

Title	A study of the xenoantigenicity of neonatal porcine islet-like cell clusters (NPCC) and the efficiency of adenovirus-mediated DAF (CD55) expression
Author(s)	大森, 健
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47376
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	おおもり たけし 大 森 健
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 20766 号
学位授与年月日	平成 19 年 1 月 18 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	A study of the xenoantigenicity of neonatal porcine islet-like cell clusters (NPCC) and the efficiency of adenovirus-mediated DAF (CD55) expression (新生児ブタ膵島の異種抗原性に対する DAF 発現による細胞障害抑制効果の検討)
論文審査委員	(主査) 教授 澤 芳樹 (副査) 教授 福澤 正洋 教授 宮崎 純一

論文内容の要旨

[背景]

膵島移植は 1 型糖尿病患者に対する治療法として有効であるが、その需要の拡大によりドナー不足が問題となっている。ドナー源の一つとして異種移植があげられ、ブタ膵島は最も適するといわれてきた。最大の問題である異種拒絶反応の克服が困難であるため実用化は遅れていたが、近年になり Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R (α -Gal) ノックアウト (KO) ブタ、ヒト補体制御因子 (DAF) transgenic ブタ等の遺伝子改変ブタが開発され、異種膵島移植は改めて注目を浴びつつある。

異種移植を実用化するため、我々は成ブタ由来の adult porcine islet (API) の異種抗原性について研究を行ってきたが、API は分離操作が困難で、安定した膵島が得にくく、実用化は困難である。分離操作が容易で、比較的安定した膵島が得られる新生児ブタ由来の neonatal porcine islet-like cell clusters (NPCC) が有用と思われるが、NPCC の異種抗原性についてはいまだ明らかでない。

[目的]

NPCC の α -Gal 抗原、Hanganutziu-Deicher (H-D) 抗原を含む異種抗原性およびヒト補体活性化経路を解析し、アデノベクターを用いた NPCC への DAF 発現効率の解析と DAF 発現 NPCC の補体依存性細胞障害抑制効果により NPCC を用いた膵島移植の可能性を検討した。

[方法]

1. NPCC の作成法：生後 1 - 3 日目の新生児ブタから膵臓を摘出し、コラゲナーゼ V にて消化、500 μ m のナイロンフィルターにとおし、Ham'sF10 にて 5% CO₂、37°C の条件下に 9 日間培養した。
2. 抗原性の解析：NPCC を 20% ヒト血清にて 1 時間培養し、自然抗体の沈着、 α -Gal、H-D 抗原の発現をそれぞれ GSIB4 lectin、anti-H-D 抗体を一次抗体として用い、FACS にて解析した。
3. 糖鎖抗原を (N 型糖鎖合成阻害剤 Tunicamycin、糖脂質合成阻害剤 PDMP、シアル酸除去剤 Neuraminidase)

にて処理し、抗原性の変化を FACS にて解析した。

4. 補体活性化経路の解析: NPCC を 20% ヒト血清にて 15 日間培養し、補体沈着を FACS にて解析した。また Factor D 欠損血清、C1 欠損血清を用いて補体依存性細胞障害性を LDH release にて解析した。

5. CMV をプロモーターとした DAF-アデノベクターを作成し、NPCC に遺伝子導入を行った。DAF 発現を FACS にて解析し、DAF 発現 NPCC の補体依存性細胞障害性抑制効果を LDH release にて解析した。

[結果]

1. NPCC はヒト血清中の IgG、IgM の沈着を認め、 α -Gal、H-D 抗原が発現していた。

2. Tunicamycin 処理にて α -Gal 発現は低下し、ヒト血清に対する抗原性が著明に低下していた。PDMP 処理にて も抗原性は低下していた。Neuraminidase 処理にて H-D 抗原に変化はなかったが、ヒト血清に対する抗原性は低下 していた。

3. NPCC への補体沈着を解析したところ C3、C4、factor B いずれも沈着していた。定量的解析では、EGTA 添加 ヒト血清は非添加血清に対し、約 30% の補体依存性細胞障害性を示した (alternative pathway)。特殊血清を用いた 解析では、Factor D 欠損血清は約 70%、C1 欠損血清は約 26% の細胞障害性を示した。

4. アデノベクターによる NPCC への補体制御因子 (DAF) 発現効率は約 90% であった。DAF 発現 NPCC は、補 体依存性細胞障害性を約 50% 抑制した。

[総括]

NPCC の抗原性は α -Gal 抗原、H-D 抗原を含むシアル酸に関連した non-Gal 抗原が関与していた。また主なる糖 鎖抗原は N 型糖鎖であり、脂質糖鎖も抗原性を示した。NPCC の抗原性を制御するには α -Gal 抗原だけでなく、 non-Gal 抗原も制御する必要性があり、また補体活性化経路は classical pathway、alternative pathway ともに関与 することが明らかとなった。以上より DAF 発現は NPCC 膵島においても異種抗原性に対する細胞障害抑制効果が示 された。今後 α -Gal KO+DAF transgenic ブタの開発により異種拒絶反応をさらに軽減させる可能性があると考えら れた。

論文審査の結果の要旨

異種移植のドナー源である新生児ブタ膵島 (NPCC) の抗原性およびヒト補体活性化経路を解析し、補体制御因子 (DAF) 発現により細胞障害が抑制されるかを検討した。方法: 生後 1-3 日目のブタから摘出した膵臓を分離、9 日間培養、NPCC を作成。 α -Gal、H-D 抗原の発現を FACS にて解析した。次に糖鎖合成阻害薬 (N 型糖鎖、脂質 糖鎖)、シアル酸除去薬処理による抗原性の変化を検討した。補体活性化経路を補体因子欠損血清を用いて検定し、 またアデノベクターによる DAF 発現 NPCC の細胞障害抑制効果を検定した。結果: NPCC は α -Gal、H-D 抗原の発 現を認め、N 型糖鎖阻害、シアル酸除去により抗原性は低下した。補体系は古典的経路、第二経路ともに活性化した。 DAF 発現より NPCC の細胞障害性は抑制された。結語: NPCC の抗原性は N 型糖鎖、シアル酸が関与し、補体によ り細胞障害をうけ、その細胞障害は DAF 発現により抑制された。

以上の内容は、学位に値すると考える。