

Title	A newly cloned pig dolichyl-phosphate mannosyltransferase for preventing the transmission of porcine endogenous retrovirus to human cells.
Author(s)	山本, 亜紀
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54122
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	やまもとあき紀 山本亜紀
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 23455 号
学位授与年月日	平成22年2月16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	A newly cloned pig dolichyl-phosphate mannosyltransferase for preventing the transmission of porcine endogenous retrovirus to human cells. (新規にクローン化したブタ・ドリコールリン酸マンノシルトランスフェラーゼによるヒト細胞へのブタ内在性レトロウイルスの感染制御)
論文審査委員	(主査) 教授 福澤 正洋 (副査) 教授 生田 和良 教授 上田 啓次

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

臓器移植医療におけるドナー不足を解消する方法の一つとして、ヒトと生理学的・解剖学的特性が近く、倫理的問題が少ないブタをドナーとする異種移植が挙げられる。しかしブタのゲノム内には、ヒト細胞への感染指向性を有するブタ内在性レトロウイルス (Porcine Endogenous Retrovirus: PERV) が存在し、異種移植による新たな人獣共通感染症の発現が危惧されている。我々の研究グループではこれまでに、ブタ細胞表面およびPERV表面のN型糖鎖を高マンノース型からより複合型へ移行させることにより、ヒト細胞へのPERVの感染性が低下することを証明してきた。

先天性グリコシル化異常症 (Congenital Disorders of Glycosylation: CDG) は、小胞体におけるN型糖鎖の転移不全・糖鎖プロセッシング異常により引き起こされる遺伝疾患であり、その1種CDG-Icの患者が、ドリコールリン酸マンノシルトランスフェラーゼ (Dolichyl-phosphate mannosyltransferase: Dol-P-Man) の機能を欠損していることが臨床の症例で報告されている。Dol-P-Manは小胞体内でのN型糖鎖の生合成の初期段階を司る酵素である。

そこで本研究では、ブタDol-P-Man遺伝子をknockdownすることにより、ブタ細胞表面お

よびPERV表面でのN型糖鎖の生合成、特に高マンノース型の形成を抑制し、ヒト細胞へのPERV感染を制御する可能性を検討した。

〔 方法ならびに成績 〕

まず、マウス・ヒトの配列を参考にし、新規にブタDol-P-Manのクローニングを行い、全長の配列を決定した。決定したブタDol-P-Manは259AAからなり、ヒト、マウス、ラット、ウシとそれぞれ94.2%、91.5%、91.2%、93.9%の高い相同性を得た。

次に、ブタDol-P-Manに対するsiRNAを設計し、*LacZ*遺伝子を導入後、PERV-Bを強発現させたブタ血管内皮細胞(PEC(*LacZ*)/PERV-B)にLipofection法で導入した。Real-time PCRによる解析から、siRNAの導入によるブタDol-P-ManのmRNAの発現の減弱を認めた。また、*LacZ* Pseudotype Assayでヒト胎児腎細胞株HEK293細胞へのPERVの感染性の変化を検討したところ、siRNAの導入によりPERV感染性を最大87%抑制した。

最後に、permanentな発現を得るために、設計したsiRNAを導入したplasmid (pSXGH-siRNA#2)を構築し、ブタ血管内皮細胞(PEC(*LacZ*)/PERV-B)にLipofection法で導入後、plasmidの発現をFlow cytometryで確認した。Real-time PCRによる解析から、構築したplasmidの導入によるブタDol-P-ManのmRNAの発現の減弱を認めた。また、*LacZ* Pseudotype Assayによる検討から、構築したplasmidの導入によりPERV感染性を最大95%抑制することを確認した。

〔 総 括 〕

PEC(*LacZ*)/PERV-B のDol-P-Man遺伝子をknockdownすることにより、PECにおけるDol-P-Manの発現の減弱を認めた。Dol-P-Man遺伝子をknockdownしたPEC由来のPERVは、Naive由来のPERVに比べ、ヒト細胞に対する感染性が有意に低下することが示された。以上より、N型糖鎖生合成経路を利用したPERV感染制御の有効性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

臓器移植医療における絶対的なドナー不足を解消する手段として、ブタを用いた異種移植およびバイオ人工臓器が期待されている。しかし、その臨床応用にはヒト細胞へのブタ内在性レトロウイルス(PERV)感染を制御する必要が考えられ、そのためには、PERVのヒト細胞への感染メカニズムの解明が不可欠で

ある。

Dolichyl-phosphate mannosyltransferase (Dol-P-Man)は、小胞体内腔での高マンノース型糖鎖の合成に関与する糖転移酵素である。本研究では、新規にブタDol-P-Manのクローニングを行い、全長の配列を決定した。ブタDol-P-Manに対するsiRNAを設計し、ブタ血管内皮細胞に導入し、ヒト胎児腎細胞株HEK293細胞への感染性の変化を*LacZ* Pseudotype Assayで検討した。ブタDol-P-Manをknockdownさせることによりヒト細胞に対するPERVの感染性は有意に低下した。

ヒト細胞へのPERV感染の制御において、ウイルス表面の高マンノース型糖鎖の合成を阻害することが重要であることを示した。

本研究結果は、遺伝子改変ブタを用いた異種移植・バイオ人工臓器におけるPERV感染の防御に寄与すると考えられ、学位の授与に値するものと認める。