

学位論文題名

Long-term acceptance of allografts by  
in vivo gene transfer of regulatable adenovirus  
vector containing CTLA4IgG and Lox P

(Cre/LoxP システムを用いた発現調節可能な  
アデノウイルスベクターによる同種移植片長期生着を目指した、  
CTLA4IgG 遺伝子療法)

学位論文内容の要旨

1. 研究背景と目的

臓器移植における免疫抑制療法の最終目標は、抗原特異的な免疫寛容状態の導入・維持である。拒絶反応の主体はT細胞による移植抗原の認識・T細胞の活性化及び増殖とこれに引き続くT細胞による組織破壊という一連のメカニズムである。このT細胞の活性化が起こるためには、抗原提示細胞上の主要組織適合遺伝子複合体とT細胞上のT細胞受容体・CD3複合体を介する主シグナルの他に補助シグナルが必要である。補助シグナルが存在しない状態で抗原刺激がT細胞に入ると、T細胞は分裂・増殖の出来ない抗原特異的不応答状態に陥る。CTLA4IgGはこの補助シグナルを強力に遮断することにより抗原特異的なT細胞依存性の反応を抑制する蛋白である。これをアデノウイルスベクターに組み込んだAdex-1CACTLA4IgG (以下Ax-CT) をマウスに投与することにより血清中CTLA4IgG濃度が長期間高値を維持し、免疫寛容を導入することは既に知られている。しかし長期間にわたるCTLA4IgG発現は、この期間、細菌やウイルス等の移植抗原以外の抗原に対しても免疫寛容を導入されてしまい、非特異性免疫抑制状態となる事を意味している。このため今後の臨床応用には、人為的にCTLA4IgG発現を停止可能な系が必要不可欠であった。そこで今回Cre/LoxPシステムを用いてCTLA4IgG発現を任意に停止しうる系を作製し、各種移植モデルにおける有効性の検討を行った。

2. 方法と結果

1) ウイルスベクターの作製：Cre/LoxPシステムは、2つのLoxP配列間に挿入された遺伝子が、Cre酵素がLoxP配列に作用することにより自動的組み換えを起こし脱落するシステムである。このCre酵素をアデノウイルスベクターに組み込んでCre酵素を発現させるようにしたウイルスベクターがAdex-1CACRE (以下Ax-Cre) である。我々はCTLA4IgG遺伝子を2つのLoxP間に挿入してアデノウイルスベクターに組み込んだAdex-1CALoxCTLA4IgGLox (以下Ax-LCTL) を作製した。

2) ウイルス由来CTLA4IgG蛋白の確認：in vitroおよびin vivoにてAx-LCTLが産生したCTLA4IgG分子は精製CTLA4IgG蛋白と同じ大きさであることをSDS-PAGEにて確認した。さらにB7を形質導入されたCHO細胞を用いたフローサイトメトリー解析にて

Ax-LCTLの産生したCTLA4IgG分子が正常にB7に結合する事を確認した。以上のことよりLoxPに挟まれたCTLA4IgG分子も正常に発現すると考えられた。

3) *in vivo*におけるCTLA4IgG発現停止の確認：8週令C57BL/6マウスの尾静脈より $4 \times 10^7$ PFU及び $4 \times 10^8$ PFUのAx-LCTLを注入し血清中CTLA4IgG濃度の推移をELISA法にて測定した。投与後1週目の血清中CTLA4IgG濃度は $4 \times 10^7$ PFU群で2mg/ml、 $4 \times 10^8$ PFU群では10mg/mlと高値を示し、いずれも投与後18週以上にわたってCTLA4IgGの発現を認め、LoxPを持たないAx-CT投与時と同様に長期間にわたり血清中にCTLA4IgGが発現することを確認した。また、 $1 \times 10^7$ PFUのAx-LCTLを投与後8週目にMOI (Ax-LCTLに対するAx-Cre量の比)を0・10・50・100としてAx-Creを投与した群を作製した。いずれの群も投与後8週目には40-50 $\mu$ g/mlの血清中CTLA4IgG濃度を示していたが、Ax-Creを投与しなかったコントロール群ではAx-LCTL投与後12週目で平均25 $\mu$ g/mlの血清中CTLA4IgG濃度を示していたのに対し、MOI=100でAx-Creを投与した群ではAx-Cre投与後3週間以内に血清中CTLA4IgGの発現が消失した。また、MOI=10・50の群においても、Ax-Cre投与後3-4週で血清中CTLA4IgGはほぼ検出不能になった。これに対し、loxPを持たないCTLA4IgG発現アデノウイルスベクターであるAx-CTを最初に投与した群では、MOI=50でAx-Creを投与した群およびAx-Creを投与しなかった群間において有意な血中濃度の変化を認めず、Ax-Cre投与による血清中CTLA4IgG発現の消失はAx-LCTLに特有であることが確認できた。

#### 4) 移植モデルへの応用

i) 膵島移植：マウス allograft (BALB/c $\rightarrow$ C57BL/6)を用いた。200mg/kgのstreptozotocinを移植7日前に投与し、血糖値が20mmol/L以上になったことを確認の上、0日目に経門脈的に750個の膵島を移植し、 $1 \times 10^7$ PFUのAx-LCTLを尾静脈より注入、8日目に $2 \times 10^8$ PFU (MOI=20)のAx-Creを同様に投与して血糖値及び血清中CTLA4IgG濃度の推移について観察した。移植後16mmol/Lまで血糖が再上昇したものを拒絶と判定した。無治療群および対照ウイルス(Ax-LacZ)投与群ではいずれも移植後7-11日で拒絶されたが、これに対し、Ax-LCTL投与群(83.0 $\pm$ 40.4)およびAx-LCTL+Ax-Cre投与群( $\geq 92 \pm 3.6$ )では有意に移植片の生着延長を認めた。

ii) 皮膚移植：マウス allograft (C57BL/6 $\rightarrow$ CD40L K/O)を用いた。移植当日に $1 \times 10^8$ PFUのAx-LCTLを尾静脈より投与し、3週目に $3 \times 10^8$ PFU (MOI=30)のAx-Creを同様に投与して移植片の生着状態及び血清中CTLA4IgG濃度の推移について観察した。対照ウイルス(Ax-LacZ)投与群(Group I)では移植片はいずれも8-10日で拒絶されたが、Ax-LCTL+Ax-LacZ (Group II)投与群及びAx-LCTL+Ax-Cre投与群(Group III)ではいずれも70日以上移植片生着を確認した。

5) CTLA4IgG発現停止後の抗アデノウイルス抗体価：皮膚移植実験モデルにおける血清検体を用いて血清中抗アデノウイルス抗体価をELISA法にて測定した。Group IIではAx-LacZ投与後も抗体価の上昇を認めなかったが、Group IIIではAx-Cre投与後半数以上の個体において抗体価の上昇を認め、移植片に対しては特異的免疫寛容を獲得しているが、アデノウイルスに対する免疫応答は回復していると考えられた。

6) KLHに対する免疫応答：皮膚移植実験モデルのマウスを用いて、移植後4日目にKLHで免疫し、移植後4週目にKLHで再免疫したものにつき、移植後5週目及び7週目の血清検体を用いて抗KLHIgG抗体価をELISA法にて測定した。移植後7週目においてGroup I及びGroup IIIでは有意に抗KLHIgG抗体価の上昇を認めたがGroup IIでは有意な変化を認めなかった。

### 3. 考察

Ax-LCTLはCTLA4IgGを正常に発現し、この発現はAx-Creにより停止した。CTLA4IgG発現停止後も移植臓器に対しては特異的免疫寛容が導入されていたが、アデノウイルスに対する免疫応答反応は回復していた。このシステムを用いることによりAx-LCTLにおいてはCTLA4IgGの発現制御、すなわち移植臓器に対する免疫寛容導入後は不必要な遺伝子発現を停止することが可能であり、今後の臨床応用に向けて有意義であると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

## Long-term acceptance of allografts by in vivo gene transfer of regulatable adenovirus vector containing CTLA4IgG and Lox P

(Cre/LoxP システムを用いた発現調節可能な  
アデノウイルスベクターによる同種移植片長期生着を目指した、  
CTLA4IgG 遺伝子療法)

臓器移植における拒絶反応の主体はT細胞の活性化に基づくものであるが、この活性化には主シグナルの他に補助シグナルが必要である。CTLA4IgGはこの補助シグナルを強力にブロックすることにより抗原特異的不応答状態を誘導し、抗原特異的な免疫寛容を導入する蛋白である。CTLA4IgG蛋白の投与による移植片長期生着は既に知られているが、これをアデノウイルスベクターに組み込んだAdex-1CACTLA4IgG (Ax-CT) は、投与により長期間高濃度のCTLA4IgGを発現するためコストパフォーマンスに優れている反面、発現中は移植抗原以外の抗原に対しても免疫寛容を導入してしまうという問題点があった。申請者はこの問題点を解決すべく、Cre/LoxPシステムを用いてCTLA4IgG発現を任意に停止しうる系を作製し、各種移植モデルにおける有効性を検討した。2つのLoxP配列間に挿入された遺伝子が、Cre酵素がLoxP配列に作用することにより自動的組み換えを起こし脱落するCre/LoxPシステムを用いてLoxP間にCTLA4IgG遺伝子を挿入したアデノウイルスベクター、Adex-1CALoxCTLA4IgGlox (Ax-LCTL) を作製し、このウイルスベクターの産生するCTLA4IgG分子が正常であることをSDS-PAGE及びフローサイトメトリー解析を用いて確認後、マウスへの静脈内投与においてAx-CTと同等の発現量・発現期間を持つことを実証した。その上で、マウス静脈内投与において、Cre酵素を発現するアデノウイルスベクターであるAx-Creを投与することによってCTLA4IgGの発現が停止することを確認した。この発現停止はPCR解析により、遺伝子レベルで起こっていることを確認した。Ax-LCTLをマウスアロ膵島移植モデル及びマウスアロ皮膚移植モデルに用いてグラフトサバイバルを検討したところ、いずれも有意な生着延長を認め、かつAx-Cre投与後も拒絶反応は起こらなかった。更にAx-LCTL投与後の抗アデノウイルス抗体及び外来蛋白であるKLHを感作させ

た時の抗KLH抗体の産生量についてELISA法を用いて測定し、移植片生着後はベクターと  
なっていたアデノウイルスおよび外来蛋白抗原に対する免疫応答反応は回復していること  
を確認した。以上のことからAx-LCTLの投与によりCTLA4IgGの発現制御、すなわち移植  
臓器に対する免疫寛容導入後は不必要となる遺伝子発現を停止することが可能であり、今  
後の臨床応用にむけて有意義であると考えられた。

審査にあたって、藤堂教授から大動物実験モデルにおける発現停止の意義、また、臨床  
応用に向けてドナー感染症の有無など適応ケースの選択についての質問があった。申請者  
は遺伝子導入実験についての文献や自身のデータを用いて、今後のベクター開発の進展  
で、大動物においてもより長期間発現する場合に不可欠になってくるシステムであること、  
臨床応用に向けてはドナーの感染症や寛容導入期の感染症などの検討がこれから必要であ  
ることなどを回答した。次いで上出教授より移植片生着後に発現を停止することにより移  
植片以外の抗原に対する反応回復の理由、今後のベクターについての質問があった。申請  
者は免疫応答や遺伝子治療に関する文献及び自身のデータを用いて、パッセンジャーロ  
イコサイトの消失が移植片生着に関与しているのではないかと考えられること、今後は抗  
原性の低いアデノウイルスが開発されるのが一番臨床応用に有用と考えることなどを回答  
した。最後に小柳より遺伝子発現の普遍性についての質問があった。申請者は遺伝子導入  
実験についての文献や自身のデータを用いて、中和抗体が既存する例では遺伝子発現が  
見られない場合があり、本実験においてはそれらの個体は除外した旨を回答した。

この論文は独創的で、移植遺伝子治療において発現遺伝子を途中で消失可能な初めての  
系であり、今後の更なる応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。