

氏 名 (本籍) は 芳 が 賀 いずみ 泉

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 3 1 1 9 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 10 年 9 月 9 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 平 成 2 年 3 月 28 日  
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Enzyme-Assisted synthesis of disaccharides to  
inhibit binding of human Anti  $\alpha$  Gal-Antibody.  
(酵 素 を 用 いた 抗 原 糖 鎖 合 成 と 合 成 糖 鎖 に よ る ヒ  
ト 抗  $\alpha$  Gal 自 然 抗 体 抑 制)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 里 見 進 教 授 田 林 晁 一

教 授 藤 村 重 文

# 論文内容要旨

近年の移植技術の進歩により、臓器移植は日常に行われる医療として広がってきており、レシピエント数は増加の一途である。このため移植医療において慢性的なドナー不足が問題となっている。最近、日本においても脳死患者からの臓器摘出が認められたが、移植臓器の絶対的不足の解消には程遠く、これに対して何らかの対策を講じなければならない。この問題の解決方法の一つとして人工臓器の開発があげられるが、ヒトの臓器の複雑な機能を全てカバーし、しかもヒト体内におさめることのできるほど小型軽量の人工臓器の開発は、極めて困難である。

そこでもう一つの解決法として、異種動物からヒトへ臓器移植をする異種移植があげられる。そのドナーとして現在のところ生理学的、解剖学的条件からブタが第一候補となっているが、同種移植とは異なり、この組み合わせの異種移植においては超急性拒絶反応が一つのハードルとなっている。近年、超急性拒絶反応は、レシピエント血液内に存在する自然抗体による抗原抗体反応で補体を活性化することにより、移植臓器の血管内皮が障害されることでおきること、そしてその抗体のターゲットが galactose  $\alpha$  (1,3) galactose ( $\alpha$  Gal) を非還元末端にもつ糖鎖であることがわかってきた。超急性拒絶反応を抑制するには、1. ヒト自然抗体を除去する、2. 移植臓器の抗原を除去する、3. 補体活性を抑える、などの方法が考えられているが現段階でどれも決定的な方法とは言えない。

## 【目 的】

この研究ではブタからヒトへの異種臓器移植において発生する超急性拒絶反応を抑制するために、抗原糖鎖をレシピエントの循環血液内に注入してヒト自然抗体を中和し不活性化することを想定し、ヒト自然抗体に対する中和能を持つ糖鎖を合成することを目的とした。

## 【方法および結果】

まず、1,6-anhydro- $\beta$ -D-galactopyranose と D-galactose の二種類の糖鎖をそれぞれ修飾して glycosyl-accepter と glycosyl-donor を合成し、Lemieux らの報告した  $\alpha$ -glycosidation の手法を用いて化学的に  $\alpha$  Gal 糖鎖を合成した。 $\alpha$  Gal 糖鎖化学合成の収率は、3.8%であった。 $\alpha$  Gal 糖鎖によるヒト血清内の自然抗体の中和能を mouse laminin を固相化抗原として用いた酵素標識免疫測定法 (ELISE) により測定したところ、60 倍の希釈ヒト血清に対し、0.1mM で 90% 異常の抑制効果が得られた。ところが化学合成法は、合成手技が煩雑であることより莫大な時間、労力、経費がかかり、抗原糖鎖の大量合成は困難となった。そこで、効率よく糖鎖を合成

することをめざし、加水分解酵素 $\alpha$ -ガラクトシダーゼが高濃度基質条件においては、加水分解と同時に縮合反応をおこすことを利用して、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼを用いた酵素反応により $\alpha$ Gal糖鎖と構造の一部異なる糖鎖 p-nitrophenyl-galactose  $\alpha$ (1,3) galactose (以下 pNP-Gal) を合成した。この酵素反応基質は、D-galactose から化学的に合成した p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactoside を使用した。 $\alpha$ -ガラクトシダーゼを用いた酵素反応による pNP-Gal 糖鎖合成の収率は、4%であった。 $\alpha$ Gal 糖鎖と同様に pNP-Gal 糖鎖のヒト血清内の自然抗体を中和する実験を行った。その結果、pNP-Gal 糖鎖でも30倍ヒト血清に対し、1mMで77%、10mMで83.4%と $\alpha$ Gal 糖鎖と同様にヒト自然抗体を効率良く中和することがわかった。

加水分解酵素 $\alpha$ -ガラクトシダーゼを用いた反応は、化学的に反応する方法に比べて合成手技が簡単で、時間、労力、経費の大幅な節約を可能とした。また、酵素による $\alpha$ Gal糖鎖の合成で一般的に使用されるガラクトシルトランスフェラーゼによる方法と比較すると、安価な酵素反応基質を使用する点で経費的に有利であり、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼを用いた合成反応は、糖鎖抗原の大量合成をするには有効な方法であった。

今後さらに in vitro および in vivo の実験による確認が必要であるが、酵素反応によって合成された抗原糖鎖を用いてヒト自然抗体を中和することにより超急行拒絶反応が抑制されれば、ブタからヒトへの異種移植の可能性が広がると考える。

## 審査結果の要旨

移植医療の拡大に伴い、各種臓器でドナー不足が深刻な問題となっている。その解決策の一つとして、ブタからヒトへの異種臓器移植が注目されている。本研究は、ブタからヒトへの discordant 異種移植における拒絶反応のうち、特にヒト自然抗体とブタ移植臓器の間におこる超強性拒絶反応の抑制について検討したものである。

ここでは、超急性拒絶反応を抑制するために、ヒト自然抗体のターゲットとなる抗原糖鎖をレシピエントの循環血液内に注入してヒト自然抗体を中和する方法を想定し、抗原糖鎖を効率よく合成することを試みている。

まず 1, 6-anhydro- $\beta$ -D-galactopyranose と D-galactose の二種類の糖類をそれぞれ修飾して glycosyl-accepter と glycosyl-donor を合成し、 $\alpha$ -glycosidation の手法を用いて、抗原糖鎖である galactose  $\alpha$  (1,3) galactose 糖鎖 ( $\alpha$ -Gal) を化学的に合成している。合成した  $\alpha$ -Gal 糖鎖によるヒト自然抗体の中和能を、mouse laminin を固相化抗原として用いた酵素標識免疫抗体法 (ELISA) により測定し、良好な抑制効果をもつことを確認している。また同時に、化学的手法による抗原糖鎖合成は、効率が悪く抗原糖鎖の大量合成に適さないことを示している。

次に、抗原糖鎖の合成を効率よく行うために、加水分解酵素  $\alpha$ -ガラクトシダーゼの縮合反応に着目し、この反応を用いて  $\alpha$ -Gal 糖鎖と一部構造の異なる p-nitrophenyl-galactose  $\alpha$  (1,3) galactose 糖鎖 (pNP-Gal) を合成している。合成した pNP-Gal 糖鎖によるヒト自然抗体の中和能を測定し、 $\alpha$ -Gal 糖鎖によるヒト自然抗体の中和能と同様に良好な抑制効果をもつことを確認している。 $\alpha$ -ガラクトシダーゼを用いた抗原糖鎖合成法は、化学合成法に比べて簡単な手法であり、また、既存の方法であるガラクトシルトランスフェラーゼを用いる合成法より安価にできるため、抗原糖鎖の大量合成に有効であることを示している。

本研究は、ブタからヒトへの異種移植における超急性拒絶反応を抑制するために使用する抗原糖鎖を効率よく合成する方法について述べている。本研究で考案された合成方法によって大量に得られた抗原糖鎖は、超急性拒絶反応の抑制に一役を担うこととなり、ブタからヒトへの異種移植の実現に寄与するものであり、十分学位に値する。