

Title	Function of Human Factor H and I on Xenosurface
Author(s)	吉龍, 正雄
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41859
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	よし たつ まさ お 吉 龍 正 雄
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 5 3 0 5 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	Function of Human Factor H and I on Xenosurface (ヒト補体制御因子 factor H 及び factor I の異種細胞表面上での機能)
論文審査委員	(主査) 教授 松田 暉 (副査) 教授 白倉 良太 教授 木下タロウ

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

移植医療におけるドナー不足の解決策の1つとしてブタからヒトへの異種移植の研究が進んでいる。ブタからヒトへの異種移植では、移植臓器が異種抗原を有しヒトの血中に異種抗原に対する自然抗体が存在することにより、レシピエント、即ちヒトの補体の活性化が引き起こされ、移植臓器は速やかに拒絶される（超急性拒絶反応）。一方、ヒトの血清中または細胞膜上には種々の補体制御因子が存在し補体による自己組織の損傷を防いでいる。ヒトに移植されたブタの臓器にはブタの補体制御因子が存在するが、種差のためヒトの補体の活性化を十分に抑制できない。そこで超急性拒絶反応を防ぐ手段の1つとしてヒトの補体制御因子を遺伝子工学的手法によりブタに発現させることが考えられてきた。ヒト補体制御因子のうち decay accelerating factor (DAF) は膜型で強力な補体抑制作用を有し、従来よりヒトの DAF を発現した transgenic pig が開発され、霊長類への臓器移植がなされているが、いまだ十分な期間の生着を得られていない。この理由の1つとして、DAF には移植臓器上に付着した補体成分である C 3 b、C 4 b を直接分解する作用がなく、これらの残存した補体が移植臓器への拒絶反応を引き起こすことが考えられる。一方、補体制御因子 factor I は factor H などの cofactor の存在下で C 3 b、C 4 b を直接分解する。factor H 及び factor I は膜型ではなく血清中に存在するため、異種移植においても C 3 b、C 4 b をある程度分解するが、我々はこれらを膜型にして移植臓器上に高度に発現させた方が、移植臓器上に付着した C 3 b、C 4 b を更に強力に分解し、DAF と併用すれば移植臓器の生着期間の延長に寄与するものと考えた。そこで、ヒト補体制御因子 factor H 及び factor I を膜型として異種細胞上に発現させ得るかどうか、更に異種細胞上に発現させ得た場合、ヒト血清に対する補体抑制効果を保持しているかどうかを in vitro で検討した。

【方法ならびに成績】

(方法) ヒト factor H のこれらの機能を司る domain は short consensus repeat (SCR) の 1 - 4 に存在するので、factor H に関してはこの部分のみを DAF の glycosylphosphatidylinositol (PI) anchor につけて膜に発現させることとした (mini factor H)。PCR 法を用いてヒト factor H の SCR 1 - 4 をコードした cDNA を合成し、これに PI anchor を付け、発現ベクター; pCXN 2 にサブクローニングした。また、ヒト factor I の全長をコードした cDNA を PCR 法を用いて作製し、同様に PI anchor をつけ pCXN 2 にサブクローニングした。これらのプラスミドを lipofection 法または electroporation 法を用いて、ブタ血管内皮細胞 (swine endothelial cell : SEC) 及び Chinese

hamster ovary cell (CHO) に transfection した。Geneticin 選択し、stable clone を作製した。各クローンに対しそれぞれ factor H または factor I に対する抗体を用いて flow cytometry を行い、クローンの可溶化液に対し Western blotting を行って蛋白の発現を確認した。更に、各クローンを 20% 及び 40% ヒト血清と反応させ、LDH assay を用い細胞傷害抑制率を検討した。また、factor I/CHO に対しこれより発現量の高いヒト DAF/CHO をコントロールとして、10% 及び 20% ヒト血清と反応させた後、細胞表面に残存する C 3、C 4 を flow cytometry にて定量化した。

(成績) mini factor H は SEC に発現し得た。factor I も CHO 及び SEC に発現し得たが、今回の実験では SEC では CHO に比べ十分な発現量を呈したクローンは得られなかった。補体抑制効果は 20% ヒト血清、40% ヒト血清それぞれに対し mini factor H/SEC ; $43.6 \pm 4.1\%$ 、 $27.7 \pm 3.6\%$ 、factor I/SEC ; $44.8\% \pm 4.7\%$ 、 $10.1 \pm 4.6\%$ 、factor I/CHO ; $63.3 \pm 5.5\%$ 、 $63.0 \pm 9.0\%$ であった。factor I/CHO、及び factor I/SEC を可溶化したものは cofactor の存在下でヒト C 3b 及び C 4b を分解した。mini factor H/SEC を可溶化したものは factor I の存在下で C 3b を分解した。10% 及び 20% ヒト血清と反応させた後の細胞表面に残存した C 3、C 4 量は factor I/CHO の方が DAF/CHO より有意に低下した。

【総括】

本研究では元来血清中に存在するヒト factor H 及び factor I を膜型として異種の細胞表面上に発現させることに成功した。さらにこれら膜型ヒト factor H 及び factor I は異種細胞表面上でもヒトの補体に対し十分な抑制効果を発揮する事が明らかとなった。これより膜型ヒト factor H 及び factor I を DAF と共発現させた transgenic pig を作製し、霊長類への異種移植に使用すれば、移植臓器の生着期間が延長する可能性があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

異種移植に関する研究は現在活発に進められているが、現在までに報告されている補体制御因子を発現させた transgenic pig を用いた霊長類への異種移植実験では、臨床応用に耐え得るような十分な結果を得られていない。今後、補体制御因子 factor H 及び I を発現させた transgenic pig が必要とされる可能性も高く、本研究が異種移植の発展に十分に寄与するであろうことが予想される。また、補体制御因子 factor I に関しては未だ未知の部分が多く、特に本研究のように PI anchor をつけて膜型にし異種の細胞膜上に発現させたという点は極めて独創的であり、異種移植のみならず免疫学的にも興味のある発表である。以上より本研究を学位に値するものと認める。