

平成 22 年 6 月 14 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890141
 研究課題名（和文） マクロファージ種認識分子 CD47 遺伝子の異種臓器への導入効果による拒絶回避の戦略
 研究課題名（英文） Strategy of macrophage-mediated xenograft rejection through inhibitory signaling to SIRP.
 研究代表者
 井手 健太郎（IDE KENTARO）
 広島大学・病院・助教
 研究者番号：50511565

研究成果の概要（和文）：

我々はこれまで、ヒトマクロファージによるブタ細胞の貪食機序が、異種細胞間 CD47-SIRP α シグナルの不应性によるものであることを *in vitro* で明らかにしてきた。本研究では、小動物モデルにおいてレシピエント種 CD47 を発現したドナー細胞を確立し、*in vivo* で CD47 遺伝子導入によるマクロファージ性拒絶反応抑制効果を解析することを目的とし、マウス CD47 を発現したラットインスリン産生細胞株を作成した。今後はこの細胞株を糖尿病マウスに移植し、CD47 遺伝子導入によるマクロファージ性拒絶反応抑制効果を解析する。

研究成果の概要（英文）：

We have previously shown that pig CD47 does not interact with human SIRP α , and that human CD47 expression inhibits phagocytosis of porcine cells by human macrophages *in vitro*. In this study, we investigate the potential of human CD47 expression to promote porcine cell survival *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：異種移植、CD47、マクロファージ、拒絶反応、遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

細胞および臓器移植ドナー不足の解決策として、生理学的・解剖学的類似性からブタを用いた異種移植に期待が寄せられている。しかし、ブタ-ヒト間異種移植では B 細胞性および T 細胞性の激しい拒絶反応が障壁と

なる。最近、主要異種抗原である α Gal を欠いたヒト化ブタが作製されたことから、異種移植の臨床導入に現実性が増している。

我々は、ヒトマクロファージは Gal を除去したブタ細胞に対しても抗体非依存性の貪食能を示し、Gal ノックアウトブタの使用に

よってもマクロファージ性拒絶反応は回避し得ないことを解明した。またその機序が異種細胞間 CD47-SIRP α シグナルの不应性によるものであることを *in vitro* で明らかにし、遺伝子導入によりヒト CD47 をブタリンパ芽球様細胞上に表出させると、マクロファージによる貪食が回避できることを報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では、前述の研究成果を発展させ、小動物モデルにおいてレシピエント種 CD47 を発現したドナー細胞・臓器を確立し、*in vivo* でマクロファージ性拒絶反応抑制効果を解析し、我々の最終的目標であるヒト CD47 トランスジェニックブタ確立の有効性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)小動物モデルでレシピエント種 CD47 を発現したドナー細胞を作成し、*in vivo* でマクロファージ性拒絶反応抑制効果を検討する。

(2)小動物モデルでレシピエント種 CD47 を発現したドナー臓器を確立し、臓器レベルでの CD47 遺伝子導入によるマクロファージ性拒絶反応抑制効果を解析する。

4. 研究成果

(1)小動物モデルとしてラット→マウス異種移植モデルで研究を行った。まずラット・マウス間での CD47-SIRP α シグナルの不应性を証明するため、マウスマクロファージとラット細胞を混合培養し、マクロファージ SIRP α にチロシンリン酸化を認めないことを免疫沈降ウェスタンブロット法で確認した。

次にマウス CD47 を発現したラット細胞を作製した。具体的には pRcCMV-mouseCD47 vector を用い、ラットインスリン産生細胞株にマウス CD47 をリポフェクション法で遺伝子導入した (図 1)。

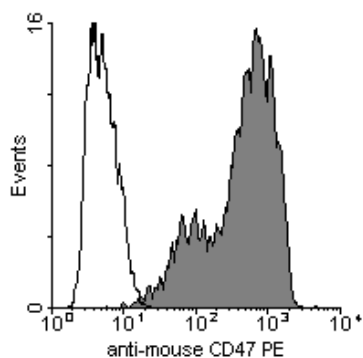


図 1 マウス CD47 を発現したラット細胞を

作製。pRcCMV-mouseCD47 vector を用い、ラットインスリンノーマ細胞 INS-1E cell にリポフェクション法で遺伝子導入し、マウス CD47 の発現をフローサイトメトリーで確認した。

今後はこのマウス CD47 を発現したラットインスリン産生細胞株を糖尿病マウスの腎皮膜下に移植する。糖尿病発症には、ストレプトゾトシン投与モデルを用いる。生着延長効果は血糖値と血清中ラットインシュリン量を指標に検討し、CD47 遺伝子導入によるマクロファージ性拒絶反応抑制効果を解析する。

(2) *in vivo* 遺伝子導入装置(CUY21SC)を使用し、レシピエント種 CD47 を発現したドナー臓器の作製を行った。方法はマウス腎動脈にカテーテルを挿入し、腎臓を電極で挟んだ後に pKS336-hCD47 vector をカテーテルより注入し、パルス出力を行った(75V Pon 100msec Poff 900msec 3回)。1週間後、腎臓を摘出しヒト CD47 発現を免疫組織染色で確認した結果、限局的にその発現を認めた。

次に肝臓に遺伝子導入する目的で、門脈より pKS336-hCD47 vector を注入し、パルス出力を行った。導入1週間後における肝臓の免疫組織染色では、腎臓よりもヒト CD47 の発現効率は低いことが確認された。

今後さらに CD47 遺伝子導入効率の向上を図った後、遺伝子導入マウス腎臓・肝臓を摘出し *ex vivo* にてヒト全血で腎灌流、肝灌流を行う予定である。灌流は TN 式摘出臓器灌流装を改良し、ヒト血液で臓器灌流を行い、定時的に灌流血液・生化学・免疫学的検査と灌流臓器のレーザー微小循環血流計による組織血流を測定する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

①Tahara H, Ide K, Basnet NB, Tanaka Y, Ohdan H. Determination of the precursor frequency and the reaction intensity of xenoreactive human T lymphocytes. Xenotransplantation. 2010 in press (査読有)

②Tahara H, Ide K, Basnet NB, Tanaka Y, Matsuda H, Takematsu H, Kozutsumi Y, Ohdan H. Immunological property of antibodies against N-glycolylneuraminic acid epitopes in cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase

-deficient mice. *J Immunol.* 2010 Mar 15;184(6):3269-3275. (査読有)

③ Igarashi Y, Tateno C, Tanaka Y, Tachibana A, Utoh R, Kataoka M, Ohdan H, Asahara T, Yoshizato K. Engraftment of human hepatocytes in the livers of rats bearing bone marrow reconstructed with immunodeficient mouse bone marrow cells. *Xenotransplantation.* 2008Jul;15(4):235-245. (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

①田原裕之 プタ-ヒト異種間 T 細胞応答における CD47-SIRP シグナルの役割 第 13 回日本異種移植研究会 2010 年 3 月 14 日 東京

②Nabin Basnet 健常人における α Gal および N-glycolylneuraminic acid (NeuGc) に対する自然抗体価と細胞傷害性の比較 第 13 回日本異種移植研究会 2010 年 3 月 14 日 東京

③田原裕之 異種移植における異種抗原 N-Glycolylneuraminic acid(NeuGc)の抗原性 第 37 回 膝・髌島移植研究会 2010 年 3 月 12 日 宇都宮

④田原裕之 異種移植における異種抗原 N-Glycolylneuraminic acid(NeuGc)の役割 第 45 回日本移植学会総会 2009 年 9 月 17 日 東京

⑤Nabin Basnet N-glycolylneuraminic acid is recognized by naturally occurring cytotoxic human xenoantibodies 第 45 回日本移植学会総会 2009 年 9 月 17 日 東京

⑥Hiroyuki Tahara Evidence of cytotoxicity of non-Gal antibodies against N-glycolylneuraminic acid determinants in xenotransplantation by using CMAH-/- mice American Transplantation Congress 2009 年 6 月 3 日 Boston, USA

⑦Nabin Basnet Deficiency of N-glycolylneuraminic acid besides Gal α 1,3Gal on xenogeneic cells attenuates cytotoxicity of human natural antibodies American Transplantation Congress 2009 年 5 月 30 日 Boston, USA

⑧Hiroyuki Tahara N-glycolylneuraminic acid— A novel target for rejection in islet xenotransplantation —Joint Conference of CTS&JSOPMB 2009 年 4 月 21 日 Okayama,

Japan

⑨Nabin Basnet 健常人における α -Gal および N-glycolylneuraminic acid(NeuGc) に対する自然抗体価と細胞障害性の比較 第 12 回日本異種移植研究会 2009 年 3 月 7 日 鹿児島

⑩田原 裕之 異種抗原 N-Glycolylneuraminic acid(NeuGc)は異種島移植における拒絶の標的となる 第 12 回日本異種移植研究会 2009 年 3 月 7 日 鹿児島

⑪Nabin Basnet Comparative detecton of cytotoxic natural antibody against α -Gal and NeuGc epitopes in healthy human sera 第 44 回日本移植学会総会 2008 年 9 月 21 日 大阪

⑫田原裕之 CD47-SIRP システムを介した異種 T 細胞性拒絶反応制御の可能性 第 44 回日本移植学会総会 2008 年 9 月 21 日 大阪

⑬Kentaro Ide Human CD47 on porcine antigen presenting cells have possibility of preventing T cell-mediated xenograft rejection through inhibitory signaling to SIRP α XXII International Congress of The Transplantation Society 2008 年 8 月 13 日 Sydney, Australia

⑭Hiroyuki Tahara In Vitro and In Vivo Evidence of Cytotoxicity of Antibodies Against N-Glycolylneuraminic Acid (NeuGc) in Xenotransplantation American Transplant Congress 2008 2008 年 6 月 1 日 Toronto, Canada

⑮Hirouiki Tahara Role for CD47-SIRP α Signaling in Human T Cell Proliferation in Response to Stimulation with Porcine Antigen Presenting Cells American Transplant Congress 2008 2008 年 6 月 1 日 Toronto, Canada

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井手 健太郎 (IDE KENTARO)

広島大学・病院・助教

研究者番号：50511565

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：