以後漸減するものの90日目で5.7 mg/mlを維持していた。CTLA4IgG投与量を 9.0×10^8 pfu、 9.0×10^7 pfuとした場合の血清CTLA4IgGの最高濃度はそれぞれ35日目の6.9 mg/ml、1.2 mg/mlであり、すべてのマウスで90日後までCTLA4IgGの発現持続を観察できた。アデノウイルスベクターを静脈より全身投与した場合、主に肝臓で遺伝子発現するとされるが、肝臓切片をヒト免疫グロブリンFc部に対する免疫染色を行ないCTLA4IgGの発現を検討したところ42日目においては主に肝細胞に発現していた。コントロールとして用いたアンギオテンシン変換酵素を発現するAdexACEを投与したマウスでは肝臓に著明な炎症細胞の浸潤が見られるのに対しAdexCTLA4IgGを投与したマウスでは正常な肝構築を維持していた。AdexCTLA4IgG 1.0×10^8 pfu投与28日後にAdexCTLA4IgG 1.0×10^9 pfuを再静注したCBA/Jマウスでは血清CTLA4IgG濃度が上昇し、通常困難である二次投与の有効性が確認できた。AdexACE 1.0×10^8 pfu投与28日後にAdexCTLA4IgG 1.0×10^9 pfuを静注したコントロールのCBA/Jマウスでは血清中にCTLA4IgGを検出できなかった。抗アデノウイルス抗体・中和抗体はAdexCTLA4IgG投与マウスでは検出されなかったのに対し、AdexACE投与マウスでは著明な抗体産生を認めた。AdexCTLA4IgG自体の長期遺伝子発現と二次投与の効果を確認したのに次いでAdexCTLA4IgGが他のアデノウイルスベクターの遺伝子発現期間を延長可能であるか検討した。AdexLacZを使用し肝臓での β ガラクトシダーゼの発現期間・AdexLacZ再投与の効果を検討したところ、AdexLacZ 6.2×10^8 pfuを単独投与したマウスでは28日後には肝臓での β ガラクトシダーゼは検出されなくなったのに対し、AdexCTLA4IgG 1.0×10^8 pfuを同時投与したマウスでは70日以上に渡って β ガラクトシダーゼが検出された。AdexLacZ 6.2×10^8 pfuとAdexCTLA4IgG 1.0×10^8 pfuを同時投与した160日後の肝臓 β ガラクトシダーゼは0.05 ng/mg proteinであり、160日目にAdexLacZ 6.2×10^8 pfuを再投与した際の175日目の β ガラクトシダーゼは10 ng/mg proteinであったことより、AdexCTLA4IgGは他のアデノウイルスベクター二次投与を可能にすることが判明した。

考察

免疫調整物質がアデノウイルスによる遺伝子発現を増強する目的で使用されており、シクロスポリンとシクロフォスファミドの併用療法やFK506単独療法によりアデノウイルスベクターの遺伝子発現期間が延長することが報告されている。可溶型CTLA4IgG投与やRSV LTRプロモーターによってCTLA4IgGを発現するアデノウイルスベクターAd.RSV-muCTLA4Igによってもアデノウイルスベクターの発現期間延長が認められている。AdexCTLA4IgGもそれ自身が発現するCTLA4IgGによりCD28とB7による補助シグナルを阻害し、T細胞活性化とそれに伴う免疫反応を軽減することにより長期の遺伝子発現が可能になったと思われる。

一般的に、アデノウイルスベクターは中和抗体の産生を促進するため、その二次投与は極めて困難もしくは不能とされている。可溶型CTLA4IgGやAd.RSV-muCTLA4Igを同時投与した場合も中和抗体の産生を十分に抑制することは不可能で、アデノウイルスベクターの二次投与は困難であった。CTLA4IgGと抗CD40L抗体の併用によりアデノウイルスベクターの発現延長に加え二次投与が可能との報告があるが、AdexCTLA4IgG投与は中和抗体を含む抗アデノウイルスベクター抗体の産生を完全に抑制し、AdexLacZの回復

投与を可能にした。AdexCTLA4IgG単独でAdexLacZ反復投与を可能にした理由として、(1) 可溶型CTLA4IgG/Ad.RSV-muCTLA4Ig使用時と比較してAdexCTLA4IgG投与後の血清CTLA4IgG濃度が著しく高いこと、(2) 肝臓局所でのCTLA4IgG濃度が血清中と比較してさらに高濃度となっている可能性が高いことが考えられ、高濃度のCTLA4IgGが抗アデノウイルスベクター抗体産生を抑制している可能性が考えられた。

結語

今回われわれが作製したAdexCTLA4IgGはマウスに投与した場合、発現期間が長く再投与が可能であったばかりでなく、他のアデノウイルスベクターAdexLacZの発現期間を延長し再投与を可能にした。遺伝子治療や遺伝子実験におけるアデノウイルスベクターの問題点を解決する方策の1つとしてAdexCTLA4IgG併用が有用であると考えられる。

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 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

Persistent and Secondary Adenovirus-Mediated Hepatic Gene Expression Using Adenovirus Vector Containing CTLA4IgG.

(CTLA4IgG 発現アデノウイルスベクターを用いた肝臓における
アデノウイルスベクターの長期遺伝子発現およびベクター二次投与)

アデノウイルスベクターは遺伝子発現効率が強く、生体へ直接投与が可能であるという遺伝子治療に適した特徴を有するが、免疫反応を惹起するために発現期間が数週間と限られ、再投与が困難であることがアデノウイルスベクターを臨床応用する際の問題点となっている。発現期間が数週間に限定される原因はアデノウイルス由来蛋白もしくは挿入遺伝子産物が抗原性を示すためにウイルス感染細胞が細胞障害性T細胞による排除を受けるためとされ、また、初回投与後に中和抗体が産生されることにより再投与は無効もしくは効率が極めて低下するとされる。アデノウイルスベクターを用いて生体に遺伝子導入を行なう場合に問題となる免疫反応を十分に制御する方法は開発途上にある。ヘルパーT細胞の活性化によりこれらの免疫反応が引き起こされるが、T細胞活性化にはT細胞受容体による第1シグナルのみでは不十分であり、細胞表面分子を介した第2シグナルが共存することが必要である。CTLA4IgGは最も重要な第2シグナルとされる抗原提示細胞上のB7とT細胞上のCD28によるシグナルを遮断することにより、抗原特異的な免疫寛容を誘導可能な可溶性蛋白である。本研究はCTLA4IgGを産生するアデノウイルスベクター、AdexCTLA4IgGを作製しマウスに投与した際の遺伝子発現期間、再投与の可否、他のアデノウイルスベクターの発現に与える影響を検討し、免疫学的な解析を加えている。AdexCTLA4IgGをマウスに投与した場合、肝臓でCTLA4IgGが産生されること、血清

CTLA4IgG濃度は著明高値を示し90日間以上の長期間に渡り発現が持続すること、対照Adex投与マウスでは肝臓に著明な炎症細胞浸潤が見られたのに対しAdexCTLA4IgG投与マウスでは認められないことを明らかとした。また、アデノウイルスベクターの再投与は困難とされるがAdexCTLA4IgGは再投与可能であること、対象Adex投与マウスでは抗アデノウイルス抗体が産生されたが、AdexCTLA4IgG投与マウスでは産生されないことを認めた。さらにAdexCTLA4IgGは他のアデノウイルスベクター、AdexLacZの発現期間を延長し、再投与を可能にすることを明らかにした。これらの実験結果から、AdexCTLA4IgGはアデノウイルスベクターに対する細胞性および液性免疫反応を減弱することよりの生体投与時の遺伝子発現期間を延長し、再投与を可能にすること、臨床応用に利用できる可能性があることを考察している。そしてAdexCTLA4IgG投与時の長期遺伝子発現、再投与可能のメカニズムとして、上記免疫反応の抑制が関与している可能性が考えられると結論している。

学位論文の公開発表に際して副査の長嶋教授からAdexCTLA4IgG投与時のT細胞活性化および活性化しているT細胞の種類について、癌治療などにおけるAdexCTLA4IgGの臨床応用に関して、HVJリボソーム法など他の遺伝子導入法との比較について、副査の北畠教授からはAdexCTLA4IgGを生体投与した際の危険性、同ベクター投与による免疫寛容が副作用となる可能性とその場合の対策に関して、米国におけるアデノウイルスベクターの臨床応用の問題点・現状について質問があった。また、主査の安田教授からはAdexCTLA4IgG使用時のアデノウイルスベクター初回投与と再投与時の効果の相違、AdexCTLA4IgG投与後のアデノウイルスに対する免疫反応、臓器移植への応用の可能性について、循環器外科 宮武先生からは免疫寛容を誘導するために必要なCTLA4IgGの発現期間に関する質問があったが、申請者は実験結果に基づいて、また文献的知識を駆使して誠実かつ、概ね適切に回答し得た。

アデノウイルスベクター生体投与時の発現期間が数週間と限られることと再投与が困難なことが基礎実験・臨床応用の問題点となっているが、本研究はAdexCTLA4IgGが一つの解決策となる可能性を持つことを明らかとし、高い遺伝子発現効率と生体への直接投与可能という優れた特徴を持つアデノウイルスベクターの臨床応用へ向けての展開に重要な寄与をうるものと評価される。

審査員一同は、申請者の豊富な学識に併せて、この研究がアデノウイルスベクター生体投与の進展に与える成果を評価し、申請者が博士(医学)を受けるに十分な資格を有するものと判定した。