

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：	基盤研究(B)
研究期間：	2006 ~ 2009
課題番号：	18390440
研究課題名(和文)	新免疫寛容導入法の確立とメトロン遺伝子ゲノム内導入による移植腎永久生着の試み
研究課題名(英文)	A trial of permanent functional renal allografts: combined therapy using a novel approach involving induction of immune tolerance and MF1 gene transfection
研究代表者	
	東 治人 (Azuma Haruhito)
	大阪医科大学・医学部・准教授
	研究者番号： 40231914

研究成果の概要：ラット腎移植モデルにおいて 3 種類の抗体 “改良型 CTLA4-Ig”、“Anti-ICOS-Ig”、および “CD28-SA” を併用することにより免疫寛容を導入し、レンチウイルスをベクターを用いて MF-1 遺伝子を移植腎組織に導入し、移植腎を長期的に保護することによって、移植腎を永久生着させることを目的としていたが、3 種抗体投与においては、予想に反して CD28-SA 単独投与群で最も高い生着延長効果がみられ、また、2 匹のレシピエントに抗体投与によると思われる強い全身性の炎症反応を認めた。また、MF-1 遺伝子導入については、MF-1 発現は見られたが、3 種類の抗体投与単独治療群と、3 種類の抗体投与+MF-1 遺伝子導入併用治療群の間に、有意な治療効果の増強（移植腎組織の改善、生着延長効果）を認めなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
19年度	2,700,000	810,000	3,510,000
20年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	10,800,000	3,240,000	14,040,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腎移植、免疫寛容、メトロンファクター、遺伝子導入

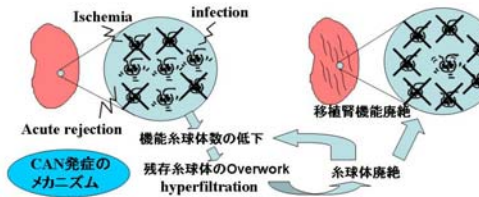
1. 研究開始当初の背景

(1) 新しい免疫寛容誘導法の必要性：免疫機構が異種蛋白を認識して拒絶反応を生じるためには、大きく 2 つの pathway (MHCII-TCR, CD28-B7) による signal の確立が必要である。現在代表的な免疫学的寛容の導入法は、2 つの pathway のうち CD28-B7-pathway を抗体投与などにより特異的に阻害する方法である。我々はこれまで

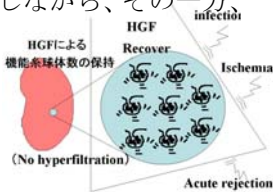
CTLA-4 抗体投与を介した CD28-B7-pathway 阻害による免疫学的寛容導入について検討を重ね、ラット腎移植急性拒絶モデル、および、慢性拒絶モデルにおいて 80%以上のレシピエントに免疫寛容を誘導させることに成功した (PNAS. 1996; JCI 1998)。しかし、80%の誘導率では、免疫寛容導入の際には免疫抑制剤を使用することなく移植腎組織に対する特異的な免疫不応答を誘導するため、免疫寛

容が誘導されない 20%の症例では激的な拒絶反応を生じ移植腎は機能廃絶に陥ることになる(移植腎ドナーが数少ない本邦では、たとえ 10-20%の確率でも臨床的な治療法として確立することは困難である)。

(2) CAN 発症の防止: 近年、免疫抑制剤の開発により移植腎の短期生着率は飛躍的に向上したが、腎移植患者の約半数は術後 15 年以内に移植腎機能廃絶にて透析に移行しており、その原因の 80% が Chronic allograft nephropathy (CAN) によるものである。

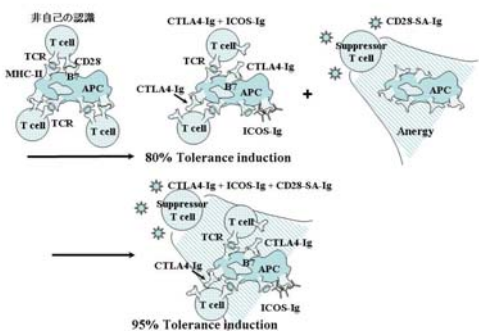


我々は CAN の発症には、様々な原因による機能糸球体数の減少が深く関わっており、細胞増殖因子である hepatocyte Growth Factor (HGF) が、これらの障害を軽減させ、CAN の発症を防止することを明らかにした (PNAS, 1995, 1996; JCI 1998; Transplantation, 1997; JASN 2001)。しかしながら、その一方、長期的な HGF 全身投与は、悪性腫瘍を誘発する危険性が示唆され、その臨床応用には十分な注意が必要である。

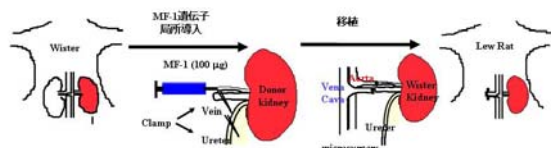


2. 研究の目的

(1) これらのことから免疫寛容誘導率をより高率に向上させるため、これまでの co-stimulatory pathway 阻害による anergy とは全くメカニズムの異なる免疫寛容の誘導法である “CD28-superagonist (CD28-SA-Ig)” による免疫寛容誘導を試みた。CD28-SA-Ig は『移植組織に特異的な suppressor T cell を誘導し、高率に免疫寛容を導く』とされており、すでに予備実験にて 90%以上の免疫寛容誘導率を確認している。さらに、本実験では CD28-SA-Ig 投与に加えて、従来の co-stimulatory pathway 阻害による anergy を併用することにより非常に高率な免疫寛容を誘導することを目的としている。



(2) また、Metron factor 1 (MF-1) は、HGF と Macrophage stimulating Factor (MSP) のキメラであり、HGF、および MSP の持つ “アポトーシス抑制作用” を HGF、MSP それぞれの factor に比較して有意に強く認めるが、悪性腫瘍を誘発させる作用はほとんど認めないことが報告されている。そこで、“アデノウイルス並みの導入効率”と、“目的遺伝子を標的組織のゲノム内に入れることによって半永久的な遺伝子発現を可能にする”『レンチウイルス』をベクターとして MF-1 遺伝子を移植腎組織の genome 内にしかも局所的に遺伝子導入することで、“移植腎内でのより強いアポトーシス抑制作用”と、“全身でのより少ない悪性腫瘍誘発作用”を同時にしかも長期的に発現させ CAN の発症を防止し移植腎の長期生着を図ることを目的としている。



3. 研究の方法

(1) ICOS-Ig, CD28-SA-Ig の作成

(2) Neo CTLA4-Ig, ICOS-Ig および CD28-SA-Ig の併用投与による免疫学的寛容の導入

① 条件設定: Neo CTLA4-Ig と ICOS-Ig の投与量、投与日、および投与回数については、他モデルでの実験結果をもとに検討する (Transplant Immunol, 2003; Transplant Int, 2004)。また、これら 2 種類の抗体に加えて CD28-SA-Ig の投与時期、投与回数、および投与量について、最も高率に免疫学的寛容が導入され、かつ組織障害の程度が軽い条件を十分に検討する。

② 実験モデル: Donor, Wistar; Recipient, Lewis (250g) ③ 実験群: 上記モデルを用いて次の 6 つの実験群を作成 (Gp 1) Neo CTLA4-Ig 単独投与治療群 (n=54); (Gp 2) ICOS-Ig 単独投与治療群 (n=54); (Gp 3) CD28-SA-Ig の単独投与治療群 (n=54); (Gp 4) Neo CTLA4-Ig と ICOS-Ig の併用投与治療群 (n=54); (Gp 5) Neo CTLA4-Ig, ICOS-Ig, CD28-SA-Ig 併用投与治療群 (n=54); (Gp 6) vehicle のみの対照群 (n=54)

④ 効果判定: i) 移植腎機能の評価, ii) 移植腎生着延長効果の検討, iii) 病理組織学的検索, iv) 免疫組織化学的検索

(3) MF-1-レンチウイルスの作成

(4) MF-1-レンチウイルス移植腎局所導入

① MF-1-Renti virus を種々の濃度 (1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 pfu), で腎動脈から電動ポンプ、およびシリコンチューブを用いて移植腎内に挿入し、一定時間 (10, 20, 30, or 40 min)

腎組織内で作用させる。②遺伝子導入を終了した腎を、生理食塩水にて環流した後、レシピエントに移植し、2、4、6、8日後におけるMF-1の腎組織内蛋白濃度および組織障害の程度を分子生物学的、および形態学的に検討する。

(5) ラット腎移植モデルにおける免疫学的寛容導入、およびMF-1-レンチウイルス遺伝子導入の *in vivo* における効果の検討

①実験モデル：Donor, Wistar; Recipient, Lewis (250g)

(4)で設定した条件でドナー腎にMF-1-レンチウイルスを環流することにより、MF-1 遺伝子導入を予め施行する。

実験群：上記モデルを用いて次の4つの実験群を作成 (Gp 1) Neo CTLA4-Ig, ICOS-Ig および CD28-SA-Ig の併用投与治療群 (n=54) ; Gp 2) Neo-CTLA4-Ig, ICOS-Ig および CD28-SA-Ig の併用投与+MF-1 遺伝子導入治療群 (n=54) ; Gp 3) MF-1 遺伝子導入治療群 (n=54) ; Gp 4) vehicle のみの対照群 (n=54)

②効果判定：(2)で示したと同様に検索

(6) 異種移植モデル (Ginea pig-Rat) における免疫学的寛容導入、およびMF-1 遺伝子治療の *in vivo* における効果の検討

①条件設定：Neo CTLA4-IgとICOS-Igの投与量、および投与日、および投与回数については、アログラフトモデルでの実験結果をもとに検討する。また、これら2種類の抗体に加えてCD28-SA-Igの投与時期、投与回数、および投与量について、最も高率に免疫学的寛容が導入され、かつ組織障害の程度が軽い条件を十分に検討する

②実験モデル：Donor, Ginea pig; Recipient, Lew rat MF-1 遺伝子を導入したGinea pigドナー腎をRatに腎移植する。レシピエントの固有腎は術当日に摘除する。移植手術はすでに確立している。尿管のサイズが著明に異なるので尿管吻合にはステントカテーテルを用いる。無治療コントロール群の生存日数は4-7日である。

③実験群：上記モデルを用いて次の4つの実験群を作成 (Gp 1) Neo CTLA4-IgとICOS-Igの併用投与治療群 (n=54) ; Gp 2) Neo CTLA4-Ig, ICOS-Ig およびCD28-SA-Igの併用投与治療群 (n=54) ; Gp 2) Neo CTLA4-Ig, ICOS-Ig およびCD28-SA-Igの併用投与+MF-1 遺伝子導入治療群 (n=54) ; Gp 3) MF-1 遺伝子導入治療群 (n=54) ; Gp 4) vehicle のみの対照群 (n=54)

④効果判定：(2)で示したと同様に検索

4. 研究成果

(1)CD28-superagonist (CD28-SA-Ig)”および、従来の co-stimulatory pathway 阻害による anergy を併用することによる免疫寛容誘導

① CD28-superagonist、ICOS-Ig, Neo CTLA4-Ig, の作成については、順調に産生され、それぞれの実験を施行可能であった。

② CD28-superagonist、ICOS-Ig, Neo CTLA4-Ig 3種抗体併用投与における免疫学的寛容誘導について

条件設定 i) Neo-CTLA4-IgおよびICOS-Ig :

投与量、1.0 mg/ml/day で投与。投与日、投与回数：day -2, day 0, day 2 の3パターンでの一回投与、および day -2, day 0, day 2 の3回投与を比較検討した結果、一回投与では移植手術日を基準として day -2, day 0, day 2 のうち、day -2 が最も効率が高いこと、さらに day -2, day 0, day 2 による3回投与の方が一回投与より高率に免疫学的寛容を導入可能であることを確認した。

ii) CD28-SA-Ig, ICOS-Ig, Neo CTLA4-Ig 3種抗体併用投与では、それぞれ抗体の投与量を1.0 mg/ml/day で投与した。投与日、投与回数：day -2, day 0, day 2 の3パターンでの一回投与、および day -2, day 0, day 2 の3回投与を比較検討した結果、予想に反して CD28-SA 単独投与群で最も高い生着延長効果がみられた。

免疫寛容誘導率と、移植腎の経過

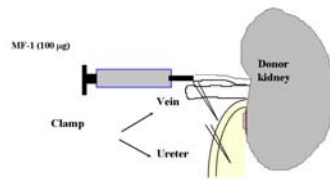
全グループで 2days, 4days, 6days, 14days, 8weeks, 16weeks, 24weeks, 32weeks, 52weeks の timepoint を設定し、それぞれの timepoint で移植腎を摘出し凍結切片 (免疫組織化学、molecular analysis 用) と4%ホルマリン保存切片 (病理組織用) を作成した。更に生存日数の延長効果を検索するためそれぞれ3匹ずつ作成し、経過観察を行ったところ、CD28-SA-Ig, ICOS-Ig, Neo CTLA4-Ig 3種抗体併用投与では、10匹中3匹のレシピエントに高度な出血と、細胞浸潤を伴う拒絶反応を認め、免疫寛容率は70%であった。これに対してCD28-SA 単独投与群では、拒絶反応を認めたのは10匹中1匹のみで、90%のレシピエントに免疫寛容の誘導が認められ、また、3種抗体併用投与群に比較して有意に長い生着延長効果がみられた。また、有害事象として、2匹のレシピエントに抗体投与によると思われる強い全身性の炎症反応を認めた。

(2) 『レンチウイルス』をベクターとしてMF-1 遺伝子を移植腎組織の genome 内に局所的に遺伝子導入する。

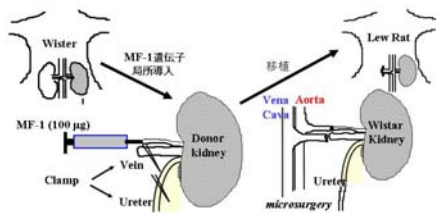
① MF-1-レンチウイルスの作成については、必要量を順次産生、および、それぞれの実験を施行可能であった。

②MF-1-レンチウイルス移植腎局所導入

i) まず、ドナー腎を実体顕微鏡下に腎動脈を可及的に損傷させることなく harvest し、腎静脈を脳血管外科用血管クリップを用いてクランプする。



ii) MF-1-Renti virus を種々の濃度 (1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 pfu), でドナー (Wistar) 腎動脈から電動ポンプ、およびシリコンチューブを用いて移植腎内に挿入し、一定時間 (10, 20, 30, or 40 min) 腎組織内で作用させ、レシピエントに microsurgery にて移植した。術後 2、4、6、8 日後に移植腎組織をそれぞれ摘出し、MF-1 遺伝子の発現、および、腎組織内蛋白濃度を検討したところ、MF-1-Renti virus は、 1×10^8 pfu, で 40 min 以上腎組織内で作用させた場合にのみ遺伝子導入が認められた。



しかしながら、遺伝子導入の程度は組織内で不均一で、組織障害の程度を分子生物学的、および形態学的に検討したところ、3種類の抗体投与単独治療群と、3種類の抗体投与+MF-1 遺伝子導入併用治療群の間に、有意な治療効果の増強 (移植腎組織の改善、生着延長効果) を認めなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Haruhito Azuma, Isaka Y, Li X, Hünig T, Sakamoto T, Nohmi H, Takabatake Y, Mizui M, Kitazawa Y, Ichimaru N, Ibuki N, Ubai T, Inamoto T, Katsuoka Y, Takahara S.

Superagonistic CD28 antibody induces

donor-specific tolerance in rat renal allografts. *Am J Transplant.* 2008. 06.22,8 (10): 2004-2014

[学会発表] (計 2 件)

① Azuma H 「TRANSFECTION OF NFKB DECOY OLIGODEOXYNUCLEOTIDES USING "EFFICIENT ULTRASOUND-GENE TRANSFER" INTO DONOR KIDNEYS PROLONGED SURVIVAL OF RAT RENAL ALLOGRAFTS PROLONGED SURVIVAL OF RAT RENAL ALLOGRAFTS」 XXII

International Congress of The Transplantation Society 2008.08.11 Sydney, Australia

② Azuma H 「Donor specific tolerance induced by Superagonistic CD28 antibody in rat renal allografts」 第7回日韓移植フォーラム

2008. 10. 10 Seoul, Korea

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 治人 (Azuma Haruhito)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40231914

(2) 研究分担者

勝岡 洋治 (Katsuoka Yoji)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：10051757

木山 賢 (Kiyama Satoshi)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10351404

高原 史朗 (Takahara Siro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附

講座教授

研究者番号：70179547

梨井 康 (Li Xiaokang)

国立成育医療センター(研究所)・移植、外科

研究部・室長

研究者番号：60321890