

Title	Significant inhibition of human CD8+ cytotoxic T lymphocyte-mediated xenocytotoxicity by overexpression of the human decoy Fas antigen
Author(s)	川本, 弘一
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46317
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	川本 弘一
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 20161 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 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Significant inhibition of human CD8 ⁺ cytotoxic T lymphocyte-mediated xenocytotoxicity by overexpression of the human decoy Fas antigen (ブタ-ヒト異種移植におけるレシピエント CD8 ⁺ CTL による細胞傷害メカニズムの解明とその制御: ヒト decoy Fas 抗原過剰発現によりヒト CD8 ⁺ CTL 異種細胞傷害性は回避できる)
論文審査委員	(主査) 教授 福澤 正洋 (副査) 教授 長田 重一 教授 白倉 良太

論文内容の要旨

[目 的]

1 型糖尿病の根治療法として膵臓及び膵島移植が挙げられる。しかしながら、深刻なドナー不足のため移植を受けることが出来る患者は極一部である。このドナー不足の解決法として異種(ブタ)の臓器をヒトに移植する Discordant 異種移植が臨床応用に最も近い方法として期待されている。しかし、レシピエントであるヒトの CD8⁺ CTL はブタ異種細胞に対し強い細胞傷害性を有し長期生着を阻むハードルとなっている。本研究ではヒト CTL による異種細胞傷害性のメカニズムを解明し、[1] ヒト decoy Fas 抗原(細胞質 death domain を除去し death signal を伝達できない“おとり” Fas) [2] 膜型 FasL (metalloproteinase 作用部位を delete し shedding を受けない膜上安定型の FasL) を異種細胞に発現させ、ヒト CTL 傷害性の制御について解析した。

[方 法]

1) *in vitro* CD8⁺ CTL 誘導: 健常成人末梢血より分離した PBMC を、放射線照射したブタ血管内皮細胞株 (SEC) を刺激細胞として、ヒト IL-2 を 50 U/ml の濃度で培養液に加え 14 日間混合培養し活性化リンパ球を誘導、これより磁気ビーズを用いて CD8⁺ CTL のみ分離、細胞傷害 assay の effector 細胞とした。

2) 細胞傷害 assay 及び blocking assay: 細胞傷害性は SEC 及び SEC transfectant を target cell として ⁵¹Cr release assay を用いて解析した。抗 FasL 抗体および perforin/granzyme 系を特異的に抑制する Concanamycin A を用いて blocking assay を施行した。

3) 遺伝子構築・遺伝子導入: ヒト decoy Fas 抗原、ヒト膜型 FasL の cDNA をヒト elongation factor 1 α をプロモーターとする強力な発現ベクター pEF-BOS に組み込み、それぞれ neomycin 耐性遺伝子と共に lipofection 法にて SEC に遺伝子導入した。各分子の発現は FACS 解析にて確認、G418 による selection にて stable SEC transfectant を樹立、各分子の傷害抑制効果を解析した。

[成 績]

1) ヒト CD8⁺ CTL の細胞傷害性: 誘導された活性化リンパ球における細胞分画は CD8⁺ T CTL 78.1%、CD4⁺ T cell 14.5%で、CD8⁺ T CTL が大部分を占めていた。

2) 細胞傷害 assay 及び blocking assay: Fresh リンパ球は SEC に対し細胞傷害性を認めなかったが、14 日間混合培養したリンパ球より分離したヒト CD8⁺ CTL は SEC に対し E:T 比=50:1 で 82.2±4.9%の強い細胞傷害性を有していた。一方 CD4⁺ T cell の傷害性は 20.2±2.2%にとどまった。CD8⁺ CTL の傷害性は抗 FasL 抗体により 65-88%抑制されたが、Concanamycin A では 12-29%のみ抑制された。

3) Decoy Fas・膜型 FasL クローン の樹立: decoy Fas transfectants を 3 クローン (FACS mean shift intensity (M.S.)=85, 215, 342)、膜型 FasL を 2 クローン (M.S.=60, 127) 樹立した。遺伝子導入による傷害抑制効果: E:T 比=50:1 で CTL 傷害性は decoy Fas 低発現クローン (M.S.=85) では 47±6.3%、decoy Fas 高発現クローン (M.S.=342) では 33.4±5.9%、膜型 FasL 中発現クローン (M.S.=60) では 46.3±3.8%、膜型 FasL 高発現クローン (M.S.=127) では 26.9±3.9%まで傷害性を抑制でき、decoy Fas、膜型 FasL の過剰発現による傷害抑制効果を確認した。

[総 括]

1) *in vitro* において、レシピエントヒト CD8⁺ CTL は異種細胞に対し強い細胞傷害性を有し、さらにこの傷害活性は主として Fas/FasL 系を用いることで発揮されることを証明した。

2) この傷害性を制御するために decoy Fas 及び膜型 FasL を異種細胞に過剰発現させることにより、ヒト CD8⁺ CTL による細胞傷害性は強く抑制できた。この分子発現アプローチはトランスジェニックブタとして応用でき、長期生着できるブタグラフト作出への有効な手段の一つと考えられた。

論文審査の結果の要旨

移植医療は慢性的なドナー不足に直面しており、この解決法としてブタからヒトへの異種移植が注目されている。この異種移植では、液性免疫に引き続いて細胞性免疫がグラフトの長期生着を阻む大きなハードルとして存在しているが、申請者は、レシピエント (ヒト) CD8⁺ 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) によるブタ血管内皮細胞傷害活性の制御を研究テーマとした。傷害抑制分子であるヒト decoy Fas (細胞質内ドメインを除去した“おとり” Fas) および膜型 Fas リガンド (メタロプロテアーゼ作用部位を除去した Fas リガンド) をブタ血管内皮細胞株に遺伝子導入し、ヒト CD8⁺ CTL の細胞傷害制御における有効性を *in vitro* で証明した。これらのアプローチは *in vivo* での効果も期待でき、すなわち将来的には decoy Fas および膜型 Fas リガンド遺伝子を導入したトランスジェニックブタ作製まで応用可能であることが示唆された。これらの研究は、移植医療における慢性的なドナー不足の解決に寄与すると期待され、よって本研究は学位に値するものと考えられる。