OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies of porcine innate immune systems against human cells
Author(s)	坂井, 理恵子
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72542
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　坂井　理恵子

論文審査担当者	（職）	氏　名
主　査	大阪大学教授	奥山元臣
副　査	大阪大学教授	和佐勝史
副　査	大阪大学教授	熊ノ郷淳

論文審査の結果の要旨

患者から樹立したiPS細胞をブタ胚盤胞に注入することによって、ブタ体内でヒトiPS細胞由来の臓器をつくる研究が進んでいるが、実際、ヒト臓器をブタ体内で構築において、ブタ免疫系のヒト細胞に対する拒絶反応については十分に検討されていない。申請者は、特にブタの自然免疫系に着目し、ヒトに対する反応について検討を行った。本研究により、ブタの補体、NK細胞、マクロファージはヒト細胞に対し、傷害反応を示すことが明らかとなった。また、成豚、仔豚の血清中には自然とヒトに対する抗体が存在すること、さらにその抗体は母豚の初乳を介して獲得されることも明らかとなった。本研究成果は、ブタ体内におけるヒト臓器構築において、ブタ自然免疫系の制御の必要性を示す重要な知見を与え、再生医学医療の発展の一助になるものとして評価できる。従って、本論文は学位論文として十分な内容を有し、申請者の坂井理恵子さんは博士（医学）の学位授与に値する十分な資質を有すると判断した。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	坂井　理恵子
論文題名 Title	Studies of porcine innate immune systems against human cells (ブタ自然免疫系のヒトに対する検討)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

近年、移植医療や再生医療の研究において、ブタが広く利用されている。特に異種移植では、ブタは臓器ドナーの有力な候補として期待されており、移植後の拒絶反応を回避する様々な方法が研究されている。一方、再生医療では患者から樹立したiPS細胞を、ブタ胚盤胞に注入することによって、ブタの体内でヒトiPS細胞由来の臓器をつくる研究が行われている。こちらはブタ免疫系のヒトに対する拒絶反応が懸念されるが、異種移植に比べ十分に検討されていない。そこで、本研究ではブタ免疫系、特に自然免疫系に着目し、ヒト細胞に対する反応について検討した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

ブタ自然免疫系の反応を、補体、自然抗体、NK細胞、マクロファージの4点に絞り、ヒトに対する反応を検討した。ブタの補体については、まず、血清中の補体価および各補体成分活性能をヒト補体価測定用の試薬を用いてマイクロタイター法で測定した。ブタCH50、ACH50の値はヒトの値と比べて低く、各補体成分の活性化能もC3以外低い傾向であった。ブタ補体用の測定系ではないため、値が低くなったと考えられるが、ブタの補体系もヒトと同様のカスケード反応で進行することがわかった。続いて、ブタ補体が実際にヒト細胞膜を直接認識し反応するかどうか、第二経路を介した反応に着目して検討した。EGTA・Mg^{2+} 存在下でブタ血清とヒト赤血球を1時間共培養した後、OD415nmで測定し、溶血率を算出した。その結果、10%血清で13.5 ± 5.2%、20%血清では49.5 ± 14.5%の溶血率を認め、ブタ補体は直接的にヒトの細胞膜を認識し、反応を示すことが明らかとなった。次に、成豚および仔豚の血清中のヒト細胞に対する抗体量をFACS で測定した。抗ヒトIgMは、成豚、仔豚で同程度存在していたのに対し、抗ヒトIgGは子豚ではtiterが低かった。いずれの個体も明確なヒト抗原刺激を受けていないにも関わらず、自然とヒトに対する抗体を持っていた。続いて、これら抗体の発生時期を調べるため、生後0日目および1日目の仔豚の血漿、母豚の初乳についても同様に測定した。抗ヒト抗体は生後0日目では検出されず、生後1日目の仔豚からは検出された。初乳では、血清と同程度の抗体が存在していた。このことから、ブタは生後すぐに、抗ヒト抗体を初乳から獲得することが明らかとなった。NK細胞によるヒト細胞への傷害活性については、ブタ末梢血単核球をヒト血管内皮細胞と4時間共培養することで、NK細胞による細胞傷害反応とし、その傷害率をLDH assayにより測定した。ブタ末梢血単核球対ヒト血管内皮細胞の比率が20:1、50:1では11.5 ± 5.4%、12.5 ± 4.6%、100:1では21.1%の細胞傷害率を認め、ブタNK細胞はヒト細胞に対する傷害活性を示した。最後に、ブタマクロファージによるヒト細胞への傷害活性について検討した。ブタ末梢血単核球を抗ブタモノサイト抗体によってソーティングし、ヒト血管内皮細胞と24時間共培養した。得られた傷害率をWST8 assayによって測定した結果、ブタマクロファージは20:1、50:1の比率で10.4 ± 10.0%、42.0 ± 6.2%の傷害率を認め、ブタマクロファージもNK細胞と同様、ヒト細胞に対する傷害活性を示した。

〔総　括(Conclusion)〕

ブタを基盤として用いたヒト臓器再生では、ブタ自然免疫系によるヒト細胞への拒絶反応があることが示唆され、今後もさらに検討する必要があると考えられる。