

Title	Regulation of complement-mediated swine endothelial cell lysis by a surface-bound form of human C4b binding protein
Author(s)	三方, 彰喜
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40791
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	三 方 彰 喜
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13768 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 医学研究科外科系専攻
学位論文名	Regulation of complement-mediated swine endothelial cell lysis by a surface-bound form of human C4b binding protein (膜型ヒトC4b binding protein によるブタ血管内皮細胞におけるヒト補体細胞障害の抑制)
論文審査委員	(主査) 教授 白倉 良太 (副査) 教授 松田 暉 教授 木下タロウ

論文内容の要旨

【背景ならびに目的】

移植医療におけるドナーの不足を補う手段としてブタからヒトへの異種移植 (Discordant xenotransplantation) が注目されている。しかし、この移植の際には移植後分単位で進行する超急性拒絶反応により臓器は拒絶される。超急性拒絶反応とは異種臓器上の異種抗原と自然抗体が反応し、それによる補体の活性化が中心的役割を果たし、異種臓器を拒絶する反応である。この補体の活性化を抑制することにより異種臓器の生着延長が可能となると考えられている。既にヒト補体制御因子 DAF(decay accelerating factor), MCP(membrane cofactor protein), CD59を異種細胞上に発現させることによりヒト補体による細胞障害を抑制することが証明されている。本研究では、血漿中で補体古典経路を制御する補体制御因子 C4b binding protein(C4bp) を膜型とし、ブタ血管内皮細胞上に発現させ、これによる細胞障害抑制効果を検討した。

【方法】

(1)ヒト C4bp の α 鎖及びヒト DAF の GPI(glycosyl phosphatidyl inositol)-anchor のハイブリッドcDNA を発現ベクター; pCXN2に組み込み、lipofection 法を用いて培養ブタ血管内皮細胞にトランスフェクションした。選択培地とした後、C4bp 発現株を作成した。発現した一量体 C4bp(C4bp-PI) はモノクローナル抗体を用いた flow cytometry により検出し、cell lysate を用いた Western blotting により分子量を確認した。更に¹²⁵I でラベルしたモノクローナル抗体を用いた ligand binding assay により血管内皮細胞膜表面の C4bp-PI を定量した。(2) C4bp-PI の Factor I に対するコファクター活性を検討するため、トランスフェクタントの cell lysate(1.6×10^6 個/ml) と Factor I を蛍光ラベルした補体 C3 及び C4 と 2 時間反応させ、その分解度を SDS-PAGE で検討した。(3) Factor I に対するコファクター活性の強さを他の補体制御因子 MCP, Factor H, CR1(complement receptor type 1) 及び C4bp(7量体) と比較するため、(2)と同様に Factor I と蛍光ラベルした補体 C3 及び C4 を 2 時間反応させ、その分解度を SDS-PAGE で検討した。(4) C4bp-PI 発現ブタ血管内皮細胞株におけるヒト補体細胞障害抑制効果を検討するため、正常ヒト血清と 2 時間反応させ、その細胞障害を lactate dehydrogenase(LDH) assay にて測定した。

【成績】

(1)flow cytometryにより C4bp-PIを高発現(mean sift value 29.9)したものと、中等度発現(mean sift value14.5)した SEC 2株を樹立し、以下の実験に用いた。トランスフェクタントの Western blotting では分子量約70kDaの蛋白を検出した。ligand binding assay の Schatchard analysis では高発現株一細胞あたり 152×10^4 個の C4bp-PI分子を認めた($K_d = 3.4 \times 10^{-8} M$)。 (2)血漿中の C4bp (7量体)は Factor I のコファクターとして C3をほとんど分解しないのに対して C4bp-PIは C4及び C3を分解した。 (3)Factor I に対するコファクター活性の強さは C4に対して C4bp (7量体) $>$ MCP \approx CR1 \approx Factor H \approx C4bp-PIであった。また C3に対しては MCP $>$ Factor H $>$ CR1=C4bp-PI $>$ C4bp (7量体)であった。 (4)LDH assay では20%ヒト血清に対して高発現株では $75.2 \pm 17.1\%$ の、中等度発現株では $60.6 \pm 10.2\%$ の細胞障害抑制率を認めた。40%ヒト血清に対しては高発現株で $73.6 \pm 12.8\%$ の、中等度発現株では $54.1 \pm 9.7\%$ の細胞障害抑制率を認めた。

【総括】

- (1)補体古典経路を制御する補体制御因子 C4bpを膜型とし、ブタ血管内皮細胞上に発現させた。
- (2)膜型 C4bp (1量体)は C4に対してコファクター活性を有した。
- (3)膜型 C4bp (1量体)は C3に対してもコファクター活性を有した。
- (4)膜型 C4bpはこれまで最も有効な補体制御因子とされてきた DAF とほぼ同程度の細胞障害抑制効果を有した。
- (5)移植用ブタの開発において、膜型 C4bpは有効な補体制御因子の一つであることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

異種移植における超急性拒絶反応の原因である補体の活性化を制御するため、補体制御因子の研究が進められている。補体制御因子には種差が存在するためヒト補体の活性化を抑制するにはヒト補体制御因子を用いる必要がある。

本研究は補体活性化の古典経路を抑制する液相中の補体制御因子であるヒト C4bpの α 鎖に DAF の GPI-anchorを付け、ブタ血管内皮細胞に遺伝子導入し、膜型(一量体)として発現させ、そのヒト補体による細胞障害抑制効果を検討したものである。C4bpは Factor I のコファクターとして補体 C4bを分解すると共に、C3の convertaseである C4b2aの解離失活を促進するが、一量体にすることで補体 C3bに対する Factor I のコファクターとしての活性が強まり、補体 C3bの分解が亢進した。また、補体 C4bに対するコファクター活性も維持された。ヒト補体・抗体の供給源としての正常ヒト血清と2時間反応させた場合、C4bp(一量体)発現株における細胞障害抑制率は76%で、ヒト補体による細胞障害を強く抑制した。

膜型 C4bpによる補体制御の有効性は本研究で初めて明らかにされたものであり、今後移植を目的とした動物の開発において有用な知見である。

以上の点から本研究は学位に値するものと考えらる。