The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Ex vivo and systemic transfer of adenovirus-mediated CTLA4Ig gene combined with a short course of FK506 therapy prolongs islet graft survival
Author(s)	赤丸, 祐介
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43957
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【13】

氏　　名	赤　丸　祐　介（あか まる ゆう すけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　17324　号
学位授与年月日	平成14年10月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学　位　論　文　名	Ex vivo and systemic transfer of adenovirus-mediated CTLA4Ig gene combined with a short course of FK506 therapy prolongs islet graft survival （アデノウイルスベクターを用いたグラフトならびにレシピエントへのCTLA4Ig遺伝子導入による移植膵島の生着延長効果に関する研究）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　松田　暉 （副査） 教　授　門田　守人　　教　授　宮坂　昌之

論　文　内　容　の　要　旨

［目的］

膵島移植はI型糖尿病の有効な治療法として期待されているが、他の実質臓器の移植と比較して拒絶反応により破壊されやすく、免疫寛容導入が困難であることが知られている。一方 CTLA4Ig は Co-stimu-latory signal である CD28-B7 結合を拮抗的に阻害し、アデノウイルスベクターによる CTLA4Ig 遺伝子導入は心、肝、膵臓移植実験においてアログラフトが長期生着し、免疫寛容が誘導されるという報告がある。

そこで本研究では、膵島移植モデルにおいて、アデノウイルスベクターを用いて CTLA4Ig 遺伝子をグラフトならびにレシピエントに導入し、移植膵島の生着延長効果およびドナー抗原特異的な免疫寛容誘導の可能性を検討した。

［方法］

1．遺伝子導入法の確立：ウイルスゲノムからウイルスの増殖に必須な E1A.E1B 遺伝子を欠損させ、その領域にヒト CTLA4Ig 遺伝子を挿入した組換えアデノウイルスベクターを使用した。膵島グラフトへの *ex vivo* での導入は分離した膵島にアデノウイルスベクターを MOI：2、37℃の条件で1時間培養し感染させた。蛋白の発現は ELISA 法および免疫化学組織染色にて検討した。レシピエントへの *systemic* な遺伝子導入はアデノウイルス 2×10^9 PFU を経静脈的に投与し施行した。経時的な血清中 CTLA4Ig 濃度を ELISA 法で測定し、また各臓器での蛋白の発現を免疫化学組織染色にて検討した。

2．移植モデル：ドナーを BN(RT1^n)ラット、レシピエントをストレプトゾトシン投与により高血糖を誘導した LEW(RT1^l)ラットとした。*ex vivo* で CTLA4Ig 遺伝子を導入した膵島をレシピエントの腎被膜下へ移植した。*systemic* な遺伝子導入は膵島を腎被膜下あるいは門脈から肝内へ移植した直後にレシピエントにアデノウイルスベクターを経静脈的に投与した。また、FK506 との併用効果を検討するため、FK506 を移植前日、当日、翌日に 1 mg/kg 筋肉内投与した。膵島移植後は血糖を随時測定し、200 mg/dl 以上2日間連続した時点で移植グラフトは拒絶されたと判定した。実験群を control 群、FK506 単独群、*ex vivo* ならびに *systemic* 遺伝子導入群、遺伝子導入＋FK506

併用群の６群に分類し検討した。また臓器特異性を検討するために *systemic* な CTLA4Ig 遺伝子導入の効果を腹部異所性心移植モデルにおいても検討した。

３．Second islet graft challenge：長期生着したレシピエントに対し、再度同系（BN ラット）ドナーの膵島を移植し、免疫寛容誘導の有無を検討した。

［結果］

１．CTLA4Ig 発現：*ex vivo* での CTLA4Ig 遺伝子導入では、CTLA4Ig 蛋白の発現が膵島細胞内で確認された。*systemic* な導入では CTLA4Ig 蛋白は肝内類洞上皮細胞で確認され、血中濃度は導入後４日後に最高値（平均 794 μg/dl）に達し、その後漸減したが約 100 日後においても検出された（平均 82 μg/dl）。

２．移植成績：*ex vivo* で CTLA4Ig を遺伝子導入し腎被膜下へ移植された膵島は 8.6±1.3 日と、無処置群の 6.7±1.2 日と比較して若干の生着延長を認めた。さらに、FK506 短期間投与を併用することで 32.6±10.7 日まで延長した。また、*systemic* に導入されたレシピエントでは、腎被膜下の移植膵島は 15.2±3.3 日と延長し、さらに FK506 投与を併用することにより、全例 100 日以上生着した。肝内への移植でもほぼ同様の成績であった。

一方、心移植モデルにおいては *systemic* な CTLA4Ig 遺伝子導入単独で 100 日以上の生着を得た。

３．Second islet graft の移植成績：最初の移植が膵島移植の場合は膵島２次グラフトは全例が 17 日以内に拒絶されたが、最初の移植が心移植の場合は６例中３例で 100 日以上生着した。

［総括］

１．*ex vivo* で CTLA4Ig 遺伝子を導入した膵島グラフトは、FK506 と併用すると有意に生着が延長したが、長期生着は得られなかった。

２．*systemic* に CTLA4Ig 遺伝子をレシピエントに導入すると、膵島グラフトは有意に生着が延長し、さらに FK506 と組み合わせることにより全例 100 日以上の生着が得られた。

３．膵島移植モデルでは心移植モデルと異なり免疫寛容が誘導されなかった。

４．膵島移植においてアデノウイルスベクターを用いた CTLA4Ig 遺伝子導入は有効な治療法と考えられた。

論文審査の結果の要旨

Co-stimulatory signal である CD28-B7 結合を遮断し T 細胞の活性化を抑制する CTLA4Ig が拒絶反応を制御する報告がみられる。今研究では膵島移植モデルにおいて、アデノウイルスベクターを介して CTLA4Ig 遺伝子をグラフトならびにレシピエントに導入し、さらに周術期に短期間の FK506 を併用することにより、移植グラフト生着延長効果を検討した。高血糖を誘発した LEW ラットをレシピエント、BN ラットをドナーとし、2000 個の膵島を腎皮膜下へ移植した。*ex vivo* で膵島に CTLA4Ig 遺伝子を導入すると、移植膵島は無処置群 6.7±1.2 日と比較して、8.6±1.3 日と若干の延長効果を認めた。さらに、FK506 を併用することにより 32.6±10.7 日と、FK506 単独投与群 13.7±1.0 日に対して有意に生着期間は延長した。一方、膵島移植直後に Ad.CTLA4Ig 2×10^9 PFU をレシピエントに静脈内投与し、systemic に CTLA4Ig 遺伝子を導入すると、生着期間は 15.2±3.3 日と無処置群と比較して有意に延長し、さらに FK506 と併用すると全例 100 日以上生着した。膵島移植モデルにおいて、グラフトおよびレシピエントへの CTLA4Ig 遺伝子導入は効果的であり、さらに FK506 投与と組み合わせることにより、相乗的な生着延長効果を認めた。有効な治療法となりうる可能性が示唆された研究であり、学位に値すると考える。