The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The significance of N-linked glycosylation in pig endogenous retrovirus infectivity
Author(s)	狭間, 研至
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45378
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名	狭間研至（はざまけんじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　18520　号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	The significance of N-linked glycosylation in pig endogenous retrovirus infectivity （ブタ内在性レトロウイルス感染におけるN結合型糖鎖の重要性）
論文審査委員	（主査） 教授　松田　暉 （副査） 教授　谷口　直之　　教授　松浦　善治

論文内容の要旨

〔目　　的〕

臓器移植医療における、絶対的なドナー不足を解決する手段の一つとして、ヒトと生理学的・解剖学的特性が近く、倫理的問題が少ないブタを用いた異種移植が期待されている。しかし、すべてのブタのゲノム内には、ブタ内在性レトロウイルス（Porcine Endogenous Retro Virus : PERV）が存在すると言われている。一般に、レトロウイルスは免疫不全疾患や悪性腫瘍を惹起することが知られており、また、PERVはヒト細胞に感染指向性を持つと考えられているため、ブタ臓器をヒトに移植した際、PERVによる新たな人獣共通感染症の発現が危惧されている。

現在、ブタの抗原性を低下させる種々の糖転移酵素や、ヒト補体制御因子を発現させた遺伝子改変ブタおよび、α-Gal抗原ノックアウトブタの作成により、超急性拒絶反応は克服されつつあり、ブタを用いた異種移植の臨床応用も近いと考えられている。しかし、その実現に不可欠なPERVの系統的感染制御法は報告がなく、また、そのメカニズムも明らかにされていない。

本研究の目的は、PERVのヒト細胞への感染における、N結合型糖鎖の関与について検討することとした。

〔方　　法〕

ウイルス産生細胞はブタ血管内皮細胞(PEC)に、Lac Z遺伝子を導入後、PERVのサブタイプの一つであるPERV-Bを感染させた細胞（PEC (Lac Z) /PERV-B）を、感染の標的細胞にはヒト胎児腎細胞株であるHEK293細胞を用い、Lac Z pseudo type assayにて青く染色された細胞を感染細胞として計数した。

まず、PEC（Lac Z）/PERV-Bを、N結合型糖鎖の合成を完全に阻害するTunicamycin（TM）、および、N結合型糖鎖をマンノース・コア部で切断するβ-mannosidaseで処理することにより、PERV表面の糖鎖を改変し、それぞれの感染細胞数を計数した。

次に、N結合型糖鎖合成過程で糖鎖末端のglucoseを遊離させるα-glucosidaseの阻害薬であるCastanospermine（CS）、および1-deoxynojirimycin（dNM）、そして、N結合型糖鎖合成過程で、マンノースのトリミングを促進させるα-mannosidase I、およびIIの阻害薬である1-deoxymannojirimaycin（dMN）、およびSwainsonine（SS）

で処理し、それぞれの感染細胞数を計数した。

さらに、α-mannosidase I を溶液中に０、１、２、４、８単位加えて、PEC（Lac Z）/PERV-B を処理し、それぞれの感染細胞数を計数した。

〔成　　績〕

薬剤処理しないコントロールの PEC（Lac Z）/PERV-B では、感染細胞数は、352.2±359.0 個であったのに対し、TM および、β-mannosidase 処理した場合には 0 個と感染は完全に阻止された。

また、CS 処理では 227.9±181.4 個、dNM 処理では、212.4±143.4 個と、コントロールに比して感染細胞数は有意（$p<0.05$）に減少した。一方、dMN 処理では 783.4±384.3 個、SS 処理では 674.3±359.3 個と感染細胞数はコントロールに比して有意（$p<0.005$）に増加した。

PEC（Lac Z）/PERV-B をα-mannosidase I にて処理すると、感染細胞数は、０単位：339.8±99.6 個、１単位：99.6±38.7 個、２単位：18.5±19.8 個、４単位：3.8±5.8 個、８単位：０個と、α-mannosidase I の濃度依存性に低下した（$p<0.005$）。

なお、いずれの実験においても、PERV-B プライマーによる RT-PCR にて、ウイルス産生細胞上清中に、ウイルス粒子の存在が確認された。

〔総　　括〕

1）PERV 表面の糖鎖プロセシングを阻害・促進させることにより、PERV のヒト細胞への感染に及ぼす影響を、Lac Z pseudotype assay を用いて検討した。

2）TM 処理、β-mannosidase 処理にて感染が完全に阻止された。

3）CS 処理、dNM 処理にて感染細胞数が減少し、dMN 処理、SS 処理にて感染細胞数が増加した。

4）α-mannosidase I 処理により、濃度依存性に感染細胞数が減少した。

5）以上より、PERV 表面の N 結合型糖鎖のうち高マンノース型糖鎖が PERV のヒト細胞への感染に重要な役割を果たしていることが示された。

論文審査の結果の要旨

臓器移植医療における絶対的なドナー不足を解消する手段として、ブタを用いた異種移植が期待されている。しかし、その臨床応用にはヒト細胞へのブタ内在性レトロウイルス（PERV）感染を制御しなければならず、そのためには、PERV のヒト細胞への感染のメカニズムの解明が必要である。

本研究では、ウイルス表面の N 結合型糖鎖に着目し、そのプロセシングを阻害・促進させた場合のヒト細胞への感染性の変化を、ウイルス産生細胞にブタ血管内皮細胞、標的細胞にヒト 293 細胞を用いた Lac Z pseudotype assay にて検討し、PERV 感染における N 結合型糖鎖の関与を検討した。

293 細胞への PERV 感染実験において、ブタ血管内皮細胞の N 結合型糖鎖合成を選択的に阻害、また、N 結合型糖鎖をマンノース・コアで切断すると感染は阻止された。

さらに、糖鎖末端のグルコースを切断するα-glucosidase を阻害すると感染は減弱したが、マンノースのトリミングを促進させるα-manosidase I、II を阻害すると感染は増強した。また、α-mannosidase I 処理で濃度依存性に感染は減弱した。

以上より、PERV のヒト細胞への感染における、PERV 表面の N 結合型糖鎖の関与が明らかとなり、特に、高マンノース型糖鎖が重要な役割を果たしていることを示した。

本研究結果は、遺伝子改変ブタを用いた異種移植における PERV 感染の防御に寄与すると考えられ、学位の授与に値するものと認める。