

学位授与番号：甲 1 0 0 7 号

氏 名：伊豆原 郁月

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 28 年 3 月 9 日

学位論文名：

崩壊促進因子 fDAF 発現ネコ化ブタ内皮細胞の生成

主論文名：

Generation of a Felinized Swine Endothelial Cell Line by Expression of Feline Decay-Accelerating Factor.

（崩壊促進因子 fDAF 発現ネコ化ブタ内皮細胞の生成）

学位審査委員長：教授 嘉糠洋陸

学位審査委員：教授 本間定 教授 黒坂大太郎

論文要旨

論文提出者名	伊豆原 郁月	指導教授名	岡野ジェイムス洋尚
--------	--------	-------	-----------

主論文題名

Generation of a Felinized Swine Endothelial Cell Line by Expression of Feline Decay-Accelerating Factor.

(崩壊促進因子 fDAF 発現ネコ化ブタ内皮細胞の生成)

Luna Izuhara, Norifumi Tatsumi, Shuji Miyagawa, Satomi Iwai, Masahito Watanabe, Shuichiro Yamanaka, Yuichi Katsuoka, Hiroshi Nagashima, Hirotaka J Okano, Takashi Yokoo

PLOS ONE, 2015、DOI:10.1371/journal.pone.0117682

本研究では、異種臓器活用型再生医療における、ヒト臨床への展開を促すために、大型動物を用いた前臨床試験を確立し、現行のドナー臓器不足および免疫抑制剤の生涯服用における患者の精神負担の軽減および安全で有効性の高い医療の実現を目指した。

本試験では、ラットを用いた既存研究を基に、ネコとブタを用いて、異種間臓器移植試験を行った。この異種間臓器移植を行った際の拒絶反応は、免疫抑制剤などで防ぐことができるが、超急性拒絶反応を防止することは出来ない。超急性拒絶を防止すべく、崩壊促進因子の遺伝子 (fDAF) をクローニングし、クローニングした fDAF の発現の同定を、免疫組織化学解析およびウエスタンブロットで行った。既存研究では、伴侶動物の一部のネコには、実験動物と違い、ブタに対する既存抗体をもつネコの事例があり、その場合はブタ組織に対し過剰な免疫反応を呈することがわかっている。実際に、これらのネコに異種臓器を移植すると、超急性拒絶反応が起きるといった問題がみられた。この問題解決のために、同定した fDAF をブタ内皮細胞に Neon Transfection system を用いて遺伝子導入し、fDAF 発現ブタ内皮細胞株の確立を行った。

また、この細胞株にネコ血清を添加した時に起こる超急性拒絶反応の際にみられる細胞傷害性について In vitro で検証を行った。

本研究の結果、fDAF を単離し、ブタの細胞を「ネコ化」する fDAF をブタ内皮細胞株に導入することで、超急性拒絶反応を抑制することが可能になった。

以上のことから、これらの fDAF 発現細胞は、抗ブタ抗体を含むネコ血清に耐性があり、この細胞は、超急性拒絶に耐性があることがわかった。

この fDAF を導入したブタ腎臓は、ネコにおける CKD の治療に応用できると考えられ、ブタとヒトの異種間移植臨床への展開を促す前臨床試験であるといえる。

論文審査の結果の要旨

伊豆原郁月氏の学位申請論文は、主論文1冊1編より成ります。主論文の英語題名は「Generation of a Felinized Swine Endothelial Cell Line by Expression of Feline Decay-Accelerating Factor」、日本語題名は「崩壊促進因子 *fDAF* 発現ネコ化ブタ内皮細胞の生成」と題するもので、英文誌 PLoS ONE 誌(2015年 IF: 3.234)に掲載されたものです。指導教授は、再生医学研究部の岡野ジェイムス洋尚教授です。以下、この論文に基づく thesis の要旨と論文審査委員会の結果をご報告申し上げます。

異種動物を用いた再生臓器の活用は、次世代の再生医療の重要な鍵のひとつです。しかし、ブタをドナーとした臓器移植の研究から、レシピエント動物に既存ブタ抗体が存在すると、超急性拒絶反応が惹起され、これが移植の成功率を著しく下げることが明らかになってきました。本研究は、ブタをドナー、ネコをレシピエントとして、ブタ体内で作成したキメラ腎臓の異種間臓器移植を対象に、この超急性拒絶反応を抑制する新規方法の開発を試みたものです。ネコを対象にした理由として、飼いネコの一部は、ブタに対する既存抗体を持つものがあり、移植したブタ組織に対し過剰な免疫反応を呈することが判明したことが挙げられます。

超急性拒絶反応を防止するため、補体系をその標的としました。加えて、補体活性化の古典的経路において C3 転換酵素を阻害することが知られている、崩壊促進因子 (DAF: decay accelerating factor) に着目しました。この DAF をドナー細胞に人為的に発現させることにより、レシピエントに異種臓器を移植した際に同時に超急性拒絶反応を抑制しようとするものです。ネコから崩壊促進因子の遺伝子 (*fDAF*) を同定し、この *fDAF* をブタ内皮細胞に遺伝子導入しすることで *fDAF* 発現ブタ内皮細胞株を樹立しました。生化学的解析、細胞生物学的解析に引き続き、このネコ化ブタ内皮細胞株に、既存ブタ抗体を含むネコ由来血清を添加したところ、超急性拒絶反応の指標となる細胞傷害性が有意に低下することが明らかになりました。これらの結果は、DAF を導入したドナーブタの各種臓器が、ネコなどの異種レシピエントへの移植治療により適することを示唆するものです。ブタとヒトの異種間移植臨床への展開を促す前臨床研究成果として位置づけられるものと期待されます。

公開学位審査会は去る平成28年2月18日、審査委員として本間定、黒坂大太郎両教授ご臨席のもと開催されました。席上、各教授から、補体系の人為的抑制による副次的な作用は想定されないのか、補体系抑制のための崩壊促進因子として CD55 を選択した理由は何か、*fDAF* が機能するにあたって宿主特異性はあるのか、また、臨床応用を含めた今後の研究展望など、多数の質問・指摘があり、伊豆原氏は、これらの質問に対して未発表の実験データも活用し、的確な回答をしました。よって、学位審査委員会は慎重審議の結果、本論文を学位申請論文として十分価値があるものと認めた次第です。

なお、審査の過程で thesis の修正が必要な箇所が複数指摘されましたが、後日適切に修正され、再提出されたことを申し添えます。

以上、ご審議のほどよろしくお願い申し上げます。