

氏 名（本籍）	わ 和 だ 田 もとし 基
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 8 5 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 4 年 3 月 2 5 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 （ 博 士 課 程 ） 医 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	ブ  タ  C  D 8 0（ B 7 - 1 ） の ク ロ ー ニ ン グ と 異 種 移 植 を 想 定 し た 機 能 の 解 析

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員	教 授 大 井 龍 司	教 授 里 見 進
	教 授 下 瀬 川 徹	

## 論 文 内 容 要 旨

移植抗原に対する T 細胞の活性化の際には、主要組織適合抗原 (MHC) -T 細胞レセプター (TCR) を介する刺激の他に副刺激 (co-stimulatory signal) と呼ばれる刺激が必要とされており、この co-stimulatory signal が欠如するとドナー抗原に特異的な免疫不応答の状態となることが知られている。

ブタは異種臓器移植の最も有力なドナー候補と考えられており、近年、ブタ臓器、組織に対するヒトの細胞性免疫反応に関する研究が精力的になされている。ブタの CD80 (B7-1) 及びその可溶性アイソフォームの遺伝子をクローニングし、異種移植を想定したブタ CD80 遺伝子導入細胞とヒト T 細胞との混合培養を行いその機能を解析した。

ヒト、マウスなど CD80 (B7-1) の遺伝子配列で種間の相同性の高い部位にプライマーを設定し、ブタ CD80 に特異的な 293 塩基対の PCR 産物をクローニングし、その塩基配列を決定した。この配列をもとに RACE-PCR (rapid amplification of cDNA) 法を用いて遺伝子全長のクローニングを行った。

さらにブタ CD80 膜貫通型遺伝子のアミノ酸コード領域 (ORF) 全長を哺乳類発現ベクターにサブクローニングし、カチオニックリポソーム法を用いて Cos-7 細胞、CHO 細胞に遺伝子導入をおこない、遺伝子導入後のブタ CD80 の発現をフローサイトメトリー、蛍光免疫染色にて確認するとともに、複数の抗体のブタ CD80 に対する (交差) 反応性を検討した。

また磁気細胞分離システムを用いて分離したヒト末梢 CD4 陽性 T 細胞とブタ CD80 遺伝子導入 CHO 細胞との混合培養を行い、T 細胞の活性化、IL-2 の産生さらにヒト T 細胞のブタ CD80 の獲得、発現について検討した。

ブタ CD80 の 3'末端の異なる 3 種類の isoform をクローニングし遺伝子配列を決定した。うち 2 つは細胞膜貫通ドメインをもたない soluble form と考えられた。研究当初、細胞内、細胞膜貫通ドメインをコードする遺伝子は検出されず、この遺伝子の 3'側が強い高次構造をとっているためと考えられたが、熱耐性逆転写酵素を用いて通常より高温で逆転写反応を行うことにより細胞膜貫通型の分子もクローニングすることができた。

ブタ CD80 遺伝子導入 Cos-7 細胞の蛍光免疫染色により、ブタ CD80 に対する抗体の (交差) 反応性を検討した結果、抗マウス CD80 (16-10 A 1) と抗ブタ可溶性 CD80 ポリクローナル抗体は反応性を有することが判明した。

CHO 細胞へのブタ CD80 の遺伝子導入後、約 60~70% の細胞に発現が観察された。さらに G 418 を含む選択培地でこの細胞を培養し、抗マウス CD80 (16-10 A 1) と磁気細胞分離システ

ムでブタ CD80 陽性細胞を分離濃縮することにより、95～99%にブタ CD80 を発現する細胞を得ることができた。

このブタ CD80 遺伝子導入 CHO 細胞とヒト CD4 陽性 T 細胞を、PHA あるいは抗 CD3 抗体による TCR 刺激下に混合培養したところ、ブタ CD80 はヒト CD28 のリガンドとしてヒトリンパ球を活性化し、IL-2 の産生が観察された。さらにこのブタ CD80 によって活性化したヒト T 細胞は、抗原提示の際にブタ CD80 を取り込み、細胞膜上に発現することがフローサイトメトリーを用いた解析により示された。

ブタ CD80 のクローニングとその膜貫通型分子の異種移植を想定した機能解析をおこなった。ブタ CD80 はヒト CD28 を介して T 細胞を活性化するだけでなく、ヒト T 細胞に獲得され拒絶反応の進展や免疫寛容などの免疫制御に重要な役割を果たしていると考えられた。CD80 などの co-stimulatory molecules の遺伝子改変は臓器移植において細胞性拒絶反応を制御する有用な手段となる可能性が示唆された。

## 審査結果の要旨

臓器移植後の急性拒絶反応などの細胞性免疫反応において co-stimulatory molecules のひとつである CD 80 (B7-1) は重要な役割をはたしている。一方ブタは異種移植において最も有力な臓器供給源と考えられており、ブタ臓器に対する細胞性免疫反応は近年さかんに研究されている。

本研究は、ブタの CD 80 (B7-1) 及びその可溶性アイソフォームの遺伝子をクローニングし、異種移植における細胞性免疫反応を想定したブタ CD 80 遺伝子導入細胞とヒト T 細胞との混合培養を行いその機能を解析したものである。

著者はまず、ブタ CD 80 の 3'末端の異なる 3 種類の isoform を RACE-PCR (rapid amplification of cDNA) 法を用いてクローニングし、遺伝子配列を決定した。うち 2 つは細胞膜貫通ドメインをもたない soluble form と考えられた。細胞膜貫通型の遺伝子の 3'側が強い高次構造をとっており、熱耐性逆転写酵素を用いて通常より高温で逆転写反応を行うことによりはじめてクローニングすることができた。

次にブタ CD 80 膜貫通型遺伝子を含む哺乳類発現ベクターを構築し、Cos-7 細胞、CHO 細胞に遺伝子導入をおこない、細胞膜上でのブタ CD 80 の発現をフローサイトメトリー、蛍光免疫染色にて確認した。同時にブタ CD 80 遺伝子導入 Cos-7 細胞の蛍光免疫染色により、ブタ CD 80 に対する複数の抗体の (交差) 反応性を検討し、抗マウス CD 80 (16-10 A 1) と抗ブタ可溶性 CD 80 ポリクローナル抗体は反応性を有することを確認した。

さらにヒト CD 4 陽性 T 細胞とブタ CD 80 を安定高発現する CHO 細胞との混合培養を行い、T 細胞の活性化、IL-2 の産生さらにヒト T 細胞のブタ CD 80 の獲得、発現について検討したところ、ブタ CD 80 は T 細胞レセプター刺激の存在下にヒト CD 28 のリガンドとしてヒト T 細胞を活性化し、IL-2 の産生が認められた。またブタ CD 80 によって活性化したヒト T 細胞は、抗原提示の際にブタ CD 80 を取り込み、細胞膜上に発現することが示された。著者はブタ CD 80 の機能として、ヒト T 細胞を活性化しうるだけではなく、ヒト T 細胞に獲得されることにより拒絶反応の進展や免疫寛容などの免疫制御に重要な役割を果たすと考察している。

本論文はブタ CD 80 細胞膜貫通型の遺伝子全長のクローニングを世界で初めて行い、異種移植における細胞性免疫反応に関する詳細な機能解析をおこない、これらの遺伝子の改変により臓器移植における細胞性拒絶反応の制御の可能性を示唆する重要かつ独創的な研究と考えられ、学位論文に十分に値するものである。