

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791484

研究課題名（和文）CD47-SIRP $\alpha$  シグナル誘導による抗 NeuGc 抗体性異種膵ラ氏島拒絶の克服研究課題名（英文）The conquest of anti NeuGc antibody mediated xenogeneic islet rejection through CD47-SIRP $\alpha$  signaling.

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）：

NeuGc ノックアウトマウスの B 細胞における SIRP $\alpha$  の発現を確認した。その結果、脾臓や骨髄、末梢血中の B 細胞には SIRP $\alpha$  はほとんど発現しておらず、腹腔細胞中の B 細胞にのみ SIRP $\alpha$  が強発現していた。また腹腔内 B 細胞の phenotype を解析したところ、約 80% が B-1 細胞で、さらに B-1a、B-1b 細胞は共に SIRP $\alpha$  を高発現しているが、B-2 細胞には発現していないことを確認した。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated the expression of SIRP $\alpha$  on B cell in cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-deficient mice. There are no SIRP $\alpha$  expressed B cells in the spleen, bone marrow and peripheral blood. However, B cells in the peritoneal cavity only expressed high levels of SIRP $\alpha$ . About 80% of B cells in the peritoneal cavity were B-1 cells. Furthermore, B-1a and B-1b cells expressed high levels of SIRP $\alpha$ . In contrast, B-2 cells did not express the SIRP $\alpha$ .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：移植免疫学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：異種移植、B 細胞、CD47

### 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ブタ細胞表面上に出出する Gal $\alpha$ 1,3Gal(Gal)抗原を標的とした超急性拒絶反応によって、直ちに廃絶される。しかし近年、Gal 合成酵素遺伝子をノックアウトし Gal 抗原を欠いたブタが作製されたことにより、異種移植臨床導入の現実性が増し、元々ブタ膵ラ氏島表面上には Gal 抗原がなく超急性拒絶反応の危険性が低いという理由から、異種移植の臨床導入の第一歩として 1 型糖尿病患者に対するブタ膵ラ氏島移植が計画されている。

異種移植片の組織学的検索では著明なマクロファージ浸潤が認められることから、同種移植に匹敵する成績を得るためにはマクロファージ性拒絶反応を制御する必要がある。我々は以前、ヒトマクロファージにはブタ細胞に対し、抗体・補体非依存性の食食機構、細胞傷害性機構が存在していることを解明した。また異種間ではマクロファージの自己寛容機構である CD47-SIRP $\alpha$  シグナル伝達系が作動しないため、ブタ細胞に対するヒトマクロファージ食食機構が働くことを解明した。また遺伝子導入によりヒト CD47 をブタ細胞上に出出させると、ヒトマクロファージによるブタ細胞食食が回避できることを *in vitro* で証明した。さらにブタ-ヒト間

CD47-SIRPα シグナル応答を作動させることにより、ブタ細胞に対するヒト T 細胞応答が減弱できることを証明した。これらの結果は従来克服できなかったブタ移植片に対するマクロファージ性拒絶反応を回避するには、ヒト CD47 遺伝子導入ブタの作製が必要であるとの同意が得られている。

## 2. 研究の目的

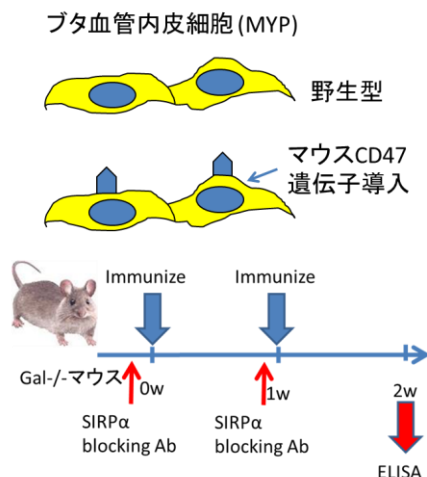
Gal ノックアウトブタが開発され Gal 抗原による超急性拒絶反応はほぼ克服されたが、non-Gal 抗原による遅延型拒絶反応の可能性が指摘されている。N-glycolylneuraminic acid(NeuGc)はヒトを除くすべての哺乳類に分布するシアル酸を末端にもつ糖鎖である。我々は NeuGc を表出している Wild type マウス腓ラ氏島を、糖尿病を発症した NeuGc ノックアウトマウスへ移植した際、血糖値の正常化は認めず廃絶されることを明らかにし、これまでの動物実験モデルでは解明できなかった NeuGc の抗原性を初めて解明した。また健常人には抗 NeuGc 抗体が存在し、それはマクロファージ Fc レセプターとの結合が強い IgG クラスに属していることを明らかにした。

以上の研究成果により抗 NeuGc 抗体による腓ラ氏島移植片の廃絶にはマクロファージが関与しており、マクロファージの制御により抗 NeuGc 抗体依存性傷害を回避し腓ラ氏島移植片を生着させることができると着想に至った。

## 3. 研究の方法

まず NeuGc ノックアウトマウスの B 細胞における SIRPα の発現を確認した。次に CD47-SIRPα シグナル誘導による抗体産生抑制効果を検証した。当初 NeuGc ノックアウトマウスにおける抗 NeuGc 抗体産生抑制効果を検証する予定であったが、測定が簡便な Gal ノックアウトマウスにおける抗 Gal

図1. Galノックアウトマウスにおける抗Gal抗体抑制効果の検証

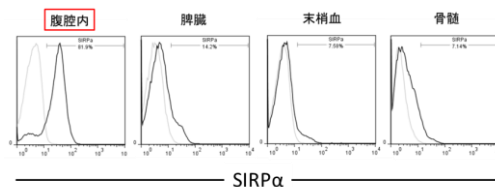


抗体抑制効果の検証を行った (図 1)。

## 4. 研究成果

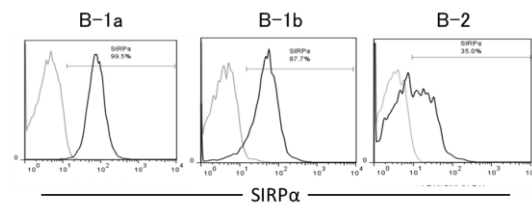
まず NeuGc ノックアウトマウスの B 細胞における SIRPα の発現を確認した。その結果、脾臓や骨髄、末梢血中の B 細胞には SIRPα はほとんど発現しておらず、腹腔細胞中の B 細胞にのみ SIRPα が強発現していた (図 2)。

図2. 腹腔内B細胞におけるSIRPα発現



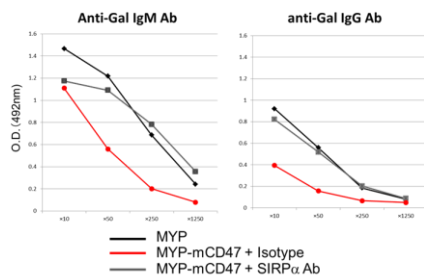
また腹腔内 B 細胞の phenotype を解析したところ、約 80% が B-1 細胞で、さらに B-1a、B-1b 細胞は共に SIRPα を高発現しているが、B-2 細胞には発現していないことを確認した (図 3)。

図3. 腹腔内B細胞のphenotype別SIRPα発現



次に CD47-SIRPα シグナル誘導による抗体産生抑制効果を検証した。当初 NeuGc ノックアウトマウスにおける抗 NeuGc 抗体産生抑制効果を検証する予定であったが、まずは測定が簡便な Gal ノックアウトマウスにおける抗 Gal 抗体抑制効果の検証を行った。まずマウス CD47 導入ブタ細胞の作製は、ブタ血管内皮細胞株 MYP に対してリポフェクション法で行った。このマウス CD47 を導入したブタ細胞を GalKO マウスの腹腔内投与し、さらに、SIRPα をブロッキングするため抗 SIRPα 抗体を投与し、2 週間後に抗体価を測定を行った (図 1)。その結果、マウス CD47 を遺伝子導入したブタ細胞で免疫した群では、無処置のブタ細胞で免疫した群と比べ抗体価は低下し、また CD47-SIRPα シグナルを抗 SIRPα 抗体で遮断すると、マウス CD47 を遺伝子導入したブタ細胞で免疫した群でも抗体価が上昇することを証明した (図 4)。

図4. CD47-SIRP $\alpha$ シグナル誘導による抗Gal抗体産生抑制効果



上記研究成果については現在論文投稿中である。  
 今後は NeuGc ノックアウトマウスにおける抗 NeuGc 抗体産生抑制効果を証明し、ブターマウス間 in vivo 疾患モデルで有効性を証明した後、CD47 塩基配列相同性が更に低いブターヒト化マウス間 in vivo 疾患モデルで抗 NeuGc 抗体依存性拒絶の抑制効果を検証する。

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 2 件)

1. Yoshifumi Teraoka, Kentaro Ide, Hiroshi Morimoto, Hiroyuki Tahara, Hideki Ohdan. Expression of recipient CD47 on rat insulinoma cell xenografts prevents macrophage-mediated rejection through SIRP $\alpha$  inhibitory signaling in mice. PLoS One. 2013;8(3):e58359. (査読有)
2. Chunfeng Wang, Hui Wang, Kentaro Ide, Yuantao Wan, Nico Van Rooijen, Hideki Ohdan, Yong-Guang Yang. Human CD47 expression permits survival of porcine cells in immunodeficient mice that express SIRP $\alpha$  capable of binding to human CD47. Cell Transplant. 2011;20:1915-1920. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. 寺岡義布史、井手健太郎、森本博司、大段秀樹 マクロファージ性拒絶抑制効果に対するレシピエント種 CD47 遺伝子導入の有用性 第 15 回日本異種移植研究会 2012 年 12 月 8 日 京都
2. 寺岡義布史、井手健太郎、森本博司、田中友加、尾上隆司、石山宏平、五十嵐友香、大段秀樹 異種移植におけるマクロファージ性拒絶反応抑制効果に対するレシピエント種 CD47 遺伝子導入の有用

性 第 48 回日本移植学会総会 2012 年 9 月 20-22 日 名古屋

3. Yoshifumi Teraoka, Kentaro Ide, Hiroshi Morimoto, Hideki Ohdan Necessity for genetic induction of recipient CD47 to prevent macrophage-mediated xenograft rejection through CD47-SIRP $\alpha$  inhibitory signaling 2012- XXIV TTS Congress 2012 年 7 月 15-19 日 Berlin, Germany
4. Yoshifumi Teraoka, Kentaro Ide, Hiroshi Morimoto, Hideki Ohdan Genetic induction of recipient CD47 on xenografts prevents macrophage mediated rejection through CD47-SIRP $\alpha$  inhibitory signaling: Evidence from an in vivo xenograft mode American Transplant Congress 2012 年 6 月 2-6 日 Boston, USA
5. 寺岡義布史、井手健太郎、森本博司、田中友加、五十嵐友香、安部智之、橋本慎二、平田文宏、堀田龍一、山下正博、田澤宏文、石山宏平、尾上隆司、大段秀樹 異種移植におけるレシピエント種 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の in vivo 検証 第 14 回日本異種移植研究会 2011 年 12 月 10 日 広島
6. 井手健太郎 広島大学における異種移植研究の軌跡と今後の展望 第 14 回日本異種移植研究会 2011 年 12 月 10 日 広島
7. 寺岡義布史、井手健太郎、Nabin Basnet、森本博司、田中友加、石山宏平、尾上隆司、五十嵐友香、田澤宏文、堀田龍一、山下正博、橋本慎二、平田文宏、安部智之、大段秀樹 異種移植におけるレシピエント種 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の in vivo 検証 第 47 回日本移植学会総会 2011 年 10 月 4 日 仙台
8. Yoshifumi Teraoka, Kentaro Ide, Hiroyuki Tahara, Nabin Basnet, Hiroshi Morimoto, Hideki Ohdan. Genetic induction of mouse CD47 on rat insulinoma cells prevents macrophage-mediated xenograft rejection through CD47-SIRP $\alpha$  inhibitory signaling in mice. The 11th Joint Annual Congress of the American

Society of Transplant Surgeons and The  
American Society of Transplantation.  
2011年4月30日-5月3日 Philadelphia,  
USA

[その他]  
ホームページ等

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：