OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Differential human serum-mediated neutralization of PERV released from pig cells transfected with variants of hDAF
Author(s)	大倉, 英司
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49983
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	大倉英司（おおくらえいじ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第２２７９８号
学位授与年月日	平成21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	Differential human serum-mediated neutralization of PERV released from pig cells transfected with variants of hDAF （種々のヒトDAFを発現したブタ内皮細胞からのブタ内在性レトロウィルス（PERV）が獲得するヒト血清への抵抗性についての検討）
論文審査委員	（主査） 教授　奥村明之進 （副査） 教授　川瀬　一郎　　教授　竹田　　潔

論文内容の要旨

〔　目　的　〕

世界的に臓器移植が日常医療として行われるようになり、現在ドナー不足が問題となっている。その解決法としてブタ臓器による異種移植が考えられているが、急性拒絶反応が障害となっている。現在、α-Gal抗原のノックアウトやヒト補体制御因子を発現させたブタの作成により超急性拒絶反応は克服されつつある。しかし、その際にヒト補体制御因子を高発現させたブタでは、産生されるブタ内在性レトロウィルス（PERV）がヒト補体制御因子を発現するため、ヒト免疫に対し抵抗性を獲得し、ヒトへの感染の可能性が増大することが指摘されている。現在まで、vitroでヒト補体制御因子DAF・MCP・CD59を高発現したブタ血管内皮細胞（PEC）が産生するPERVにはヒト血清に対する抵抗性を有することが確認されており、さらにMCPのtailをtransmembren型からPI-anchor型へ改変し発現させると、PERVの抵抗性が増大するという報告もある。本研究の目的は、本来PI-anchor型tailであるDAFとtransmembren型に改変したDAFを数種類作成し、それらをPECに発現させ、PERVの抵抗性とPERVの産生に重要な役割を持つraftとの関係を明らかにすることである。

〔　方　法　〕

１．ヒトDAFを発現するPECの作成。

hybrid DAF（deltaSCR1-DAF、機能ドメインのないdelta SCR2-DAF、raftと親和性のあるDAF-TM (HLA-G)、raftと親和性のないDAF-TM (modified HA)、raftと親和性のないDAF-TM (dCYT-MCP)）を作成し、PECへトランスフェクションした。

２．DAFの抗補体作用の評価。

DAFを発現したPECに10%ヒト血清を添加し細胞崩壊時のLDHを測定した。

３．PERVの獲得するヒト血清への抵抗性の評価。

10%ヒト血清添加時と無添加時で、上清中のPERVをヒト細胞（HEK293）に感染させ、感染細胞数をカウントした。

４．Reverse Transcriptase活性による抵抗性の評価 。

10%ヒト血清添加時と無添加時で、PEC上清中の逆転写酵素（RT）を測定した。

５．PERV上のDAFとraftとの親和性の評価。

DAFを高発現したPECの上清をショ糖密度勾配遠心法で分離し、ウエスタンブロットを行った。

尚、２，３，４の実験については抗DAF抗体を用い、ブロッキング実験を行った。

〔 成 績 〕

１．いずれのhybrid DAFもPEC上に高発現していることがフローサイトメトリーにより確認された。

２．コントロールと比較し、deltaSCR1DAF, HLA-GのTM型、modified HAのTM型、dCYT-MCPのTM型のいづれのDAFも補体によるPECの障害性を低下させ、抗DAF抗体添加でその効果は消失した。delta SCR2 DAFはその効果を認めなかった。

３．hybrid DAFのそれぞれのトランスフェクション後に産生されるPERVのヒト血清への抵抗性は、delta SCR1 DAF; 25.52±1.42%、HLA-GのTM型; 13.88±.56%、modified HA型のTM; 11.30±2.45%、dCYT-MCPのTM型; 13.03±3.48%でありnaïve; 5.36±0.88%、mock; 4.73±2.84%と比較し抵抗性を獲得した。delta SCR1 DAFはそれ以外の3種のTM型より抵抗性が増大していた。抗DAF抗体により、抵抗性は消失した。

４．RT活性測定での抵抗性評価でも、delta SCR1DAF; 46.70±4.27%でnaïve PEC; 4.78±0.84%に比して増大したが、抗DAF抗体添加時には20.40±12.40%と減少した。

５． delta SCR1 DAFのraft層での発現は明らかであったが、HLA-GのTM型の発現は減弱し、modified HAのTM型、dCYT-MCPのTM型では確認できなかった。

〔 総 括 〕

- deltaSCR1-DAF、delta SCR2 DAF、DAF-TM (HLA-G) 、 DAF-TM (modified HA)、DAF-TM (dCYT-MCP)を発現したPECを作成した。
- 機能ドメイン欠損delta SCR2 DAF以外のDAFを発現したPECはヒト血清による細胞障害性を抑制した。
- それらのDAFを発現したPECからのPERVはヒト血清に抵抗性を獲得した。
- その抵抗性はTM型がPI-anchor型より減弱していた。
- PERVを分画すると、PI-anchor型DAFはraft上に存在し、TM型DAFはraft上には僅かしか存在していなかった。
- PERVは出芽にraftを利用するため、raft上に存在するPI-anchor型DAFはPERVをヒト血清から保護することが推測される。したがって、異種移植に用いるブタ臓器にはTM型補体制御因子を発現させる方が適切であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

臓器移植治療における臓器不足が問題となっている。解決策としてブタからの異種移植が考えられているが、拒絶反応が障壁である。現在はヒト補体制御因子を発現させたブタの臓器を用いることで超急性拒絶反応は克服されつつある。しかし、その際ブタ内在性レトロウィルス（PERV）がヒト免疫に対し抵抗性を獲得し、ヒトへの感染の可能性が指摘されている。本研究ではtailの構造を本来のPIアンカー型と、膜貫通型（HLA-G、modified HA、dCYT-MCP）へと改変したヒト補体制御因子DAFをブタ血管内皮細胞（PEC）に発現させ、発現したDAFの種類により生じるPERVの抵抗性の違いを検討した。またDAFとraftとの親和性とtailの違いについても検討した。PERVをヒト細胞に感染させ、ヒト血清に対する抵抗性を、感染細胞数をカウントすることで評価した。結果はPI型DAFのPERVが最も強い抵抗性を示し、TM型DAFはその約半分程度の抵抗性であった。TM型DAFのPERVを比較するとraftと親和性のないmodified HA、dCYT-MCPのTM型PERVの方が親和性のあるHLA-GのTM型PERVより抵抗性は減弱していた。PERVは出芽の際raftを利用するので、raftとの親和性が強いほど、PERVが獲得する抵抗性も強くなると考えられた。本研究の結果は、膜蛋白のtailを変えることで、PERVの獲得するヒト血清への抵抗性が減弱可能であることを明らかにし、ブタ臓器移植におけるPERV感染の可能性を軽減させることに言及した点で意義深く学位に値すると考える。