

論 文 要 旨

論 文 題 目

Adenovirus mediated gene transfer of triple human complement regulating proteins (DAF, MCP and CD59) in the xenogeneic porcine to human transplantation model.

Part I: In vitro assays using porcine aortic endothelial cells.

(ブタ-ヒト異種移植モデルにおけるアデノウイルスを用いたヒト補体抑制蛋白遺伝子導入

-ブタ血管内皮細胞において)

氏名 長濱 正吉



[目的]ブタからヒトへの異種間移植モデルでは、ブタ血管内皮細胞 (porcine aortic endothelial cell:以下 PAEC)は超急性拒絶反応 (hyperacute rejection:以下 HAR)の主要な標的とされる。HARでは自然抗体のPAECへの沈着後、補体系が活性化される。補体活性化はブタ補体抑制蛋白がヒトの補体を抑制しえない(種間不適合)ことに起因するため、ヒト補体抑制蛋白 (human complement regulating protein:以下 hCRP)発現 PAECを作成すれば異種臓器移植でのHARを抑制しうることが予想される。本研究は adenovirus vectorを用いて三種類のhCRP (MCP, DAF, CD59)をPAECに遺伝子導入しヒト血清に対する補体抑制効果を検討した。[方法] PAECは雌性雑種ブタ(25kg)の腹部大動脈から採取した。adenovirus vectorはマーカ一遺伝子 β -galactosidaseをコードするAxCALacZ,及びhCRP(MCP/DAF/CD59)をコードするAxCAMCP, AxCADAF, AxCACD59

を COS-TPC 法で作製した。(実験 1) PAEC
 沈着自然抗体の測定: 96 穴マイクロタイタ
 ープレートに固定した 10^4 個の PAEC をヒト
 及びブタ血清と 1 時間接触後, アルカリフォ
 スファターゼ標識兎由来抗ヒト IgG と IgM
 を加え, 1 時間静置した。酵素活性を ELISA
 (enzyme-linked immunosorbent assay) プ
 レートリーダーで測定した。(実験 2) 遺伝
 子導入の条件設定: 上記と同じ固定前のプレ
 ートを使用し, AxCALacZ ($1-10^4$ moi:
 multiplicity of infection) で 5-60 分間遺
 伝子導入した。導入した β -galactosidase
 の酵素活性を測定した。(実験 3) 導入
 hCRP 遺伝子 mRNA 量の評価: hCRP の
 PAEC への遺伝子導入程度を RT-PCR で検討
 した。(実験 4) 血清による PAEC 細胞障害
 の条件設定: MTT(methyl thiazolyl
 tetrazolium) assay で PAEC の障害をおこ
 すヒト血清の濃度と時間を決定した。(実験
 5) 遺伝子導入 PAEC の補体抑制能: hCRP

遺伝子導入後 PAEC のヒト血清による細胞障害の程度を MTT assay で評価した。[結果]

実験 1 ではヒト血清と培養した PAEC のヒト IgG と IgM に対する吸光度 ($0.764 \pm 0.091 / 1.140 \pm 0.132$) がブタ血清群に比し有意に高値をとった。実験 2 では AxCALacZ 10^3 moi と PAEC を 60 分間培養する条件下で導入効率が最高値をとった ($89.1 \pm 3.1\%$)。

実験 3 の RT-PCR では MCP と CD59 は 10^3 moi / 遺伝子導入 3 日目で, DAF は 10^3 moi / 遺伝子導入 1 日目でその発現量が最大となった。実験 4 では PAEC の障害は 40% 血清よりも 20% 血清によるものが強かった。実験 5 では単一 hCRP 導入に比し, 複数 hCRP 導入 PAEC がヒト血清による細胞障害を抑制する傾向を認めた。[まとめ] adenovirus vector による hCRP 導入によって PAEC にヒト補体抑制活性を持たせえた。[考察] 本法はブタからヒトへの異種臓器移植における HAR の抑制に応用しうるものと考えられた。

報告番号	* 課程博 論文博	第 号	氏名	長瀬 正彦
		平成 13 年 11 月 27 日		
論文審査委員	主査教授		安澄 文興	安澄
	副査教授		吉井 興志彦	吉井
	副査教授		吉見 直己	吉見
(論文題目) Adenovirus mediated gene transfer of triple human complement regulating proteins (DAF, MCP and CD59) in the xenogeneic porcine to human transplantation model. Part I: In vitro assays using porcine aortic endothelial cells.				
(論文審査結果の要旨) 上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準などにつき慎重かつ公正に検討し、以下の審査結果を得た。 1. 研究の背景と目的 ブタからヒトへの異種間移植モデルでは、ブタ血管内皮細胞 (porcine aortic endothelial cell : 以下 PAEC) は超急性拒絶反応 (hyperacute rejection : 以下 HAR) の主要な標的とされる。HAR では自然抗体が PAEC へ沈着した後、補体系が活性化される。補体の活性化はブタ補体抑制蛋白がヒトの補体を抑制しえない(種間不適合)ことに起因するため、ヒト補体抑制蛋白(human complement regulating protein : 以下 hCRP)を発現するPAECを作成すれば異種臓器移植でのHARを抑制しうることが予想される。本研究はアデノウイルスベクター(以下 AdV)を用いて三種類のhCRP (MCP, DAF, CD59)をPAECに遺伝子導入し、ヒト血清に対する補体抑制効果を検討した。				

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
 - 2 要旨は800字～1200字以内にまとまること。
 - 3 *印は記入しないこと。

2, 研究内容

[方法] PAECは雌性雑種ブタから採取した。大腸菌 β -galactosidaseをコードするAxCALacZ,及びhCRP (MCP/DAF/CD59)をコードするAdVをCOS-TPC法で作製した。(実験1)in vitroにおけるHARモデルの作製:培養し一時凍結したPAECをヒト及びブタ血清と1時間接触後,アルカリフォスファターゼ標識由来抗ヒトIgGとIgMを加え,1時間静置した。酵素活性をELISAプレートリーダーで測定した。またヒト血清によるPAECに対する細胞障害をMTT (methyl thiazolyl tetrazolium) assay で評価した。(実験2)遺伝子導入の至適条件の設定:AxCALacZ ($1 \cdot 10^4$ moi: multiplicity of infection) をPAECと5-60分間培養,遺伝子導入して β -galactosidaseの活性を測定した。(実験3)導入したhCRP遺伝子のmRNA量の評価:hCRPのPAECへの遺伝子導入をRT-PCRで検討した。(実験4)遺伝子導入したPAECの補体抑制能の検討:hCRPを遺伝子導入したPAECのヒト血清による細胞障害をMTT assayで評価した。

[結果]実験1ではヒト血清中の自然抗体が検出でき,ブタ血清に比しヒト血清は有意にPAECを障害した。このモデルはin vitroのブタ-ヒト異種移植におけるHARを再現していた。実験2では 10^3 moi \cdot 60分間培養する条件下でAxCALacZによるPAECへの導入効率が最高値であった($89.1 \pm 3.1\%$)。実験3のRT-PCRでMCPとCD59は 10^3 moi/遺伝子導入3日目で,DAFは 10^3 moi/遺伝子導入1日目で発現量が最大となった。実験4では遺伝子導入されたhCRPは未導入群に比し有意に細胞障害を抑制した。

[まとめ]AdVでhCRPをPAECに遺伝子導入が可能であり,ヒト血清による障害を抑制しえた。

[考察]複数のhCRPをPAECへ遺伝子導入し同時に発現することによって,補体抑制効果を獲得しブタからヒトへの異種間臓器移植におけるHARの抑制に応用しうるものと考えられた。

3, 研究成果の意義と学術的水準

in vitroのブタからヒトへの異種間移植モデルにおいて,HARの標的とされるPAECにAdVによるhCRPの遺伝子導入によって補体抑制効果を持たせることが可能であった。本法は異種間臓器移植におけるHARの抑制に応用しうることが示唆され,今後の異種間移植の発展に寄与しうるものと考えられた。また国際的に認められる水準であると判断された。

以上により,本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。