

(73)

氏名(生年月日)	ムラ 村	カミ 上	トオル 徹
本籍			
学位の種類	博士(医学)		
学位授与の番号	乙第 2032 号		
学位授与の日付	平成 13 年 2 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当(博士の学位論文提出者)		
学位論文題目	Expression of $\alpha$ Gal epitope on COS-7 cells transfected with bovine $\alpha$ 1-3 galactosyltransferase(ウシ $\alpha$ 1-3 galactosyltransferase の COS-7 細胞への導入)		
論文審査委員	(主査) 教授 相川 英三 (副査) 教授 東間 紘, 宮崎 俊一		

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

ヒト以外の動物臓器をヒトに移植する異種移植においては、移植臓器は血流再開直後におこる超急性拒絶反応(HAR)により、臓器機能が廃絶する。HARは異種臓器血管内皮細胞上の $\alpha$ Gal抗原とヒト血清中の自然抗体が結合することにより始まる。 $\alpha$ Gal抗原は $\alpha$ 1-3 galactosyl transferase ( $\alpha$ 1-3 GT)によって合成されることが知られている。我々は、黒毛和牛胎児線維芽細胞において $\alpha$ 1-3 GTの相同組替え体を樹立し、これより核移植術を利用して $\alpha$ 1-3 GTをノックアウトした個体の作出を計画している。その前段階として本実験では、黒毛和牛 $\alpha$ 1-3 GT cDNAをクローニングし、この発現ベクターを構築、 $\alpha$ Gal抗原陰性のCOS-7細胞に導入することにより、黒毛和牛 $\alpha$ 1-3 GT cDNAが異種細胞において機能を発現するか否かを検討した。

#### 〔対象と方法〕

黒毛和牛の末梢白血球から抽出したRNAを用いて、RT-PCR法により $\alpha$ 1-3 GT cDNAをクローニングし、発現ベクターを構築した(N3GA)。N3GAはpositive selectionに用いるネオマイシン耐性遺伝子を有している。導入の標的細胞にはヒトと同じく $\alpha$ Gal抗原陰性であるサル腎上皮由来のCOS-7細胞を用いた。まず、N3GAをリポフェクション法により、COS-7細胞に導入した。COS-7細胞における $\alpha$ Gal抗原表出の有無を確認するため、N3GA導入24時間後にFITCでラベルしたisolectin B4 (IB4 lectin;  $\alpha$ Gal抗原を特異的に認識)と導入細胞を反応させ、蛍光顕微鏡により観察した。さらに、N3GAが導入されたCOS-7細胞を

選択するためネオマイシン含有培養液下で培養し、2週間後にIB4 lectinと反応させ、フローサイトメトリーにより $\alpha$ Gal抗原表出の有無を確認した。

#### 〔結果〕

N3GAをリポフェクション後24時間での検討では、N3GA非導入COS-7細胞がIB4 lectinで染色されないのに比し、N3GA導入COS-7細胞ではIB4 lectinで良好に染色された。さらに、ネオマイシン含有培養液を用いた培養2週間後のフローサイトメトリーによる検討では、N3GA導入COS-7細胞においてはIB4 lectin染色により、明らかなpositive log shiftを認めた。

#### 〔考察〕

異種移植の実現を目指し、いくつかのtransgenic animalが作製されているが、未だ $\alpha$ 1-3 GTをノックアウトした動物の作製は実現していない。本邦では黒毛和牛における核移植技術が確立されているので、まず核移植を行う系のウシから $\alpha$ 1-3 GT cDNAを抽出する必要がある。本実験では黒毛和牛から $\alpha$ 1-3 GT cDNAをクローニングし、これが実際に $\alpha$ Gal抗原陰性であるCOS-7細胞においても機能することを示した。本実験結果は $\alpha$ 1-3 GTをノックアウトした個体を作出するための基礎データとして有用であると考えられる。

#### 〔結論〕

本研究では、黒毛和牛 $\alpha$ 1-3 galactosyltransferase cDNAをクローニングし、発現ベクターを構築した。これをリポフェクション法で $\alpha$ Gal抗原陰性の異種細胞であるCOS-7細胞に導入した結果、酵素機能を発現することが明らかとなった。

## 論文審査の要旨

異種臓器移植において $\alpha 1-3$  GT 遺伝子を和牛でノックアウトすることができれば、ドナーとして優れた個体を作ることができる。

本研究は黒毛和牛の $\alpha 1-3$  GT cDNA をクローニングし、この発現ベクターを用いて、 $\alpha$ Gal 抗原陰性の COS-7 細胞に導入することにより黒毛和牛 $\alpha 1-3$  GT 遺伝子が機能発現することを明らかにした。異種臓器移植のためのノックアウトウシの作出に多大な貢献をするもので、学術上きわめて価値の高い論文である。

### 主論文公表誌

Expression of  $\alpha$ Gal epitope on COS-7 cells transfected with bovine  $\alpha 1-3$  galactosyltransferase (ウシ $\alpha 1-3$  galactosyltransferase の COS-7 細胞への導入)

東京女子医科大学雑誌 第 70 巻 第 6・7 号  
335-341 頁 (平成 12 年 7 月 25 日発行) 村上

徹, 澤田登起彦, 横山尚彦, 宇留野勝好, 青柳  
敬人

### 副論文公表誌

- 1) ウシ胎児線維芽細胞における $\alpha$ Gal 抗原に関する検討. 日移植会誌 34(6):367-371 (1999) 村上徹, 澤田登起彦, 中島一朗, 瀧之上昌平, 他 4 名