

- calcineurin activation regulates Th2 cell development by modifying the IL-4 receptor signaling complex. *J Exp Med* 191(11): 1869-1879, 2000.
- (4) Kosuga M. et al. Adenovirus-mediated gene therapy for mucopolysaccharidosis VII : Involvement of cross-correction in wide-spread distribution of the gene-products and long-term effects of CTLA-4Ig co-expression. *Molecular Therapy* 1(5): 406-413, 2000
- (5) Sakuragawa N et al. Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. *J Hum Genet* 45: 171-176, 2000.
- (6) Li X-K et al. Inhibition of Fas-mediated fulminant hepatitis in CrmA gene-transfected mice. *Biochem Biophys Res Commun* 273(1): 101-109, 2000.
- (7) Ozaki M et al. Rac1 regulates stress-induced, redox-dependent heat shock factor activation. *J Biol Chem* 275(45): 35377-35383, 2000.
- (8) Kosuga M et al. Strong, long-term transgene expression in rat liver using chicken b-actin promoter associated with cytomegalovirus immediated-early enhancer (CAG Promoter). *Cell Transplantation* 9(5): 675-680, 2000
- (9) Terada S et al. Inducing proliferation of human amniotic epithelial (HAE) cells for cell therapy. *Cell Transplantation* 9(5): 701-704, 2000
- (10) Enosawa S et al. Long-term culture of glutamine synthetase-transfected HepG2 cells in circulatory flow bioreactor for development for a bioartificial liver. *Cell Transplantation* 9(5): 711-715, 2000
- (11) Ueda H et al. Effect of a novel immunosuppressant, FTY720, on allograft survival after renal transplant in rats. *Eur Surg Res* 32: 279-283, 2000.
2. 学会発表
- (1) Guo L et al. Prolonged survival of hamster to rat liver xenograft using adenovirus containing CTLA4Ig gene. First Joint Annual Meeting of the American Society of Transplant Surgeons and the American Society of Transplantation. May 13-17, 2000 (Chicago)
- (2) Adachi Ket al. Protection of concanavalin A-induced hepatitis by CrmA gene transfection. First Joint Annual Meeting of the American Society of Transplant Surgeons and the American Society of Transplantation. May 13-17, 2000 (Chicago)
- (3) Ozaki Met al. Inhibition of the small GTPase, Rac1, Protects against post-ischemic liver injury by suppressing generation of intracellular reactive oxygen species and NF-kB biding avtivity. First Joint Annual Meeting of the American Society of Transplant Surgeons and the American Society of Transplantation. May 13-17, 2000 (Chicago)
- (4) Li X-K et al Prolongation of

- concanavalin A-induced hepatitis by crmA gene transfection. XVIII International Congress of the Transplantation Society. Aug 27-Sept 1, 2000 (Rome, Italy)
- (5) Enosawa S et al. Prolongation of survival time of pigs with ischemic liver failure by the treatment of bioartificial liver using glutamine synthetase-transfected recombinant human hepatoblastoma cell line, HepG2. XVIII International Congress of the Transplantation Society. Aug 27 - Sept 1, 2000 (Rome, Italy)
- (6) Ozaki M et al. Inhibition of the small GTPase, Rac1, protects against ischemia/reperfusion liver injury in mice. XVIII International Congress of the Transplantation Society. Aug 27 - Sept 1, 2000 (Rome, Italy)
- (7) Li X-K et al. HIV-1 nef protein prolonged recipient survival in rat liver allografting. International Congress of the Transplantation Society. Aug 27 - Sept 1, 2000 (Rome, Italy)
- (8) Guo Let al. Prolonged survival of hamster to rat liver xenograft using adenovirus containing CTLA4Ig gene. XVIII International Congress of the Transplantation Society. Aug 27 - Sept 1, 2000 (Rome, Italy)
- (9) Ohba M et al. AdCTLA4Ig gene-transfection combined with FTY720 promotes cardiac graft survival in rat. XVIII International Congress of the Transplantation Society. Aug 27 - Sept 1, 2000 (Rome, Italy)
- (10) Yan H et al. Defect of Scid M phage/DC in acquired tolerance induction. XVIII International Congress of the Transplantation Society. Aug 27 - Sept 1, 2000 (Rome, Italy)
- (11) Adachi K et al. Prolonged survival of rat liver allograft with crmA gene transfer. XVIII International Congress of the Transplantation Society. Aug 27 - Sept 1, 2000 (Rome, Italy)
- (12) Fujino M et al. Selective reconstruction of mice liver after transplantation of Fas-resistant hepatocytes. XVIII International Congress of the Transplantation Society. Aug 27 - Sept 1, 2000 (Rome, Italy)

分担研究報告

虚血耐性獲得を応用した移植心臓の機能向上 —長時間保存心におけるNFκB decoy導入の有用性に関する研究—

分担研究者 澤 芳樹 大阪大学大学院医学系研究科 機能制御外科学

研究要旨：移植心に HVJ-liposome 法により NFκB decoy を導入したのち、長時間保存し、レシピエントラット腹部に移植する。移植後 1 時間に測定した心機能は、16 時間保存心で対照群に比し有意に改善し、血中逸脱酵素量、血管内皮好中球接着率、および心筋組織中の IL-8 活性はいずれも有意に低値を示した。これより、移植心に対する NFκB decoy の導入は、NFκB による好中球接着、サイトカイン活性を抑制し、虚血再灌流障害を抑制することにより、心保存時間の延長に寄与することが明らかとなった。

A. 研究目的

心筋症などの重症心不全に対する治療としての心臓移植は、欧米における外科的治療として確立されているのに加え、本邦においても昨年より再開されている。しかしドナー不足は深刻な問題であり、補助人工心臓を bridge として利用してもその多くは移植を待たずして死亡している。現状の心筋保護法では心臓阻血時間の安全限界は 4 時間前後であり、虚血耐性獲得による保存心の移植後心機能向上は、その不足するドナープールを拡大するために是非とも達成されるべき課題である。

我々はこれまで、転写因子 NFκB によるサイトカインの活性化と虚血再灌流障害との関与に注目し、NFκB の binding site と同じ塩基配列を有する decoy oligonucleotide (おとり核酸) を HVJ-liposome 法によりラット心筋内に導入した。その結果、虚血再灌流後の心機能改善、心筋逸脱酵素減少など虚血再灌流障害の抑制効果が認められた。

本研究では、この NFκB decoy の虚血耐性作用をドナー心保存に応用し、保存時間の延長と移植後心機能改善の可能性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

心筋保護液注入により心停止を得たラット心を摘出し、静脈系を結紮して加圧しながら NFκB decoy を冠動脈より注入した (NF 群, n=6)。10 分間氷上で静置の後、心保存液にて心内を置換の上 4°C 心保存液中で 16 時間保存した。対照群で

は、scrambled decoy を注入ののち同様に保存した (SD 群, n=6)。保存後レシピエントラットの腹部に異所移植し、再灌流心拍動再開後 1 時間に CPK 採血、および移植心内に in situ に balloon を挿入して心機能を評価した。その後移植心を摘出し、血管内皮への好中球接着および ICAM-1 発現を免疫組織学的染色により検討するとともに、心筋組織中 IL-8、心筋含水率を測定した。FITC にてラベルした NFκB decoy の投与ラットでは、摘出した移植心の凍結切片を作成して蛍光発色を蛍光顕微鏡にて確認した。

(倫理面への配慮)

実験動物は本学付属動物実験施設にてガイドラインにのっとり飼育・管理し、実験に当たっては麻酔処置により苦痛を最小限とするようにした。また、犠牲死は麻酔薬の大量投与により得た。

C. 研究結果

FITC ラベル NFκB decoy を導入したラット心の凍結切片では、心筋細胞および血管内皮細胞の核内が蛍光発色し、心保存下における有効な導入を確認し得た。再灌流後心機能は LVDP (NF vs. SD: 57 ± 5 vs. 21 ± 9 mmHg), max dp/dt (1225 ± 154 vs. 235 ± 76 mmHg/sec) のいずれも NF 群で有意に高く ($P < 0.05$) (図 1)、血清 CPK 値 (3943 ± 834 vs. 7170 ± 367 IU/L) は NF 群で有意に低値であった ($P < 0.05$)。また、心筋含水率 (78.5 ± 0.6 vs. $80.5 \pm 0.4\%$)、好中球接着率 (9.7 ± 0.6 vs. 14.9 ± 0.9 counts/field)、組織中 IL-8 (1850 ± 161 vs. 2614 ± 18

ng/mg tissue) はいずれも NF 群で有意に低値であった ($P < 0.01$) (図 2). 血管内皮における ICAM-1 の発現は NF 群で低い傾向にあった (図 3).

D. 考察

NF κ B decoy の導入により長時間保存心における虚血再灌流障害の軽減が可能であり, その要因として血管内皮への好中球接着抑制やサイトカインの合成阻害が考えられた. 今後はこの機序を大動物心筋へ応用し, 人工心肺システムを用いた NF κ B decoy 導入ドナー心の同所性移植モデルにより臨床応用の可能性を検討する.

E. 結論

NF κ B decoy の導入は移植心の保存時間延長に寄与するものと考えられた.

F. 研究発表

1. 論文発表

- A novel strategy of decoy transfection against nuclear factor- κ B in myocardial preservation. T Sakaguchi, Y Sawa, H Matsuda et al. Annals of Thoracic Surgery;71:624-30.2001.
- 遺伝子導入を応用した新しい心保存法の開発～NF κ B デコイによる長時間心保存法～
澤 芳樹他
低温医学 ; 26(4):165-8,2000

2. 学会発表

- A novel strategy of prolonged myocardial preservation using gene transfection of cis element decoy against nuclear factor- κ B binding site. Y Sawa, T Sakaguchi, H Matsuda et al. ISHLT 2000.4.5-8
- 虚血再灌流障害に対する NF κ B decoy の有用性 —虚血心および保存心への応用—
船津俊宏, 澤芳樹, 松田暉他. 第 101 回日本外科学会総会 2001.4.11-13 (発表予定)
- 心筋における虚血再灌流障害に関する検討～遺伝子導入による発生機序解明と治療対策～
船津俊宏, 澤芳樹, 松田暉他. 第 7 回日本臓器保存生物医学会総会 2000.5.11-12

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
申請中
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

图1

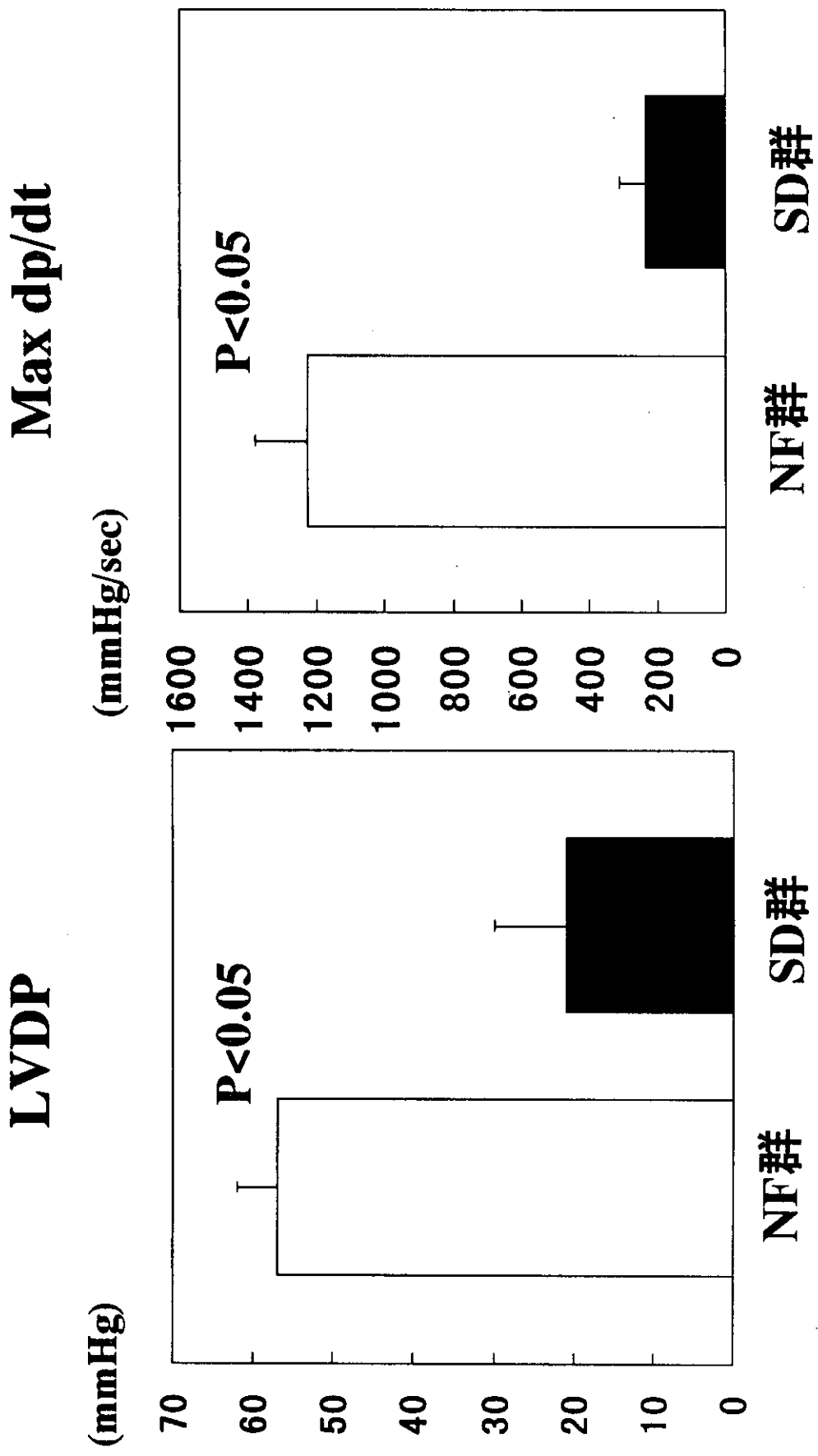
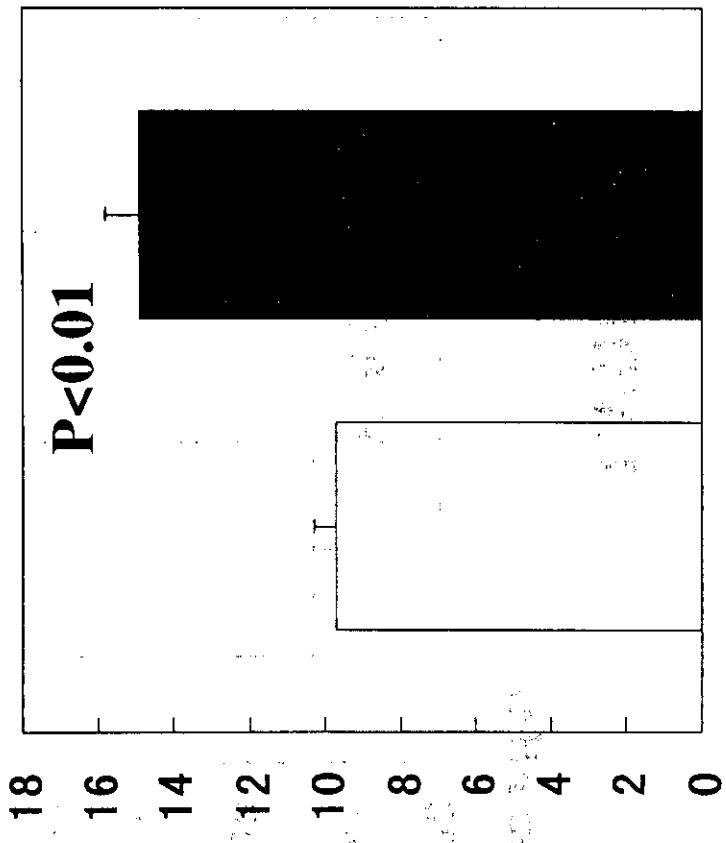


图2

好中球接着

(counts/field)

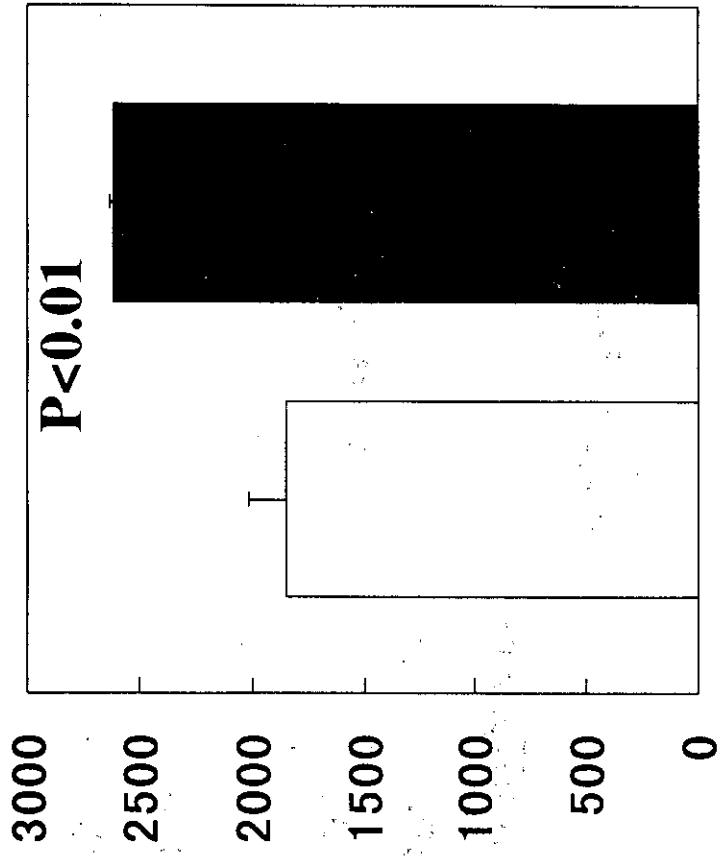


NF群

SD群

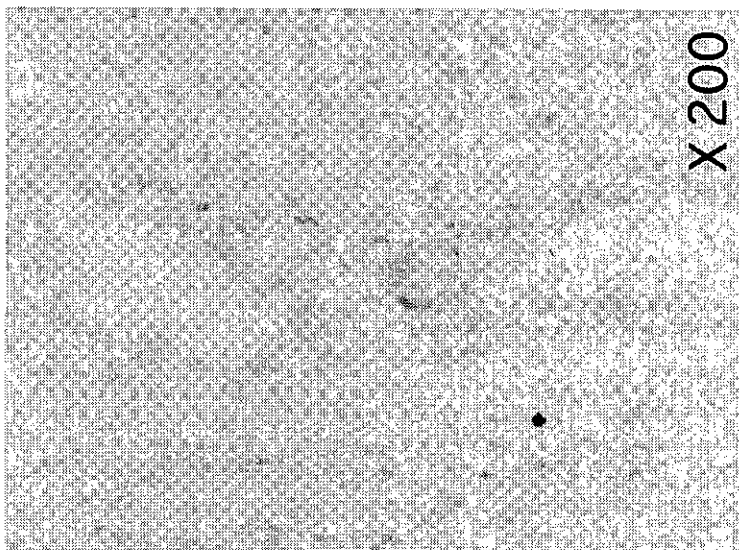
組織中 IL-8

(ng/mg tissue)

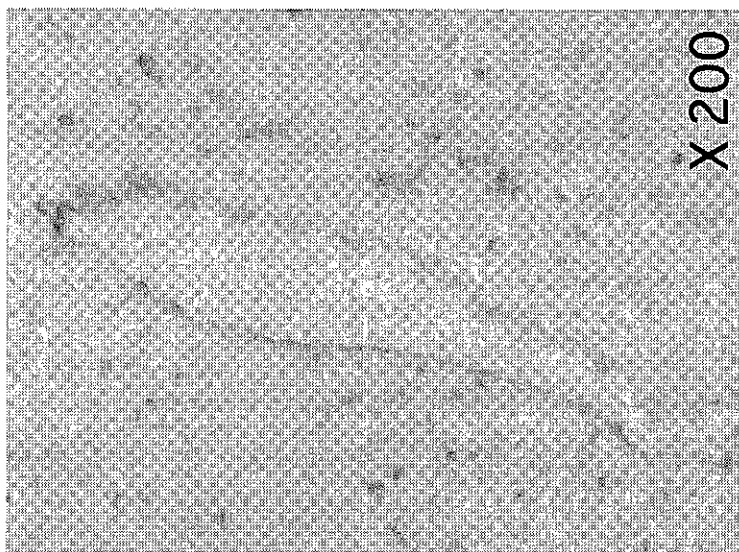


NF群

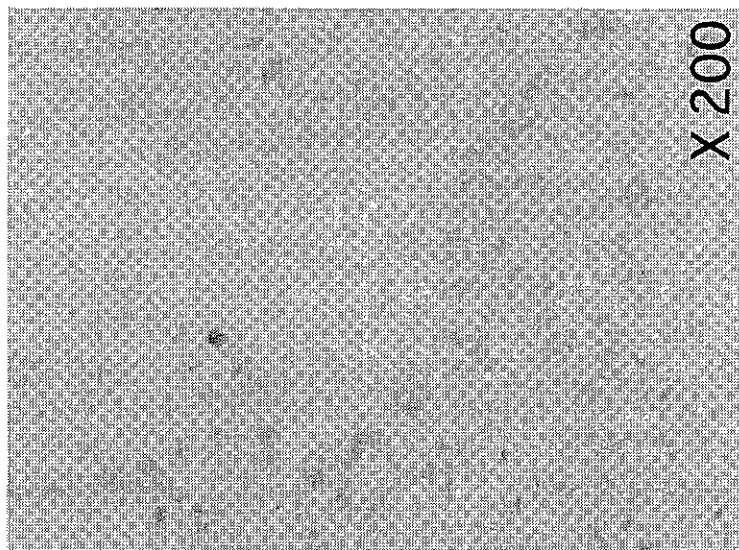
SD群



NF



SD



Control

图3 ICAM-1染色

分担研究報告

可溶性補助シグナル分子を用いた拒絶反応制御による移植臓器の長期生着法の検討

分担研究者 上出利光 北海道大学遺伝子病制御研究所
病因研究部門分子免疫分野教授

【研究要旨】 移植臓器の安全な長期生着法を開発するため、移植片の拒絶に深く関与すると考えられる、T細胞の活性化に重要な補助シグナル分子の役割に着目した。T細胞活性化の補助シグナルを効果的に抑制するため、補助シグナル分子の細胞外とヒト IgG1-Fc 領域との融合遺伝子を作製し、アデノウイルスベクターに組み込んで遺伝子治療用組み換えウイルスを作製した。対象とした補助シグナル分子は、CTLA4、CD40、ICOS、HVEM の 4 種類で、すべて作製を完了することができた。組み換えアデノウイルスを用いることにより、組み換え蛋白質を大量に精製することが可能になり、生体への直接投与により *in vivo* において効果的に組み換え蛋白質の発現を誘導することができた。このうち CTLA4Ig、CD40Ig については遺伝子治療を、ラット下肢移植モデルに適用し、複合組織である下肢組織の長期生着延長を誘導することが可能となった。さらに、遺伝子治療により発現誘導された組み換え蛋白質の体内動態を評価するため、ELISA 法による特異的定量系を構築しており、ICOSIg を除く 3 種類については定量が可能となった。

A. 研究目的

臓器移植は免疫抑制剤の開発により飛躍的に進歩したが、非特異的な免疫抑制による副作用など、未だ未解決な点も多い。臓器移植治療が徐々に増えると予想される現状では、さらに安全な移植片長期生着法の開発が必要であると考えられる。移植片の拒絶には、特異的T細胞の活性化が必要であることから、その反応を効果的に抑制することにより移植片の長期生着を誘導することが可能になると考えられる。特異的T細胞の活性化には抗原認識のほかに、補助シグナルとよばれる一群のリガンド/受容体間の相互作用が必要である。現在までに、補助シグナルを伝達する複数のリガンド/受容体が明らかにされているが、これらの活性の差異については明らかとなっていない。本研究では種々の移植モデルを用い、

各補助シグナル分子の寄与度を比較検討することにより、移植臓器の違いによる拒絶メカニズムの相違を明らかにするとともに、移植される臓器に特異的な免疫寛容誘導法を開発する。さらに、アデノウイルスベクターを用いることにより、臓器拒絶反応の遺伝子治療法としての可能性について検討する。

B. 研究方法

遺伝子工学的手法を用いて、CTLA4、CD40、ICOS、HVEM の 4 つの補助シグナル分子の細胞外領域をヒト IgG1-Fc 領域と連結し、可溶性補助シグナル分子を作製した。得られた融合遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込み、組み換えウイルスを作製した。組み換えウイルスを培養 COS-7 細胞に感染させ、培養上清から proteinA ア

フィニティークロマトグラフィーにより各蛋白質を精製した。移植モデルは、ラット異所性下肢移植モデルを用いた。ACI ラットの下肢を大腿中央部で切断し、動脈および静脈を Lew ラットの大腿動脈、大腿静脈に吻合し、背部皮下から甲のみを露出させた。拒絶の判定は、露出した甲の皮膚壊死の肉眼的所見により行った。移植を施した Lew ラットに CTLA4Ig、CD40Ig 発現アデノウイルス (1×10^9 pfu) を静脈内投与し、拒絶抑制効果を検討した。組み換えウイルスによる遺伝子治療後の生体における、可溶性補助シグナル分子の体内動態を検討するため、血清中の各分子の濃度を ELISA 法により定量した。

(倫理面への配慮)

本研究で行った動物実験は、すべて動物施設のガイドラインに沿って行われ、動物愛護の観点から、実験動物に対する倫理や福祉に十分配慮した。

C. 研究結果

1. 可溶性補助シグナル分子の作製とリンパ球増殖反応に対する効果

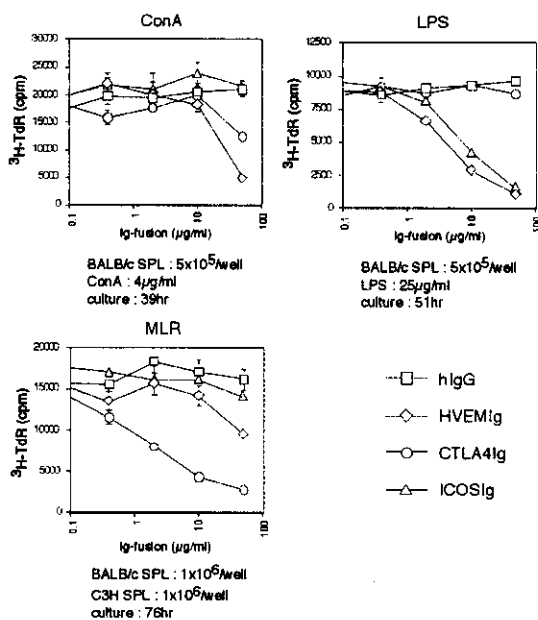


図1 脾細胞増殖反応における各可溶性補助シグナル分子の効果

表1 CTLA4Ig、CD40Ig発現アデノウイルスによるラット移植肢の遺伝子治療成績

治療群	処置	投与時期	拒絶日数 (days)	Mean±SD
No treatment	-	-	3,4,4,4,6	4.2±1.1
AxLacZ	1×10^9 pfu i.v.	Day0	4,4,5,5,6	4.8±0.8
AxCTLA4Ig	1×10^9 pfu i.v.	Day0	32,37,38,42,48	39.4±6.0*
AxCD40Ig	1×10^9 pfu i.v.	Day0	10,11,12,15,17	13.0±2.9*
AxCTLA4Ig +AxCD40Ig	1×10^9 pfu i.v. 1×10^9 pfu i.v.	Day0 Day2	42,44,48,56,56	49.2±6.6*

* P<0.01 vs AxLacZ

可溶性補助シグナル分子発現アデノウイルスを感染させた培養 COS-7 細胞の培養上清から、組み換え蛋白質を精製した。精製した CTLA4Ig、ICOSIg、HVEMIg の3種類を、脾細胞の in vitro 培養系に添加し、増殖に及ぼす効果を検討した (図1)。CTLA4Ig は MLR 反応を強く抑制した。しかし、ConA、LPS による増殖反応に対する効果はほとんど認められなかった。一方、ICOSIg、HVEMIg は CTLA4Ig と異なり、MLR に対しては効果が認められなかったが、LPS による増殖反応を効果的に抑制した。

2. ラット下肢移植モデルを用いた CTLA4Ig、CD40Ig の移植片拒絶抑制効果の検討

下肢移植を施したラットに CTLA4Ig、CD40Ig およびコントロールとして LacZ 発現アデノウイルスを静脈内投与した。その結果、移植当日の単回投与により、CTLA4Ig、CD40Ig 投与群で有意に移植片の生着延長を認めた (表1)。拒絶抑制効果は、CD40Ig に比べ、CTLA4Ig のほうが強力であった。さらに両者の併用は、生着期間の延長をもたらした。

3. 可溶性補助シグナル分子発現アデノウイルス投与後の体内動態の検討

CTLA4Ig、CD40Ig 発現アデノウイルス単回投与後の血清試料を経時的に採取し、蛋白質濃度を ELISA 法により定量した。その結果、いずれも投与後1週間をピークとするような一過性の発現動態を示すこと

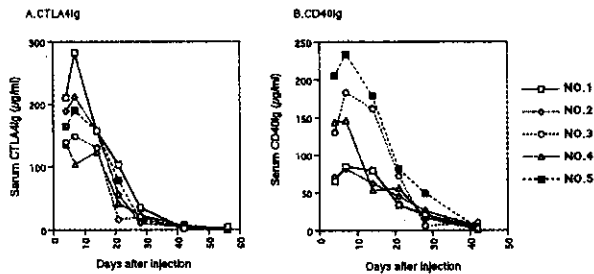


図2 CTLA4Ig、CD40Ig発現アデノウイルス単独投与後の血清中濃度推移

が明らかとなった(図2)。両者の濃度は、ピーク時には平均で約200 µg/mlと高く、4週間以上血清中に検出されるなど、いずれも優れた体内動態を示した。このことは、アデノウイルスベクターを用いた可溶性補助シグナル分子の導入法が、非常に優れた方法であることを示している。さらに、両者の併用群では、移植2日後に組み換えウイルスを投与したCD40Igにおいて、発現ピークの遅延と発現期間の延長が認められた(図3)。

D. 考察

1. 可溶性補助シグナル分子のリンパ球増殖に対する作用

精製した可溶性補助シグナル分子を脾細胞の刺激培養系に添加する試験では、CTLA4Ig、ICOSIg、HVEMIg間で作用の相違が認められた。このことは、作製した可溶性補助シグナル分子が機能的であることを示しているだけでなく、補助シグナル間でリンパ球機能における役割に明確な違いが存在することを示唆している。

2. CTLA4Ig、CD40Ig発現アデノウイルス投与による移植片拒絶抑制効果

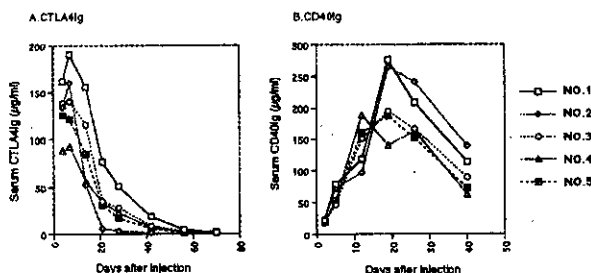


図3 CTLA4Ig、CD40Ig発現アデノウイルス併用投与後の血清中濃度推移

下肢移植モデルを用い、CTLA4Ig、CD40Ig発現アデノウイルスの拒絶抑制効果を検討した試験では、いずれも有意な生着期間延長を認めた。肢移植は、移植片が複合組織により構成されており、非常に強力な拒絶反応が惹起される。今回、移植片に対する免疫寛容を誘導することはできなかったが、有意な生着延長を認めたことは、アデノウイルスベクターを用いた可溶性補助シグナル分子による遺伝子治療が、非常に効果的な移植片拒絶抑制法であることを示している。さらに、両者を併用することにより、単独投与群に比べ、生着期間の延長を認めた。このことは、移植された下肢の拒絶メカニズムにCD28/CTLA4-B7、CD40L-CD40の両者が関与することを示唆するとともに、複数の補助シグナルを同時阻害することにより、さらに効果的な拒絶抑制作用が得られる可能性を示している。

3. 遺伝子導入補助シグナル分子の体内動態

CTLA4Ig、CD40Ig発現アデノウイルス単回投与後の血清中濃度推移の結果から、アデノウイルスベクターにより導入された可溶性補助シグナル分子は、高濃度かつ長期間の発現が可能であることが明らかとなった。このことは、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療法が、優れた方法であることを裏付けている。さらに、CTLA4Igの2日後に投与されたCD40Igの体内動態が向上したことから、複数の補助シグナル分子を併用する場合、投与時期についても十分考慮する必要があると考えられる。

E. 結論

1. CTLA4Ig、CD40Ig、ICOSIg、HVEMIgを発現する組み換えアデノウイルスを作製し、精製蛋白質を大量に調製することが可能となった。

2. アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療の適用により、生体で効率よく可溶性補助シグナル分子の発現を誘導することが可能となった。

3. 非常に強力な拒絶反応が引き起こされる下肢移植モデルにおいて、CTLA4Ig、CD40Ig を用いた遺伝子治療により、移植片の長期生着が可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takehara M., Murakami M., Inobe M., Tanaka K., Chikuma S., Saito I., Kanegae Y., Nakano M., Yamashita K., Todo S. and Uede T. : Long-term acceptance of allografts by in vivo gene transfer of regulatable adenovirus vector containing CTLA4IgG and LoxP. *Human Gene Therapy*. In press
- 2) Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Mak T.W. and Sakaguchi S. : Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 192:303-310, 2000.
- 3) Chikuma S., Murakami M., Tanaka K. and Uede T. : Janus kinase 2 is associated with a box 1-like motif and phosphorylates a critical tyrosine residue in the cytoplasmic region of cytotoxic T lymphocyte associated molecule-4. *J. Cell. Biochem.* 78:241-250, 2000.
- 4) Yamada A., Konishi K., Cruz G.L., Takehara M., Morikawa M., Nakagawa I., Murakami M., Abe T., Todo S. and Uede T. : Blocking the CD28-B7 T-cell costimulatory pathway abrogates the development of obliterative bronchiolitis in a murine heterotopic airway model. *Transplantation* 69:743-749, 2000.
- 5) Harada H., Ishikura H., Nakagawa I., Shindou J., Murakami M., Uede T., Koyanagi T. and Yoshiki K. : Abortive alloantigen presentation by donor dendritic cells leads to donor-specific tolerance: a study with a preoperative CTLA4Ig inoculation. *Urol. Res.* 28:69-74, 2000.

2. 学会発表

- 1) Chikuma S., Murakami M., Inobe M. and Uede T. : JAK2 is associated with a box1 like motif and phosphorylates a critical tyrosine residue in the cytoplasmic region of CTLA-4. *Immunology 2000 (Seattle)*, May 12-16, 2000.
- 2) Konishi K., Murakami M., Inobe M., Todo S., Yamada A., Morikawa M. and Uede T. : Combination therapy of CTLA4Ig and FTY720 completely prevent the development of obliterative bronchiolitis and respiratory epithelial injury in a murine hetero-topic transplantation. *Transplantation 2000 (Chicago)*, May 13-17, 2000.
- 3) Nomura M., Yamashita K., Murakami M., Takehara M., Konishi K., Echizenya H., Yanagida N., Omura T., Kishida A., Furukawa H., Uede T. and Todo S. : Long Term liver acceptance with a novel adenovirus mediated CD40IgG gene transfer on rat. *Transplantation 2000 (Chicago)*, May 13-17, 2000.
- 4) Iwasaki N., Uede T., Minami A. and Kaneda K. : Long-term survival of allogeneic limb grafts induced by CTLA4Ig. *55th Annual Meeting of American Society for Surgery of the Hand (Seattle)*, October 4-7, 2000.
- 5) Yoshioka C., Iwasaki N., Uede T. and Minami A. : The feasibility of gene therapy for local immunosuppression in allogeneic nerve grafts. *55th Annual Meeting of American Society for Surgery of the Hand (Seattle)*, October 4-7, 2000.
- 6) 白木智哲、渡井至彦、竹内一郎、野々村克也、小柳知彦、猪部学、上出利光、原

田浩：ラット脾臓より抽出した樹状突起細胞のアロ抗原特異的T細胞刺激機序の解析。第4回北海道臓器移植フォーラム（札幌），6月17日，2000。

7) 上西知子、村上正晃、猪部学、上出利光：新たな補助シグナル分子、HVEMの免疫系への関与。第33回北海道病理談話会（札幌），9月2日，2000。

8) 竹馬俊介、村上正晃、猪部学、上出利光：CTLA-4の細胞内ドメインに結合する機能分子の検索。－新規結合分子としてのJAK2－。第4回北海道免疫談話会・学術集会（札幌），9月23日，2000。

9) 小西勝人、猪部学、村上正晃、藤堂省、上出利光：マウス皮下移植モデルにおけるCTLA4Ig及びFTY720併用投与による慢性拒絶反応抑制効果。第30回日本免疫学会総会・学術集会（仙台），11月14-16日，2000。

10) 白木智哲、猪部学、上出利光、原田浩、竹内一郎、小柳知彦：脾臓より抽出した樹状突起細胞とCD40-IgG併用によるGraft生着延長の試み。第30回日本免疫学会総会・学術集会（仙台），11月14-16日，2000。

11) 上西知子、村上正晃、猪部学、上出利光：新たな補助シグナル分子、HVEMの免疫系への関与。第30回日本免疫学会総会・学術集会（仙台），11月14-16日，2000。

12) 猪部学、上西知子、村上正晃、上出利光：Costimulatory活性を示す新しいTNFRファミリーHVEMの免疫系への関与。第23回日本分子生物学会（神戸），12月13-16日，2000。

3. その他
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表 1 CTLA4Ig、CD40Ig発現アデノウイルスによるラット移植肢の遺伝子治療成績

治療群	処置	投与時期	拒絶日数 (days)	Mean±SD
No treatment	-	-	3,4,4,4,6	4.2±1.1
AxLacZ	1x10 ⁹ pfu i.v.	Day0	4,4,5,5,6	4.8±0.8
AxCTLA4Ig	1x10 ⁹ pfu i.v.	Day0	32,37,38,42,48	39.4±6.0*
AxCD40Ig	1x10 ⁹ pfu i.v.	Day0	10,11,12,15,17	13.0±2.9*
AxCTLA4Ig +AxCD40Ig	1x10 ⁹ pfu i.v. 1x10 ⁹ pfu i.v.	Day0 Day2	42,44,48,56,56	49.2±6.6*

* P<0.01 vs AxLacZ

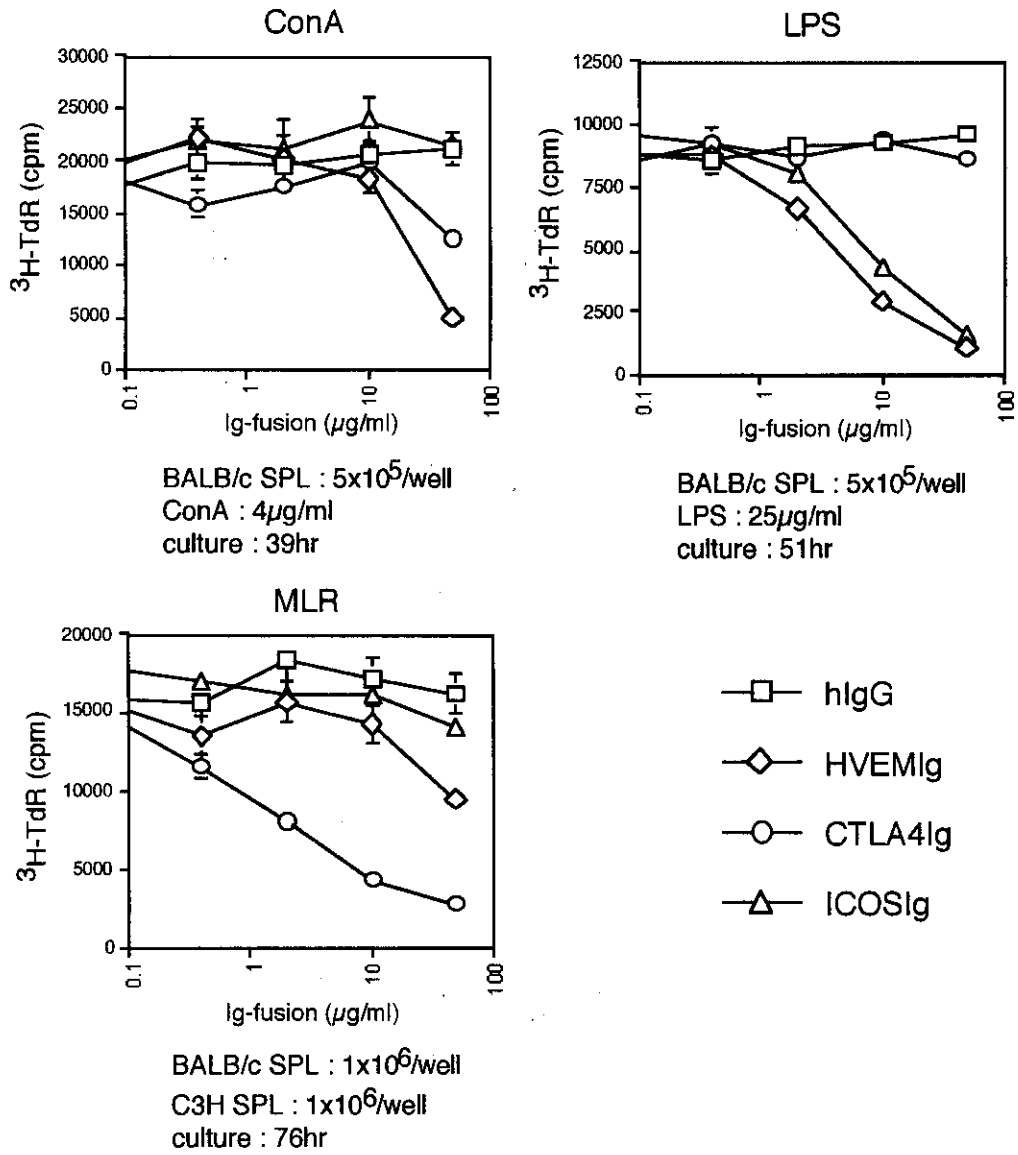


図1 脾細胞増殖反応における各可溶型補助シグナル分子の効果

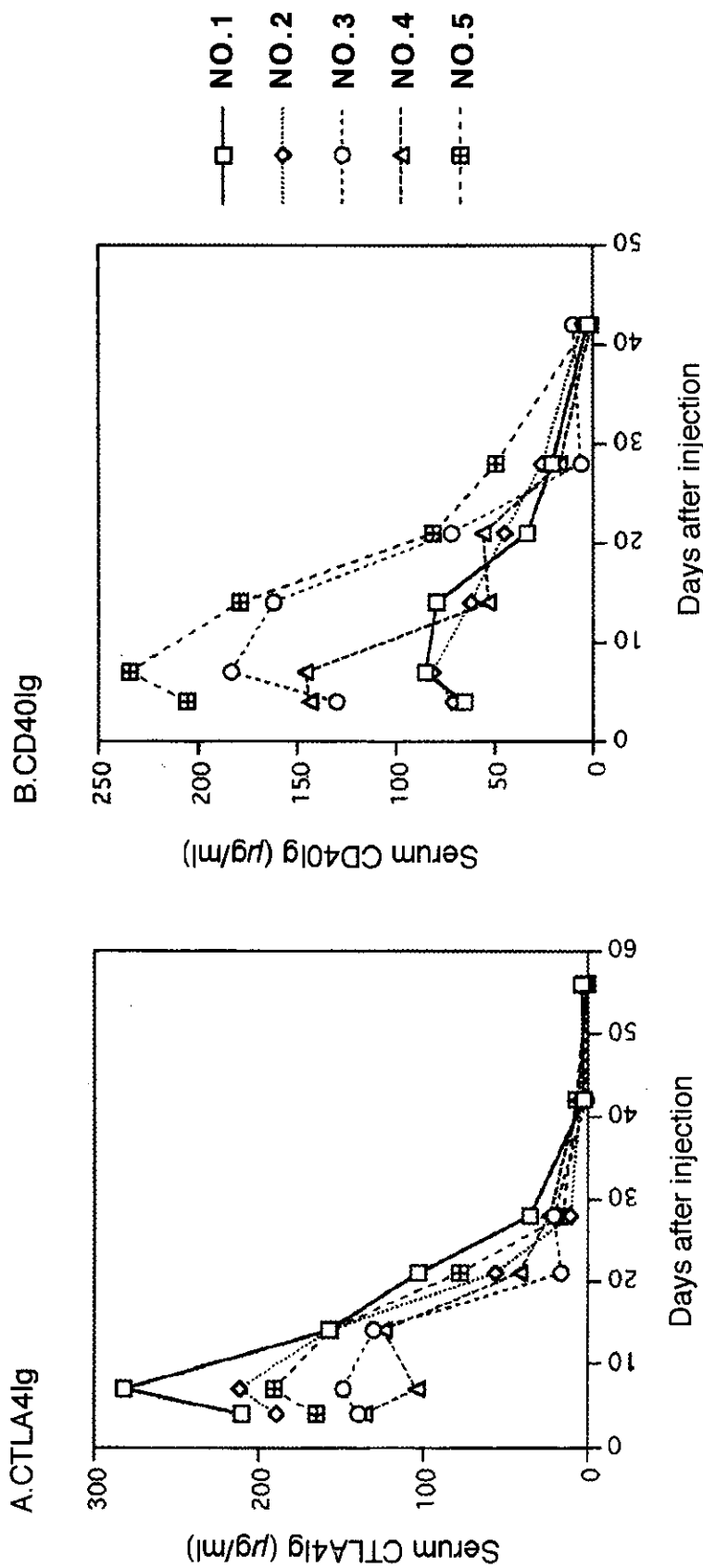


図2 CTLA4Ig、CD40Ig発現アデノウイルス単独投与後の血清中濃度推移

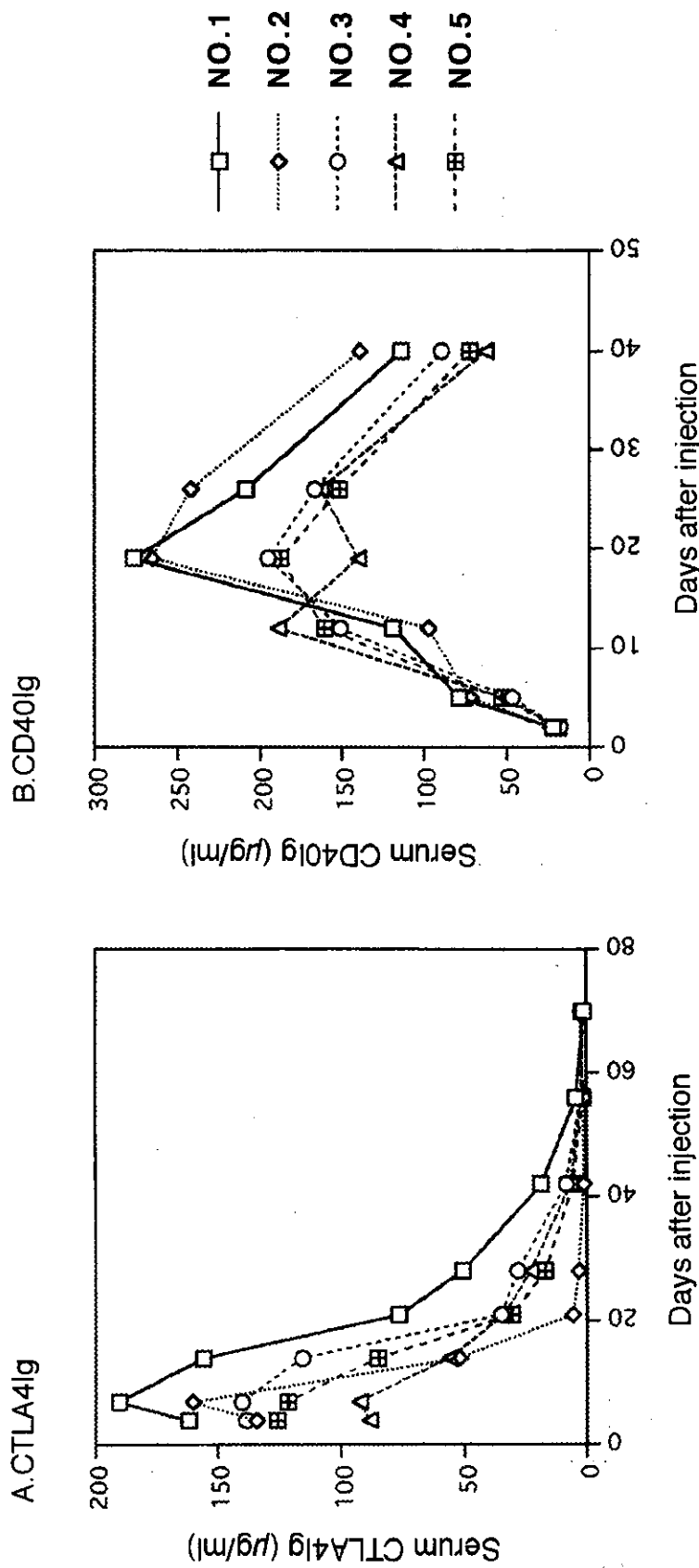


図3 CTLA4Ig、CD40Ig発現アデノウイルス併用投与後の血清中濃度推移

分担研究報告

遺伝子導入による拒絶反応抑制と移植臓器の機能制御に関する研究

分担研究者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科分子治療学
部門遺伝子治療教授

研究要旨

移植臓器の機能制御を積極的に行うための安全な技術を確立し、移植医療の長期に渡る成功率を上昇させることをめざして、組織特異性を賦与するために、HVJ-liposome に抗体を付加したイムノ融合リポソームの開発を行った。腎臓メサンジウム特異的抗体を結合させることにより、腎臓への標的導入が可能であった。このとき馬杉腎炎モデルラットの腎臓にイムノ融合リポソームを用いて NFκB のおとり型核酸の標的導入を行うことにより、腎炎の軽減に成功し、組織ターゲティングの可能性が明らかになった。

A. 研究目的

この研究においては移植臓器の拒絶反応抑制と機能制御を遺伝子導入により行い、移植医療の拡大に貢献しようとするものである。移植後の慢性拒絶の抑制のためには移植前の処置と数年後の処置とが必要であると考えられる。そのための安全で高効率のベクター開発を行うこと、標的臓器へのターゲティングが可能であることが求められる。そのためのベクターの改良を行った。

B. 研究方法

1) 非侵襲で高効率の遺伝子導入ベクターとして HVJ-liposome を開発・改良してきたが、組織特異性を賦与するために、抗体付加したイムノ融合リポソームの開発を行った。Dithiopyrigine(DTP) を dipalmytoylphosphatidylethanolamine に結合させた脂質を合成し(日本油脂に依頼)、その 1 mg を従来の HVJ-liposome 作成に於けるリポソーム構成脂質(phosphatidylserine 10 mg, phosphatidylcholine 48 mg, cholesterol 20 mg) に対し加えた混合脂質をクロロフォルムに溶解し、それをエバポレーターを用いてクロロフォルムを蒸散させ、脂質薄膜をガラス管に

作成した。これに蛍光ラベルした 20 mer oligodeoxynucleotides (ODN)200 μg (BSS 200 μl に溶解) を加えて DNA 含有リポソームを vortex 法で作成した。ラット腎臓メサンジウム細胞に発現する Thy-1 抗原に対する特異的モノクローナル抗体 OX-7 を精製し、この 200 μg を上記リポソームと 4 度で 2 時間反応させ、非結合抗体除去のための PBS に対して一晩 4 度で透析を行った。こうして作成したリポソームと紫外線で不活性化した HVJ(15000HAU) を混合し氷上で 10 分、37 度で 1 時間反応させたあと、蔗糖密度勾配を用いた超遠心により抗体付 HVJ-liposome を精製した。

2) イムノ融合リポソームをラット尾静脈より注入した。2 時間後に腎臓を凍結し切片を作成し、蛍光顕微鏡下で観察した。

3) NFκB のおとり型核酸を馬杉腎炎モデルラット(抗基底膜抗体を静脈注入して作成)にイムノ融合リポソームを用いて導入し、腎系球体での IL-1, ICAM-1 の RNA レベルをノーザンブロットにより調べ、腎炎の指標をもとに治療効果について検討した。

倫理面への配慮

実験については大阪大学医学系研究科で定め

る動物実験のガイドラインを遵守した。基本的には極力苦痛の除去、軽減をはかり、臓器摘出時は深麻酔下で行い、実験終了後には深麻酔により安楽死させた。臓器移植を受けた動物については自力で飲水・摂食が可能になるまで保温、体液の補充等を行った。

C. 研究成果

- 1) リポソーム1粒子あたり、2-5分子の抗体が結合していた。
- 2) 蛍光オリゴヌクレオチドは図1のように左右どちらの腎臓の糸球体にも到達しており、約90%の糸球体に蛍光が認められた。その他の臓器には蛍光がみられなかった。
- 3) 馬杉腎炎モデルラットの腎糸球体でのIL-1, ICAM-1の発現は亢進しており、これはScrambled ODN含有のイムノ融合リポソームは抑制されなかったが、イムノ融合リポソームでNFkBのおとり型核酸を導入することにより著明に抑制された。
- 4) 馬杉腎炎モデルラットでは炎症の亢進により腎重量が増加するがイムノ融合リポソームでNFkBのおとり型核酸を導入することにより正常に近い値まで減少した。
- 5) 馬杉腎炎モデルラットにおける糸球体の巣状硬化、半月体形成、細胞浸潤などはイムノ融合リポソームでNFkBのおとり型核酸を導入約50%の抑制であった(図2)。

D. 考察

慢性拒絶は年単位で発症するために、移植時における処置のみでなく、移植後の処置も必要である。磯部らとの共同研究によりNFkBのおとり型核酸をマウスの移植臓器に導入すると、接着因子やサイトカインだけでなく、MHC-class Iの発現も抑制され、新生内膜形成

を抑制したばかりでなく、免疫反応も抑える可能性が示唆され、拒絶反応の抑制に有効であると考えられてきた。今回イムノ融合リポソームが開発され、NFkBおとり型核酸が遠隔的に有効に導入されることがわかった。また、HVJ-liposomeは抗原性が低く連続投与が可能であることを合わせて考えれば、将来の慢性拒絶を抑制するツールとして有望であろう。心臓や肝臓などの他臓器にも特異的な抗体があれば同様な手法がしよう可能であろう。

E. 結論

イムノ融合リポソームにより腎臓へのターゲティングが可能であり、NFkBおとり型核酸が腎炎治療に有効に機能した。移植医療にも応用可能であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hagihara, Y., Saito, Y., Kaneda, Y., Kohmura, E., and Yoshimine, T.: Wide spread gene transfection into the central nervous system in rats and primates. *Gene Therapy* 7, 759-763, 2000.

Suzuki, J., Isobe, M., Morishita, R., Nishikawa, T., Amano, J., and Kaneda, Y.: Antisense Bcl-x oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Cardiovascular Research* 45, 783-787, 2000.

Kaneda, Y., Saeki, Y., Nakabayashi, M., Zhou, W-Z., Wataya-Kaneda, M., and Morishita, R.: Enhancement of transgene expression by cotransfection of oriP plasmid with EBNA-1 expression vector. *Hum. Gene Ther.* 11, 471-479, 2000.

Suzuki, J., Isobe, M., Morishita, R., Nishikawa,

T., Amano, J., and Kaneda, Y. :Prevention of cardiac allograft arteriosclerosis using antisense proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotide. *Transplantation* 70, 398-400, 2000.

Suzuki J, Morishita R, Amano J, Kaneda Y, and Isobe M. : Decoy against nuclear factor-kappa B attenuates myocardial cell infiltration and arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Gene Therapy* 7, 1847-1852, 2000.

Kawauchi, M., Suzuki, J., Morishita, R., Wada, Y., Izawa, A., Tomita, N., Amano, J., Kaneda, Y., Ogihara, T., and Isobe, M.: Gene therapy for attenuating cardiac allograft arteriopathy using ex vivo E2F decoy transfection by HVJ-AVE liposome method in mice and nonhuman primates. *Circulation research* 87, 1063-1068, 2000.

Tsuboniwa, N., Morishita, R., Hirano, T., Fujimoto, J., Furukawa, S., Kikumori, M., Okuyama, A., and Kaneda, Y.: Safety evaluation of HVJ-AVE liposomes In nonhuman primates. *Hum. Gene Therapy*, in press.

2. 学会発表 (小川班のもの)

Kaneda, Y. and Morishita, R. Developing a virosome-mediated gene delivery 第 27 回 Controlled Release of Bioactive Materials 2000 年 7 月 12 日 Paris (France)

Kaneda, Y.: Evolution of virosome-mediated gene delivery system 第 6 回日本遺伝子治療学会国際シンポジウム 2000 年 7 月 29 日 東京 金田安史: 非ウイルスベクターによる遺伝子治療 平成 12 年 10 月 26 日 第 45 回日本人類遺伝学会 シンポジウム 福岡

Kaneda, Y.: Treatment of intractable diseases using synthetic oligonucleotides coupled with fusogenic liposomes. 2000 International Chemical Congress, December 17, 2000, Honolulu (USA)

G. 知的所有権の取得状況

出願中特許

金田安史ら: 遺伝子導入のためのウイルスエンベロープベクター (PCT/JP01/00782)

図1：イムノ融合リポソームによる蛍光オリゴヌクレオチドのラット腎臓への導入

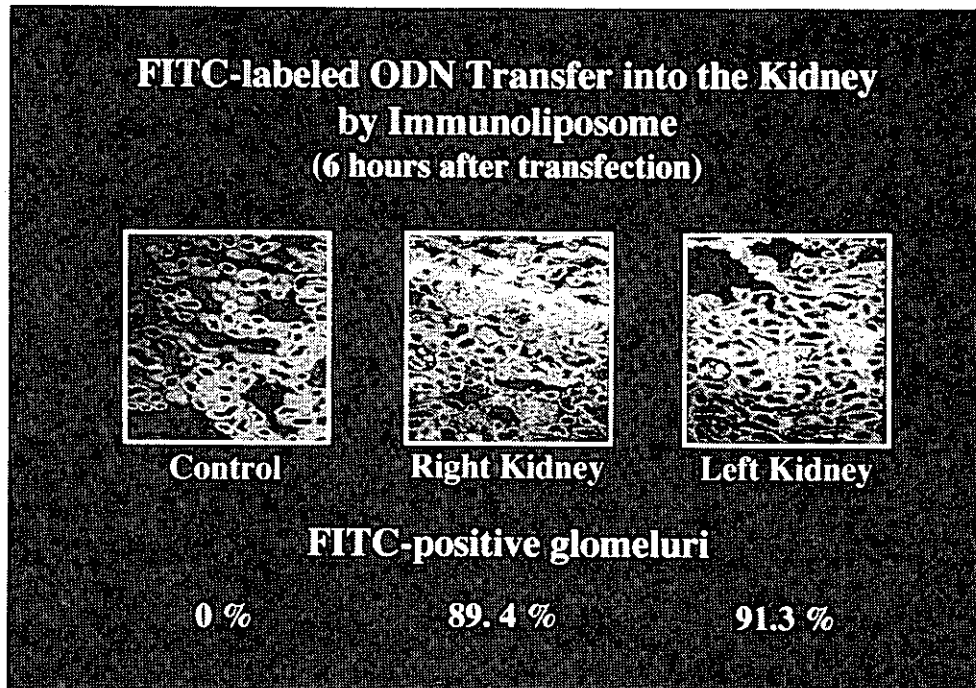


図2：イムノ融合リポソームによる NFκB おとり型核酸の馬杉腎炎モデルラットへの標的導入による治療効果

