

Title	Reduction of the major xenoantigen on glycosphingolipids of swine endothelial cells by various glycosyltransferases
Author(s)	小間, 勝
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41747">https://hdl.handle.net/11094/41747</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	小間 勝 <small>まさる</small>
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15326 号
学位授与年月日	平成12年 3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Reduction of the major xenoantigen on glycosphingolipids of swine endothelial cells by various glycosyltransferases (糖転移酵素遺伝子導入による糖脂質異種抗原の抑制)
論文審査委員	(主査) 教授 白倉 良太  (副査) 教授 松田 暉 教授 谷口 直之

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

超急性拒絶反応の原因は主に異種細胞表面に存在する $\alpha$ -galactosyl epitope ( $\alpha$  Gal epitope) にヒト自然抗体が反応し、活性化された補体が異種細胞を破壊するためとされている。

$\alpha$  Gal epitopeは糖タンパク糖鎖と糖脂質糖鎖の末端に存在する糖鎖構造で、*N*-acetylglucosamine をアクセプター基質とする $\alpha$  1,3 galactosyltransferase によって合成される。旧世界サル以上の高等動物ではこの $\alpha$  1,3 galactosyltransferase 遺伝子の2箇所に point mutation が起こり発現しなくなっており、逆に自然抗体として抗 $\alpha$  Gal 抗体を持っている。

本研究では、 $\alpha$  Gal epitope 抑制に有効と考えられる糖転移酵素を $\alpha$  Gal epitope の抑制機構の違いにより2つに分類しブタ血管内皮細胞 (Swine endothelial cell : SEC) にそれぞれ遺伝子導入し $\alpha$  Gal epitope の抑制効果について検討した。

#### 【方法と成績】

##### (方法)

##### I. 糖転移酵素の分類

グループ I : GnT-III (抑制機構 : N 結合型糖鎖に存在する tri-mannose core (tri-mannose core は N 結合型糖鎖を特徴づける糖鎖構造で糖脂質の糖鎖には存在しない) に作用し bisecting GlcNAc を合成する。でき上がった bisecting 構造により他の分岐を進まず糖転移酵素の作用がなくなり、糖鎖の枝数が減少する。すなわち枝数の減少分が $\alpha$  Gal epitope の減少分であることが糖鎖構造解析により証明されている)

グループ II : ST3Gal III ( $\alpha$  2,3 sialyltransferase)、ST6Gal I ( $\alpha$  2,6 sialyltransferase)、 $\alpha$  1,2 FT ( $\alpha$  1,2 fucosyltransferase) (抑制機構 :  $\alpha$  Gal epitope の生合成を触媒する糖転移酵素 $\alpha$  1,3 galactosyltransferase と基質を共通とし、遺伝子導入した糖転移酵素が細胞内で過剰発現するため $\alpha$  Gal epitope の基質である *N*-acetylglucosamine に強く作用し基質を奪う事による)

##### II. 実験内容

1. 遺伝子導入 : この4つの糖転移酵素遺伝子をリポフェクション法にて SEC にそれぞれ遺伝子導入した。
2. 酵素活性測定 : ピリジルアミノ化した lacto-N-neotetraose、bi-antennary sugar をアクセプター基質とし

HPLCにより測定した。

3. FACS解析：細胞表面の $\alpha$  Gal epitope量の変化をNHS、GSIB 4を用いて解析した。
4. LDH assay：細胞傷害抑制率を解析した。
5. ウェスタン及びレクチンブロッティング：細胞全体の糖タンパクの抗原性の変化をNHS、GSIB 4を用いて解析した。
6. D-PDMPによるParental SECの糖脂質生合成抑制：糖脂質糖鎖末端に $\alpha$  Galが存在することは報告されているがその存在量についての報告はない。そこで細胞の糖脂質生合成を抑制する物質であるD-PDMPでParental SECを処理し糖脂質の生合成を抑制した細胞を作成、NHS及びGSIB 4に対する反応性について解析した。
7. 薄層クロマトグラフィー：遺伝子導入株の糖脂質の $\alpha$  Gal量の変化を解析した。各遺伝子導入株の中性糖脂質画分を抽出分離し薄層クロマトグラフにて展開しオルシノール染色を行った。次に同様に中性糖脂質画分を展開した薄層プレートをHNS、GSIB 4で染色した。

#### 【成績】

1. G418によるselectionより各糖転移酵素のブタ血管内皮安定発現株を樹立した。
2. 酵素活性値はGnT-III遺伝子導入株は1200、ST 6 Gal Iは2300、ST 3 Gal IIIは180、 $\alpha$  1、2 FTは350pmol/h/mg-proteinの活性値を認めた。
3. FACS解析による細胞表面の $\alpha$  Gal epitopeの抑制効果はグループIでは50-60%、グループIIでは70-80%であった。
4. LDH assayによる細胞傷害率の抑制効果はグループIでは約50%、グループIIでは70-80%であった。
5. ウェスタン及びレクチンブロッティング解析では糖タンパクの $\alpha$  Gal epitopeはグループIとIIで明らかに抑制された。
6. D-PDMP処理をしたParental SECは処理前に比べ約20% FACS値が減少した。
7. 薄層クロマトグラフィーの解析では、変化を認めなかった。NHS及びGSIB 4による中性糖脂質画分の薄層プレートの染色では $\alpha$  GalはグループIでは約20%程度の減少を認めたが、グループIIでは60-80%と高率に減少した。

#### 【総括】

1. ブタ血管内皮細胞にGnT-III、ST 6 Gal I、ST 3 Gal III、 $\alpha$  1、2 FT遺伝子をそれぞれ遺伝子導入し $\alpha$  Gal epitopeの抑制効果について検討した。
2. グループI及びグループIIの糖転移酵素はいずれも糖タンパク糖鎖末端の $\alpha$  Gal epitopeの抑制に有効であった。
3. 糖脂質の解析の結果では、グループIでは $\alpha$  Gal epitopeの抑制効果は軽度であったが、グループIIでは明らかに抑制された。
4.  $\alpha$  Gal epitopeの抑制においてはグループIよりグループIIの糖転移酵素の方がより有効であることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

移植医療におけるドナー不足対策の一つとしてブタの臓器をヒトに移植する異種移植が世界的に注目されている。本研究はブタからヒトへの異種移植の最大の障壁である超急性拒絶反応の原因となる異種抗原の抑制について検討したものである。

異種抗原の大部分を占める $\alpha$  Gal epitopeの生合成を抑制する4つの糖転移酵素GnT-III、ST 6 Gal I、ST 3 Gal III、 $\alpha$  1、2 FTをそれぞれブタ血管内皮細胞に遺伝子導入し、その効果と抗原の分布特性の解析を行った。これら糖転移酵素のうち、GnT-IIIはN結合型糖鎖に作用し糖鎖構造をリモデリングすることで $\alpha$  Gal epitopeの合成を阻害するのに対し、後3者は $\alpha$  Gal epitope合成酵素を拮抗阻害するとされている。実験結果は、①上記糖転移酵素を過剰発現したブタ血管内皮細胞クローンにおいては $\alpha$  Gal epitopeが50~80%減少していた。②ヒト自然抗体と補体による細胞傷害が50~80%抑制された。③糖蛋白質糖鎖上の $\alpha$  Gal epitope抑制効果は上記4酵素間に差を認めなかつ

た。④これまで糖脂質糖鎖上の $\alpha$  Gal epitope量は不明であったが、本研究にて総抗原量の約20%が糖脂質に存在することが確認された。⑤糖蛋白に強い基質特異性を有すると考えられていた糖転移酵素ST 6 Gal I、ST 3 Gal IIIを過剰発現させたところ糖脂質糖鎖に対しても作用し $\alpha$  Gal epitopeを抑制していることが判明した。

以上より、作用機序の異なる糖転移酵素の同時遺伝子導入により、抗原性の低いトランスジェニック=ブタ作成の可能性が示唆され、ドナー不足の対策としての異種移植に大いに貢献する研究成果であると評価した。よって学位に値するものと認める。