



Title	Involvement of position-147 for HLA-E expression
Author(s)	松浪, 勝義
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49923
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	まつ 松 なみ 浪 かつ 勝 よし 義
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 5 9 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 21 年 2 月 19 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	Involvement of position-147 for HLA-E expression (HLA-E 発現における 147 番目アミノ酸の関与)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 福澤 正洋 (副査) 教 授 宮坂 昌之 教 授 竹田 潔

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

移植医療の進歩にともなうドナー臓器不足が世界的な問題となっている。この問題を解決する一つの方法としてブタからヒトへの異種移植 (Xenotransplantation) が注目されている¹⁾。異種移植の対象動物としては解剖学的、生理学的にヒトと類似し、倫理上の問題が少なく、加えて繁殖が容易で経済的であるなどの理由からブタ (*sus scrofa*) が最も適していると考えられている。異種移植の際の拒絶反応には超急性、急性、慢性拒絶反応があり、これまでに申請者らを含めた国内外の研究により、超急性拒絶反応に対してはDAF (CD55)やC1インヒビターなどのヒト補体制御因子の遺伝子導入やGnT-III (β 1,4-*N*-acetylglucosaminyl transferase III) 遺伝子導入による細胞表面糖鎖抗原のリモデリングが有効であることが明らかされた¹⁾。最近では、主要抗原の産生に関係する α 1,3-Gal T (α 1,3-galactosyl transferase)遺伝子のホモknock outに加えてDAFおよびGnT-IIIの2つの遺伝子が導入されたdouble transgenic pigの開発まで報告されており、超急性拒絶反応はほぼ克服できたと考えられている¹⁾。そこで現在では超急性拒絶反応の次の障壁である急性拒絶反応の抑制方法の開発が最重要課題として取り上げられている。この急性拒絶反応ではヒトNK細胞による移植ブタ臓器に対する拒絶反応が重要である。NK細胞は標的細胞上のHLA分子を種々のレセプターにより認識し、抑制シグナルを受け取ることが明らかにされており、異種細胞へのHLA分子の遺伝子導入が注目されている。この場合、多型の多いHLA-A,B,C (classical HLAあるいはHLA class Iaと称される)より多型の少ないHLA-GやE分子(non-classical HLAあるいはHLA class Ib)が移植臓器には適していると考えられる。しかし、HLA-E分子はそのまま遺伝子導入しても異種細胞上にほとんど発現しないことが問題となっている。そこでこの問題を解決するために、HLA-E分子の発現に寄与するアミノ酸部位の検索をおこない、ブタ細胞に効率的にHLA-E

分子を発現させる方法の開発を行なうこととした。

〔 方法ならびに成績 〕 HLA分子は一般的に β 2ミクログロブリンと抗原ペプチドの3量体の形成が、安定した発現に重要であることが知られている。よってブタ由来のものとは種差が生じるため安定な複合体が形成できないことが予想された。特にHLA-Eに結合するペプチド配列は特殊で、他のHLA class I分子のリーダーペプチド配列を志向するため、異種細胞では供給ができない。そこで、まず、ヒト β 2ミクログロブリン遺伝子およびHLA-E遺伝子をPCR法によりクローニングし、HLA-Eのリーダーペプチド配列（もともとのHLA-E分子自身のリーダーペプチド配列は結合できない）を結合配列（VMAPRTLVL）になるよう改変した（以下、この改変HLA-EをHLA-Evと称する）。この遺伝子配列を発現ベクターpCXN2L（幹細胞制御学 宮崎教授より供与）に構築し、ブタ血管内皮細胞に遺伝子導入、G418選択して発現株を樹立した。細胞表面のHLA-E発現量をFlow cytometerにより解析したところ、少量ではあるものの発現が認められた。しかし、HLA-Eと比較的高いホモロジーをもつHLA-Gは同時に行なった実験で20倍以上発現量が多く見られた。この発現量の差がどのアミノ酸配列に起因するのか検討を加えるため、このHLA-Ev配列をもとに、HLA-G遺伝子配列との間で種々のキメラ分子を作成し、発現解析を行った。その結果、147番目のアミノ酸をセリンからシステインに一箇所置換する（HLA-Ev(147)と以下称する）ことでHLA-Eの発現が大きく増加することを見出した。変異導入により機能が損なわれる可能性が危惧されたが、ヒト末梢血単核球を用いてヒトNK細胞に対する細胞傷害の抑制効果をCrリリース法により検討した結果、HLA-Ev(147)の遺伝子導入株は、もとのHLA-Evの発現株に比べて有意にNK細胞による傷害性を抑制していることが明らかにになった。

〔 総 括 〕
本研究により、HLA-Eの147番目のアミノ酸（セリン）をシステインに変異させると細胞表面への発現量が大きく増加することが示された。この置換は水酸基(OH)からチオール基(SH)への1原子の変化であり、加えてOとSとは周期表上の同族原子同士であるため変異の程度は最小である。またNK細胞に対する抑制効果にも有意な増強が見られたことから、このHLA-Ev(147)配列は異種移植への応用に有効な遺伝子素材になりうることが示された。

1) Miyagawa S. Clinical xenotransplantation. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 2007;30(3):174-84. Review.

論文審査の結果の要旨

ドナー臓器不足の問題を解決する方法としてブタからヒトへの異種移植が考えられている。異種移植の際の拒絶反応には超急性、急性拒絶反応などがあるが、原因遺伝子である α 1,3-ガラクトース転移酵素のホモノックアウトブタが開発された現在、補体による超急性拒絶反応はほぼ克服できたと考えられている。そこで本論文では次の障壁である急性拒絶反応に関与するとしてNK細胞に焦点をあて研究を行っている。NK細胞の抑制法として異種細胞へのHLA-E遺伝子導入が注目されているが、HLA-E分子はそのまま遺伝子導入しても異種細胞上にほとんど発現しないことが問題となっていた。本論文ではHLA-E分子の発現に寄与するアミノ酸部位の検索を行い、147番目のアミノ酸（セリン）をシステインに変異させると細胞表面への発現量が大きく増加することを明らかにした。またこの遺伝子（HLA-Ev(147)）の遺伝子導入によりNK細胞に対する抑制効果が有意に増強したことから、この遺伝子配列は異種移植への応用に有効な遺伝子素材になりうることを示した。以上の結果より本論文は異種移植の臨床応用へ向けて大きく寄与するものであり、学位の授与に値すると思われる。