



|              |                                                                                                                    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Significant Downregulation of the Major Swine Xenoantigen by N-Acetylglucosaminyltransferase III Gene Transfection |
| Author(s)    | Tanemura, Masahiro                                                                                                 |
| Citation     | 大阪大学, 1998, 博士論文                                                                                                   |
| Version Type | VoR                                                                                                                |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.11501/3143883">https://doi.org/10.11501/3143883</a>                                    |
| rights       |                                                                                                                    |
| Note         |                                                                                                                    |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                                                                |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 種 村 匡 弘                                                                                                                                                                        |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                      |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 3 7 6 9 号                                                                                                                                                                  |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成10年 3 月 25 日                                                                                                                                                                 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当<br>医学研究科外科系専攻                                                                                                                                                     |
| 学 位 論 文 名     | Significant Downregulation of the Major Swine Xenoantigen<br>by N-Acetylglucosaminyltransferase III Gene Transfection<br>(N-アセチルグルコサミン転移酵素III遺伝子導入によるブタ主要異<br>種抗原の著明な発現低下について) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 白 倉 良 太<br><br>(副査)<br>教 授 松 田 暉 教 授 谷 口 直 之                                                                                                                       |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【背景及び目的】

脳死臓器移植の成績が向上するにつれ移植適応患者数は増加しているが、提供臓器数はこれを満足するにはとうてい及ばず、深刻なドナー不足に直面している。その解決法としてブタの臓器をヒトに移植する Discordant Xenotransplantation (遠い種からの異種移植) が臨床応用に最も近い方法と期待され、世界中で注目されている。しかし、ブタ移植片がヒトに生着し機能するためには移植後分単位で起こる超急性拒絶反応を制御することが必要不可欠である。この超急性拒絶反応のメカニズムは、ブタ移植片の細胞表面の糖鎖末端に存在する Gal  $\alpha$ 1,3Gal エピトープ ( $\alpha$ -galactosyl epitope) を代表とする多種の糖鎖抗原に対しヒト自然抗体が反応しこれによりヒト補体が活性化されブタ移植片を攻撃するため、と考えられている。そこで、糖鎖工学を用いてこれらのブタ糖鎖抗原の発現を制御し、ヒトに対して抗原性の低い移植用動物 (ブタ) の開発、実用化に向けての基礎研究を行った。

### 【研究のアプローチ】

糖鎖の中でも多分岐構造を形成し、側錯の多様性に富む N-結合型糖鎖に注目した。N-結合型糖鎖の生合成は、5 種類の N-アセチルグルコサミン転移酵素群 (GnTs) により分岐構造が制御されている。その GnTs の中で、N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) は基本となる 2 本錯構造の  $\beta$ -マンノースに N-アセチルグルコサミンを転移し bisecting GlcNAc 構造を形成し糖鎖の立体構造、伸長を大きく変化させることが知られている。今回の研究では、ブタ血管内皮細胞 (SEC) に GnT-III 遺伝子を導入、過剰発現させ、糖鎖末端を修飾することなく細胞表面の糖鎖デザインのリモデリングを行うことで、ヒトに対する抗原性を制御できるかを検討した。

### 【方法】

発現ベクター pCAGGS ( $\beta$ -actin promoter) にヒト GnT-III の cDNA を挿入し、リピッド法により SEC に導入した。ネオマイシンによる選択により安定したクローンを樹立し、以下のアッセイを行った。また、in vivo での有効性を確認するために GnT-III transgenic mice を作成し検討した。

①  $\alpha$ -galactosyl epitope の発現量:  $\alpha$ -galactosyl epitope を特異的に認識する IB-4 レクチンを用いて FACS にて解析し epitope の発現量の変化を見た。

② 抗原性の解析: ヒト正常血清 (NHS) と SEC との反応性を FACS で解析した。

③細胞障害の抑制度：細胞を20%, 40% NHS と反応させ LDH アッセイ法により障害細胞より放出した LDH を測定し % cytotoxicity を計算した。

④糖鎖パターンの変化：細胞より抽出した糖タンパク質を SDS-PAGE で電気泳動し IB-4レクチン, NHS を用いてレクチン及びウェスタンブロットにより解析した。

⑤ GnT-III transgenic mice の作成と抗原性の解析：マウス受精卵に通常のマイクロインジェクション法により pCAGGS/GnT-III を注入し作成した。マウス脾細胞と NHS との反応性を FACS にて解析し抗原性の変化を見た。

#### 【成績】

クローンの樹立：ネオマイシン選択されたクローンを HPLC を使って GnT-III 活性を測定した結果, 410, 640, 3200, 4000 pmol/hr/mg-protein の活性を持った 4 クローンを樹立した。parental SEC には GnT-III 活性は認めなかった。

① GnT-III 低活性クローン (410 pmol/hr/mg-protein) では 50%, 高活性クローン (4000 pmol/hr/mg-protein) では 70%,  $\alpha$ -galactosylepitope の発現量を抑制した。②ヒトに対する抗原性では parental SEC に比し低活性クローンでは 65%, 高活性クローンでは 80%, ヒト自然抗体との結合を抑制し GnT-III transfectants の抗原性は低下した。

③低活性クローンでは 50%, 高活性クローンでは 70%, 細胞障害を抑制した。④ GnT-III transfectants 由来の糖タンパク質では 66KDa 以下の糖タンパク質の糖鎖パターンがリモデリングされ, NHS, IB-4 両者に対する反応性が著明に減少した。⑤ GnT-III transgenic mice 由来の脾細胞では正常マウス由来脾細胞と異なり脾細胞へのヒト自然抗体の結合は強く抑制され, 抗原性が著しく抑制されていることが確認された。

#### 【総括】

N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) による N-結合型糖鎖根部での糖鎖デザインのリモデリングにより, ブタのヒトに対する抗原性を著明に抑制できた。このアプローチは, 移植用ブタの開発への有効な手段の一つと考える。

### 論文審査の結果の要旨

これまでブタ異種抗原を制御する方法としては,  $\alpha$ 1,3 ガラクトース転移酵素と基質を共通にする  $\alpha$ 1,2 フコース転移酵素を用いた酵素拮抗阻害法が唯一の方法であり, これは糖鎖末端の修飾法であった。

本研究では, 糖鎖の中でも多分岐構造を形成し側鎖の多様性に富み抗原性が高いと考えられる N-結合型糖鎖に着目し, 糖鎖根部で分岐構造の生合成に作用する N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) を本来その発現が極めて少ないブタ血管内皮細胞に強制発現させ, 細胞表面の糖鎖デザインをリモデリングするという独創的なアプローチによりヒトに対するブタの抗原性を抑制することに成功した。

この方法はブタ血管内皮細胞を用いた *in vitro* だけでなく, GnT-III トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* でも有効性が確認されており, 移植用動物 (ブタ) への応用は可能であると考えられる。

本研究の成果は移植用動物の開発, 実用化を大きく進めるものであり, 学位の授与に値するものとする。