The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Effect of hybrid complement regulatory proteins on xenogeneic cells
Author(s)	福田, 大輔
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46234
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

【123】

氏　　名	福　田　大　輔（ふくた　だいすけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２０５４２　号
学位授与年月日	平成 18 年３月 24 日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学　位　論　文　名	Effect of hybrid complement regulatory proteins on xenogeneic cells （異種細胞上におけるハイブリッド型補体制御因子の補体抑制効果）
論文審査委員	（主査） 教　授　白倉　良太 （副査） 教　授　木下タロウ　　教　授　福澤　正洋

論文内容の要旨

〔目　　的〕

臓器移植におけるドナー不足の解決策としてブタの臓器をヒトに移植する異種移植が注目されている。しかし、異種移植ではブタ臓器上の異種抗原にヒト自然抗体が結合し、補体が活性化することによりブタ臓器が破壊される超急性拒絶反応（HAR）が引き起こされる。そこで、補体活性化を抑制するため、decay accelerating factor（DAF）や membrane cofactor protein（MCP）など補体制御因子の遺伝子導入ブタの開発が行われている。

DAF は強い補体制御能を有し、異種移植において HAR の回避に有用であると考えられている。しかし、DAF は補体成分の C4b や C3b を切断することができないため、これらが異種細胞上に付着すると、分解処理することができない。これが HAR を回避した後に引き起こされる急性血管性拒絶反応（AVR）の原因の一つとして考えられている。

このことより、異種移植において細胞上への補体成分の沈着を抑制することは重要な課題であり、本研究では補体の沈着を抑制するための２つの方法を試みた。①DAF よりも補体経路の上流で抑制する C1 esterase inhibitor（C1-INH）単独あるいは DAF や MCP と連結させたハイブリッド型補体制御因子を異種細胞上に発現させ、その補体沈着の抑制効果を検討した。②補体成分を分解する factor I のコファクターである MCP 及び complement receptor typel（CR1）、C4b-binding protein（C4bp）を異種細胞に発現させ、その補体沈着の抑制効果の比較検討を行った。

〔方　　法〕

DAF 及び C1-INH、MCP、CR1、C4bp の補体抑制機能を有する領域の cDNA を各々準備し、次に、C1-INH と DAF 及び MCP を連結させた cDNA（C1＋DAF、C1＋MCP）を構築した。これらの補体制御因子と DAF の PI-アンカーを連結した cDNA（C1-INH-PI、MCP-PI、CR1-PI、C4bp-PI、C1＋DAF-PI、C1＋MCP-PI）を発現ベクターpCXN（プロモーター：チキンβアクチン）に組み込み、リポフェクション法を用いて CHO 細胞に遺伝子導入した。ネオマイシン選択培地で培養し、安定したクローンを樹立し、下記の評価を行った。

①FACS 解析により、各補体制御因子の細胞表面上の発現量を評価した。

②ヒト補体を介した細胞傷害の抑制効果を検討するため、ヒト血清及び抗 CHO 抗体と２時間反応させた後、lactate dehydrogease (LDH) assay による細胞傷害率の測定により評価した。

③補体沈着の抑制効果を検討するため、ヒト血清及び抗 CHO 抗体と 15 分反応させた後、抗ヒト補体抗体を用いた FACS 解析による補体沈着量の測定により評価した。

〔 成　　績 〕

(1)DAF 及び MCP、C1-INH のハイブリッド型補体制御因子について

①DAF を高発現、MCP-PI 及び C1-INH-PI を中等度発現する細胞株を樹立した。また、C1＋DAF-PI 及び C1＋MCP-PI を高発現する細胞株を樹立した。

②LDH assay の結果、C1-INH-PI は MCP-PI と比べ補体を介した細胞傷害を強く抑制した。また、C1＋DAF-PI 及び C1＋MCP-PI、DAF は補体を介した細胞傷害をさらに効果的に抑制した。

③補体沈着量の測定の結果、DAF ではコントロールと比較して C3 の沈着を約 85%抑制したが、C4 の沈着は全く抑制しなかった。MCP-PI は C3 の沈着を 36%抑制したが、C4 の沈着は抑制しなかった。一方、C1-INH-PI は C4 の沈着を 33～44%、C3 の沈着を 47%抑制した。さらに、C1＋DAF-PI 及び C1＋MCP-PI も同様に、C3 及び C4 の沈着を抑制した。

(2)コファクター（MCP、CR1、C4bp）のハイブリッド型補体制御因子について

①MCP-PI 及び CR1-PI、C4bp-PI を同レベル発現した細胞株を各 3 クローン樹立した。

②LDH assay の結果、MCP-PI 及び CR1-PI はヒト補体による細胞傷害を強く抑制した。MCP-PI 及び CR1-PI と比べ、C4bp-PI は細胞傷害の抑制効果は弱かった。

③補体沈着量の測定の結果、CR-1-PI は C3 の沈着を 81%抑制したが、C4 の沈着は抑制しなかった。また、MCP-PI は C3 の沈着を 20-40%抑制したが、C4 の沈着は抑制しなかった。一方、C4bp-PI は C4 及び C3 の沈着をわずかに抑制した。

〔 総　　括 〕

本研究では、異種移植における補体による細胞傷害の抑制には DAF だけではなく、MCP-PI や C1-INH-PI、CR1-PI も有効であり、C4 の沈着の抑制には DAF よりも C1-INH-PI や C4bp-PI が有効であることが示唆された。これらのハイブリッド補体制御因子は異種移植用ブタの開発に有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

異種移植において、超急性拒絶反応の回避後に引き起こされる急性血管型拒絶反応を制御することは重要な課題である。この原因の一つが異種臓器への補体沈着であり、本研究では補体沈着の抑制について二種類の方法を検討したものである。

第 1 に補体の活性化を初期段階で抑制する C1-INH 及び C1-INH と DAF、MCP を連結したハイブリッド型補体制御因子を細胞上に発現させる方法である。DAF や MCP は C3 の沈着のみを抑制したのに対し、C1-INH やハイブリッド型補体制御因子は C3 だけでなく C4 の沈着も抑制することが明らかになった。

第 2 に補体成分の分解機能を有するコファクターである MCP、CR1、C4bp に PI アンカーを連結し細胞上に発現させ、沈着した補体を分解する方法である。MCP、CR1 は C3 の沈着のみを抑制し、C4bp は C4 及び C3 の沈着をやや抑制することが確認された。

これらのハイブリッド型補体制御因子（特に C1-INH＋DAF）による補体沈着に対する有効性は本研究により明らかにされたことであり、今後の異種移植用ブタの開発において有用な知見である。

以上のことから本研究は学位に値するものと考える。