

博士（医学）河口義憲

学位論文題名

A Gene Therapy or Purified CTLA4IgG Treatment
of Experimental Allergic Encephalomyelitis

（実験的アレルギー性脳脊髄炎の遺伝子治療、
及び精製 CTLA4IgG による治療）

学位論文内容の要旨

【はじめに】実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）は、動物をミエリン塩基性蛋白（MBP）などで免疫して発症する中枢神経の炎症性疾患で、人の脱髓性疾患である多発性硬化症の実験モデルと考えられている。EAEは主要組織適合性抗原（MHC）クラスIIに拘束された、抗原特異的なCD4+T細胞が関与する事が知られている。T細胞の活性化には、T細胞レセプターと抗原提示細胞（APC）上のMHCに結合した抗原ペプチドとの反応を介した抗原特異的なシグナルと、T細胞上のCD28とAPC上のB7を介した、非特異的なシグナルが必要である。特に後者の補助シグナルが欠けると、免疫学的無反応や低反応を起こす事が示されている。CD28のホモログであるCTLA4は、B7に対しCD28より強い親和性を持つため、CTLA4細胞外ドメインに免疫グロブリン（IgG）のFc部を結合させた可溶性蛋白（CTLA4IgG）は、T細胞と抗原提示細胞上のCD28/B7を介したシグナル伝達を阻害し、EAEの発症を阻止する事が推測されている。これまでのEAEへのCTLA4IgGによる治療結果は、比較的短期間の観察による報告であり、CTLA4IgGのEAEへの長期的治療効果とトランス誘導の可能性を調べることと、CTLA4IgGを発現するアデノウイルスベクターの1回静脈注射による遺伝子治療の有用性を、精製CTLA4IgGの頻回投与による治療と比較検討する事が本実験の目的である。

【方法】実験動物には、ラットはEAEの神経症状が一般に単相であるため、再燃傾向が有り、より多発性硬化症に類似するSJL/Jマウスのメスを使用した。EAEはウシMBP 400 μgをCFA（フロイント完全アジュバント）と皮下注射し、百日咳トキシン400ngを2回、アジュバントとして静注して作製した。精製CTLA4IgGはCOS7細胞にCTLA4IgGを発現するアデノウイルスベクターをトランスクレクトし、得られた細胞培養上清から精製して使用した。EAEの系に、CTLA4IgG 100 μg/匹を第1から第10病日まで連続腹腔内投与の治療群（19匹）と、ヒトIgGを同様に10日間連続投与したコントロール群（10匹）とで治療効果を比較検討した。神経症状は尻尾の麻痺を臨床スケール1度、死亡を5度の5段階に分類し、4週までは毎日1回、それ以降は隔日で症状を観察し評価した。血清CTLA4IgG値はELISAで、リンパ球増殖反応は培養液中の抗原の有無による³Hサイミジンの取り込みで、血清抗MBP抗体値はELISAでそれぞれ測定した。リンパ球移入実験はCTLA4IgG治療群で未発症マウスの脾細胞と対照群発症マウスの脾細胞を3×10⁷個、新たなEAEの系の第1日目にそれぞれ腹腔内に投与した。遺伝子治療実験は、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 (Adex1 CACTLA4 IgG) を作製し、 1×10^9 PFU、EAEの系 (9匹) の第1病日に1回静注し、対照群 (9匹) と神経症状を比較観察した。

【結果】①精製CTLA4 IgG 10日間投与群の短期的効果 (第24病日) は、発症率 21% (4/19) vs 80% (8/10) ($p < 0.05$)、重症度 0.34 ± 0.80 vs 1.55 ± 1.34 ($p < 0.01$)、初発症状までの期間 21.50 ± 2.89 日 vs 13.88 ± 1.64 日 ($p < 0.001$) と有意であった。しかし長期的には第54病日で発症率 68.4% と有意差が無くなり、1エピソードの期間や再燃回数もそれぞれ 4.79 ± 3.00 vs 8.28 ± 9.01 日、 1.45 vs 2.13 回と有意差を認めなかった。②コントロール群の脾細胞を *in vitro* で MBP と培養すると著しく増殖したのに対し、治療群の脾細胞では増殖が抑制される傾向が観られた。③抗MBP抗体の推移を IgG1 と IgG2a のアイソタイプで見ると、初期にはコントロール群で G1 が優位で次第に G1 と G2a の偏位が無くなる傾向が観られたのに対し、治療群では G1 と G2a では著明な偏位は見られなかった。④57日目で抗原を再投与し抵抗性を観たが、治療群の未発症 6匹から 2匹、コントロール群未発症の 2匹から 1匹新たに発症し有意差はみられなかった。⑤77日めに治療群未発症マウスの脾細胞を 3×10^7 、対照群発症マウスの脾細胞も同様に、新たなEAEの系の第1日目に腹腔内投与して、調節性細胞の有無を観たが、経過に有意差は得られなかった。⑥頻回投与治療の効果に対し、CTLA4 IgG 発現アデノウイルスベクターの1回静注投与の効果は、観察した8ヶ月に及び、対照群で 100% (9/9) の発症率に対し、治療群 11.1% (1/9) と有意に抑制された ($p < 0.001$)。治療群の未発症 8匹は第40病日でも血清 CTLA4 IgG 値は平均 $5.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ と高値で 8か月検出可能であったのに対し、40日目に発症した1匹は、この時点で血中に CTLA4 IgG は検出されなかった。

【考察】ラットやマウスのEAEではCTLA4 IgGの投与で、発症までの期間、重症度、発症率が改善されたという報告がある。しかし、これらは比較的短期間の観察であり、ヒト多発性硬化症を考える場合、再燃抑制など長期的な効果が重要と考えられる。SJLマウスはEAEの症状が慢性、再燃化傾向にあり、より多発性硬化症に近いと思われ、CTLA4 IgGの長期的効果を検討した。結果は、精製CTLA4 IgGの10回連日投与は、短期間では有意差をもって、発症率、重症度を抑えたが、この効果は長期には持続しない事が判明した。EAEはTh1タイプのT細胞の関与が考えられており、症状の推移により Th1 から Th2 へと偏位するという報告もあるが、血中抗MBP抗体のアイソタイプの推移からは、報告とは一致せず、詳細は局所でのサイトカインの検索が必要と思われた。抗原を再チャレンジして抗原に対する抵抗性を調べたが、新たな発症率は変わらず、明らかな抵抗性は確認できなかったが、治療群では重症度は軽快している傾向にあった。調節性細胞の関与を調べるため、抗原再投与でも発症しなかった治療群のマウスの脾細胞をEAEの系にトランスファーしたが、臨床経過は対照群と差がなかった。投与した細胞の種類、投与時期、投与方法にも検討の余地があると思われた。結局精製CTLA4 IgG 頻回投与の効果は短期的であり、作用機序の詳細は不明だが、主な作用は抵抗性の誘導ではなく、特異的免疫反応の一時的抑制が主体と思われた。最近脳内に直接アデノウイルスベクターを注射した報告があったが、我々の、アデノウイルスベクター1回静脈内投与による遺伝子治療は、CTLA4 IgG の血中濃度が長期間維持され、EAEの長期的抑制に有効であると思われた。

【結語】①導入期のCTLA4 IgGによる治療はEAEを抑制するが、その効果は短期的である。②その作用の主体は、特異的免疫反応の一時的抑制と思われた。③CTLA4 IgG 濃度を長期的に維持するためには、頻回投与より、CTLA4 IgG 発現ウイルスベクターを用いた遺伝子治療が、方法的にも有利と思われた。

学位論文審査の要旨

主査教授 上出利光

副査教授 吉木敬

副査教授 小野江和則

学位論文題名

A Gene Therapy or Purified CTLA4IgG Treatment of Experimental Allergic Encephalomyelitis

(実験的アレルギー性脳脊髄炎の遺伝子治療、

及び精製 CTLA4IgG による治療)

多発性硬化症の実験モデルと考えられている実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) には、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラスIIに拘束された、抗原特異的な CD4+T 細胞が関与する事が知られている。T 細胞上の CD28 の同類体である CTLA4 は、抗原提示細胞上の B7 に対し CD28 より強い親和性を持ち、CTLA4 細胞外ドメインに免疫グロブリン (IgG) のFc部を結合させた可溶性蛋白 (CTLA4IgG) は、CD28/B7 を介した補助シグナル伝達を阻害し EAE の発症を阻止する事が推測されている。CTLA4IgG の EAE への長期的効果を検討し、CTLA4IgG 発現アデノウイルスベクター (Adex1CACTLA4IgG) の 1 回静脈内注射による遺伝子治療の有用性を、精製 CTLA4IgG の頻回投与による治療と比較検討するため本実験を行った。メスの SJL/J マウスにウシMBP 400 μg を CFA (フロイント完全アジュバント) と皮下注射して EAE を誘導し、Adex1CACTLA4IgG を COS7 細胞にトランスフェクトして得られた CTLA4IgG を、1 回 100 μg / 四第 1 病日から連続 10 日間腹腔内投与した治療群 (19 四) と、対照としてヒト IgG を同様に 10 日間連続投与したコントロール群 (10 四) とで治療効果を比較検討した。神経症状を 5 段階のスケールに分類し毎日症状を観察し、血清 CTLA4IgG 値、リンパ球増殖反応、血清抗 MBP 抗体価も測定し検討した。結果は ① 治療群の第 2-4 病日までの成績は、発症率 21% (4/19) vs 80% (8/10) (p < 0.05)、重症度 0.34 ± 0.80 vs 1.55 ± 1.34 (p < 0.01) と有意であった。しかし長期的には第 5-4 病日で発症率 68.4% vs 80% と有意差が無くなった。② コントロール群の脾細胞を MBP と培養すると著しく増殖したのに対し、治療群の脾細胞では増殖が抑制される傾向が観られた。③ 抗 MBP 抗体の推移を IgG1 と IgG2a のアイソタイプで見ると、コントロール群で G1 が優位なのに対し、治療群では G2a が優位な傾向がみられた。④ 更に 5-7 日目で抗原を再投与し抵抗性の獲得を調べたが、発症率に有意差は認められなかった。⑤ 7-7 日目に未発症治療群マウスの脾細胞と対照群発症マウスの脾細胞を 3×10^7 個、新たな EAE の系の第 1 病日にそれぞれ腹腔内に投与した移入実験では、臨床経過は対照群と有意差は

なく調節性細胞の関与は確認できなかった。⑥作製した Adex1 CACTLA4 IgG を遺伝子治療として 1×10^9 PFU、EAE の系（9匹）の第1病日に1回静注し対照群（9匹）と神経症状を比較観察した。精製 CTLA4 IgG の頻回投与治療の効果に対し、遺伝子治療群では、8ヶ月間の観察で対照群 100% (9/9) の発症率に対し、11.1% (1/9) と有意に抑制された ($p < 0.001$)。治療群の未発症 8 匹は第 40 病日でも血清 CTLA4 IgG 値は平均 $52 \mu\text{g}/\text{ml}$ と高値で長期間血中に検出可能であった。

今までラットやマウスの EAE では CTLA4 IgG の投与で、比較的短期間の観察で発症率、重症度が改善されたという報告がある。しかし多発性硬化症を考える場合には長期的な効果が重要と考えられ、今回再燃傾向のあるメスの SJL/J マウスを使用し CTLA4 IgG の長期的効果を検討した。結局精製 CTLA4 IgG 頻回投与の効果は短期的であり、調節性細胞の関与も確認できず、主な作用は抵抗性の誘導ではなく、特異的免疫反応の一時的抑制が主体と思われた。一方、アデノウイルスベクター 1 回静脈内投与による遺伝子治療は、CTLA4 IgG の血中濃度が長期間維持され、EAE の長期的抑制に有効であり、方法論的にも有利で、他の自己免疫性疾患への応用の可能性が示唆された。

学位論文の公開発表に際し、吉木教授から当実験で用いた遺伝子治療の方法論としての可能性、臨床応用への展望について、次いで小野江教授から、増殖反応の抗原特異的な抑制の有無、抗原としての蛋白とペプチドの差、副腎ホルモンの影響について、最後に上出教授から、Th1/Th2 バランスに与える効果が予測と異なるデータが出た事の機序についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は未発表データや他の文献を引用し、臨床的経験などから推測される結果を明確に回答した。

この論文は、CTLA4 IgG による EAE 治療を長期的に分析し、EAE に、初めて全身性に遺伝子治療を試みた点で高く評価され、今後自己免疫疾患の遺伝子治療として、臨床応用の可能性が非常に期待される。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充分な資格を有するものと判定した。