



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Nonviral Gene Gun-Mediated CTLA4-Ig Gene Transfer for Modification of Donor Organs(内容の要旨(Summary))
Author(s)	梅田, 幸生
Report No.(Doctoral Degree)	博士 (医学) 甲 第466号
Issue Date	2001-03-24
Type	博士論文
Version	
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/14665

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名 (本籍)	梅田幸生 (岐阜県)		
学位の種類	博士 (医学)		
学位授与番号	甲第 466 号		
学位授与日付	平成 13 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	Nonviral Gene Gun-Mediated CTLA4-Ig Gene Transfer for Modification of Donor Organs		
審査委員	(主査) 教授 廣 瀬 一		
	(副査) 教授 高 見 剛	教授 近 藤 直 実	

論文内容の要旨

背景と目的

臓器移植においてドナー抗原に特異的な免疫寛容を誘導するためには、T細胞の活性化に必須の副刺激シグナルを阻害することが重要である。なかでもT細胞上のCD28と抗原提示細胞上のB7を介する副刺激経路は最も重要であり、免疫応答修飾の標的として注目されている。一方、CD28と同様にB7をリガンドとする cytotoxic T lymphocyte associated molecule-4 (CTLA4) が活性化T細胞上に発現し、T細胞の活性化に対し抑制的に作用しており、さらにそのB7に対する親和性はCD28の20倍以上と非常に高いことが知られている。これらを背景として、移植臓器に対する免疫寛容誘導を目的として、CTLA4とヒト免疫グロブリンのキメラ分子であるCTLA4-Igを用いたB7/CD28経路の競合的阻害が試みられてきた。しかしながらその研究の多くはCTLA4-Ig分子あるいはその遺伝子をレシピエントに全身性に投与するかたちで行われており、臨床応用にあたっては、これまでの免疫抑制剤と同様に全身性の非特異的免疫抑制が懸念される。そこで本研究は移植臓器に対しCTLA4-Ig遺伝子を導入し、ドナー臓器自身にCTLA4-Igを分泌させることで移植局所における免疫寛容が誘導できるか否かを検討した。また本研究ではウイルスベクターに関連した副作用を回避し、さらに十分な遺伝子導入効率を実現するために、遺伝子導入に際してin vivoで使用可能な遺伝子銃を用い、その有効性を検討した。

材料と方法

非ウイルス性DNAベクターの構築 マウスCTLA4 cDNAであるF41F4よりPCR法を用いてマウスCTLA4の細胞外領域遺伝子を増幅し、ヒト免疫グロブリン (IgG1) の定常領域遺伝子を含むpBluescriptベクター内へ挿入し、CTLA4-Ig融合遺伝子を構築した。さらにこの構築よりCTLA4-Ig遺伝子を含むXho I / Not I 断片を得た。一方でCMVエンハンサーとチキン・ベータアクチンプロモーターを有するpCAGGSベクターのEcoRIサイトにoligo-linker DNAを挿入し修飾した。修飾したpCAGGSベクター内のXho I / Not I サイトにCTLA4-Ig遺伝子を含むXho I / Not I 断片を挿入し、最終的な発現ベクターとしてpCAGGS/CTLA4-Igを得た。また同様の方法にてCTLA4の細胞外領域遺伝子の末端にEGFP遺伝子を有するpCAGGS/CTLA4-EGFPと、CTLA4細胞外領域遺伝子の代わりに2B4マウスのTCR α 鎖を有するpCAGGS/2B4TCR α -Igを作製した。構築したベクターをin vitroにてCOS-7細胞へ導入し、pCAGGS/CTLA4-IgおよびpCAGGS/2B4TCR α -Igについては抗ヒト免疫グロブリン抗体を用いたウェスタンブロットング法により、またpCAGGS/CTLA4-EGFPについては蛍光顕微鏡を用いて、それぞれの発現を確認した。

In vivoにおける遺伝子銃を用いた遺伝子導入 構築した非ウイルス性ベクターは、遺伝子銃 (BioRad Laboratories, Hercules, CA) を用いたパーティクルデリバリー法によりin vivoでマウス組織に対して導入を行った。BALB/cマウスの皮膚 (表皮側, 真皮側), 筋組織, および肝臓に対してpCAGGS/CTLA4-EGFPを射入し、蛍光顕微鏡下でEGFP発現を観察することで、遺伝子銃による遺伝子導入の有効性を検討した。遺伝子銃による遺伝子導入は、金粒子1mgあたり5 μ gのDNAをコーティングし、ヘリウム圧力400psiでの射入とした。

皮膚移植 遺伝子銃によりpCAGGS/CTLA4-Igを導入したBALB/cマウス皮膚を同種皮膚グラフトとして、Billinghamらの方法によりC57BL/6マウスに移植した。pCAGGS/2B4TCR-Igを導入したBALB/cマウス皮膚グラフト移植群を対照とした。またpCAGGS/CTLA4-EGFPを導入したBALB/c皮膚グラフトの純系移植を行い、グラフトにおけるEGFP発現を蛍光顕微鏡にて観察した。

結果

(1) 真皮側からの遺伝子導入では、EGFPの発現はほとんど認められなかった。

- (2) 表皮側からの遺伝子導入では、金粒子の射入中心部に射入に起因すると思われる組織損傷が認められた。
- (3) 表皮側からの遺伝子導入では、射入周囲部の表皮において非常に強いEGFPの発現が導入後1日目から約1週間にわたって認められた。
- (4) 表皮側からのCTLA4-EGFP遺伝子導入によるEGFP発現パターンや発現期間は、純系移植による影響を受けなかった。
- (5) CTLA4-Ig遺伝子導入同種皮膚グラフトの生着延長は認められなかった。
(CTLA4-Ig導入群：MST±SD=10.8±0.9, 2B4TCR α -Ig導入群：MST±SD=9.8±0.4)
- (6) 筋組織におけるEGFP発現は導入後5日目に認められ、約1週間継続した。
- (7) 肝臓に対する遺伝子導入においては、表皮側からの遺伝子導入で認められたような組織損傷はほとんどなく、導入後1日目から非常に良好なEGFPの発現が認められた。
- (8) 肝臓に対する遺伝子導入においては、最長5週間にわたって安定したEGFPの発現が認められた。
- (9) 遺伝子導入を行った皮膚、筋組織、肝臓の射入部以外での遺伝子発現は認められなかった。

考察

免疫抑制剤を使用する移植症例において遺伝子操作を行う場合、これまでに報告されたレトロウイルスベクターによる導入遺伝子の子孫へ伝播は不都合であり、またアデノウイルスベクターに起因する劇症型の肝障害などの感染性ウイルスベクターに起因する副作用は致命的である。そこで本研究ではウイルスベクターを使用しない、遺伝子銃を用いたパーティクルデリバリー法による遺伝子導入の有効性を検討した。その結果、真皮への導入では皮下脂肪層に金粒子がトラップされ、EGFPの発現はほとんど確認されなかったものの、表皮への導入では導入後1日目から良好なEGFPの発現が確認された。またCTLA4-EGFP遺伝子を導入した皮膚グラフトの純系移植の結果、EGFPの発現パターンや発現期間は移植操作による影響を受けないことが確認された。本研究ではこのような遺伝子銃による良好な遺伝子発現を背景として、マウス皮膚にCTLA4-Ig遺伝子を導入し同種移植を行い、移植局所で分泌させることにより抗原特異的な免疫寛容誘導を試みた。しかしながら、CTLA4-Ig遺伝子導入皮膚グラフトの生着延長は得られなかった。これまでも皮膚移植におけるCTLA4-Igの有効性の報告はなく、その原因として皮膚特異的な抗原性が挙げられているが、これに加えて本研究において皮膚グラフトの生着が得られなかった原因として、遺伝子を射入した際の組織損傷にともなう炎症反応の関与も考えられた。

一方、筋組織や肝臓への遺伝子導入では組織損傷を生じることなく、十分な遺伝子発現が認められた。とくに肝臓においては導入後1日目からEGFPの高発現を確認しており、さらに発現期間も最長5週間と、肝指向性とされるアデノウイルスベクターに匹敵するものであった。このことからCTLA4-Ig導入心臓グラフトあるいは肝臓グラフトの同種移植における有効性が期待される。

本研究における遺伝子発現は遺伝子射入部に局限しており、射入遠隔域あるいは他組織における遺伝子発現は全く認められなかったことから、遺伝子銃を用いた遺伝子導入が標的組織射入部に極めて選択的に進めることが明らかとなった。

結論

マウス皮膚、筋組織、および肝臓に対し、ウイルスベクターを用いることなく遺伝子銃により遺伝子導入を行い、射入部位に局限した良好な遺伝子発現を確認した。CTLA4-Ig遺伝子導入皮膚グラフトの同種移植における生着延長は認められなかったものの、遺伝子銃による遺伝子導入およびその発現が移植操作により影響を受けないことが遺伝子導入グラフトの純系移植により確認された。

論文審査の結果の要旨

申請者 梅田幸生は、遺伝子銃を用いてin vivoで組織に対し遺伝子導入を行い、ウイルスベクターを使用することなく導入局所限局性に十分な遺伝子発現を得られることを確認し、またその遺伝子発現が移植による影響を受けないことを明らかにした。

本研究は移植外科学、とくに移植免疫学領域での遺伝子操作の可能性を広げ、その領域の進歩に寄与するところが大であると認められた。

[主論文公表誌]

Nonviral Gene Gun-Mediated CTLA4-Ig Gene Transfer for Modification of Donor Organs
Transplantation Proceedings, 33, 243~245 平成13年3月発行予定