日消外会誌　29（4）：907～910，1996年

特集11

遺伝子制御による異種移植の研究

名古屋大学医学部第2外科
林　衆治　長坂　隆治　片山　昭男　禰宜田政隆
小池　千裕　横山　逸男　高木　弘

異種臓器移植は脳死ドナー不足を解決する有力な手段であるが，移植後早期に生ずる超急性拒絶反応が最大の問題である．我々は，in vitro で補体制御因子遺伝子導入の効果を検討するとともに，アデノウイルス法を用いて in vivo での遺伝子導入の可能性を検討した．その結果，補体制御因子遺伝子導入により異種免疫反応は効果的に抑制されること，アデノウイルス法での遺伝子導入は特に異種移植ドナーとして最適と考えられているブタ肝臓で有効であることが明らかとなった．以上より，遺伝子治療の技術のひとつであるアデノウイルス法は遺伝子制御による異種移植に有効であることが示唆された．

Key words: xenotransplantation, gene engineering, complement activation

はじめに

脳死臓器移植は欧米においてすでに一般的な治療手段として確立されているが，最近ドナー不足の問題が大きくクローズアップされてきている．そのための動物の臓器をヒトへ移植する異種臓器移植がドナー不足を解決する手段として近年精力的に研究されている．ブタは異種移植ドナーとして解剖学的にもまた倫理的にもヒトに最適と考えられているが，自然抗体および補体系の活性化により生ずる超急性拒絶反応 hyperacute rejection（HAR）が最大のバリアーである．超急性拒絶反応は，補体系 classical pathway の活性化および alternative pathway の活性化により生ずると考えられており，細胞膜表面においてこれら補体系の活性化は補体制御因子によってコントロールされている．Decay accelerating factor（DAF，CD55），membrane cofactor protein（MCP，CD46）は C3レベルで，また homologous restriction factor 20（HRF20，CD59）は C9レベルで補体系活性化をコントロールしている[1)2)]．我々は，以前にモルモットからラットへの異種移植モデルにおいて，補体系活性化を抑制する cobra venom factor（CVF）と抗体産生を抑制する deoxyspergualin（DSG）および splenectomy 用いた場合，graft survival が相乗的に延長することを報告した[3)]．したがって，異種臓器移植の成功の鍵は，補体系の制御および異種抗体のコントロールであると考えられる．しかし現在のところ臨床応用可能な免疫抑制療法はない．異種移植ドナーに対する遺伝子操作としては，補体制御因子遺伝子導入および異種抗原 Galα(1，3)Gal を誘導する α(1，3)galactosyl transferase 遺伝子抑制が考えられ[4)]，欧米ではすでにヒト補体制御因子遺伝子導入 transgenic pig の作成に成功している[5)~7)]．しかし，transgenic pig の心臓を用いた灌流実験および移植実験では，graft survival 24～48時間と期待されたほど成績が得られていない．我々は，遺伝子導入の方法論として transgenic technique にさらに gene therapy の技術を用いて遺伝子補強を行い，臨床応用することを考えている．したがって，ブタからヒトへの遺伝子制御による異種臓器移植を臨床応用するために，我々は，大動物としてブタからサル，小動物としてモルモットからラットの組み合わせで，遺伝子制御による異種移植実験を行うべく in vitro および in vivo で検討を行った．

対象と方法

細胞と臓器：ウシ血管内皮細胞（BAEC）およびモルモット培養細胞104C1を in vitro の実験で用い，ブタ腎および肝，ラット腎および肝を in vivo の実験で用いた．

＊第46回日消外会総会シンポ2・臓器移植の現況と21世紀への展望
＜1995年12月6日受理＞
別刷請求先：林　衆治
〒466　名古屋市昭和区鶴舞町65　名古屋大学医学部第2外科

遺伝子：ヒト補体制御因子(DAF，HRF20)遺伝子，ラット補体制御q（512）遺伝子，およびβ galactosidase（LacZ）遺伝子を用いた．

ベクター：レトロウイルスベクターLDAFRNL，LHRF20RNL，L512RNLおよびアデノウイルスベクターpADexLacZを作成した．

In vitroでの遺伝子導入：作成したレトロウイルスベクターを用いて，培養細胞BAECおよび5I2に遺伝子導入を行った．遺伝子導入細胞は，ジェネテイシン(G418，Gibco）で選択した．

In vivoでの遺伝子導入：肝臓へは，門脈からの注射により遺伝子導入し，また腎臓へは，腎動脈からの腎灌流を30分間行うことにより遺伝子導入した．

In vitroでの遺伝子発現：遺伝子導入細胞での遺伝子発現は抗DAF抗体，抗HRF 20抗体，抗512抗体との染色によりフローサイトメトリー(FACS)で確認した．補体反応抑制効果は，遺伝子導入BAECに対してはヒト血清と37°C 3時間反応させることにより3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)を用いた細胞障害試験にて検討し，また遺伝子導入512に対してはラット血清と37°C 3時間反応させることによりMTT法にて検討した．

In vivoでの遺伝子発現：ブタ臓器は遺伝子導入1週間後に摘出，またラット臓器は遺伝子導入4日後に摘出し，X-gal染色を行った．

結　果

In vitroでの遺伝子発現：BAECでの遺伝子発現は，DAF発現に関しては，FACSでのmean channel shift (MCS)で，4.79から32.20，またHRF20発現に関しては，6.34から14.23であった．104C1での5I2遺伝子発現は，MCSで，5.7から297.1であった．

In vitroでの遺伝子導入効果：BAECを25%ヒト血清と3時間反応させた場合，細胞のviabilityは61±7%であった．それに対し遺伝子導入細胞では遺伝子発現の強度に応じて細胞のviabilityは上昇した(**Fig. 1**)．またモルモット培養細胞104C1にラット補体制御因子5I2遺伝子を導入した場合も同様に，遺伝子発現の強度に応じて細胞のviabilityは上昇した(**Fig. 2**)．

In vivoでのLacZ遺伝子発現：ブタ肝での遺伝子発現は，類洞およびgllison血管系を中心に遺伝子発現を認めるのに対し，ラット肝では肝細胞を中心に遺伝子発現を認めた(**Fig. 3A，3B**)．ブタ腎での遺伝子発現は，中小腎動脈を中心に認めるのに対し，ラット腎では糸球体および尿細管周囲血管網で遺伝子発現を認めた(**Fig. 4A，4B**)．また，脾臓では，白脾髄marginal zoneを中心としてリンパ組織で遺伝子発現を認めた．

Fig. 1　Inhibition of human complement mediated lysis on the xenoendothelial cells transfected with DAF or HRF20 gene.

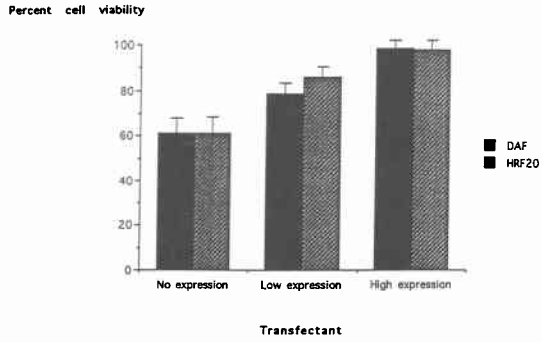
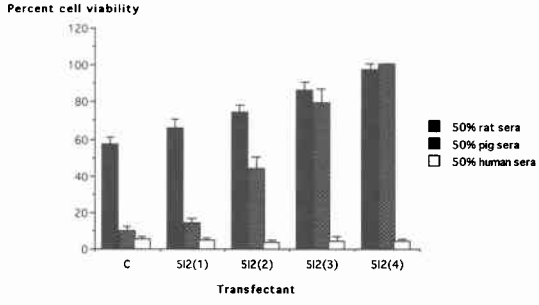


Fig. 2　Inhibition of rat complement mediated lysis on guinea pig cells transfected with 512 gene.



考　察

今回のin vitroの結果は，補体制御因子遺伝子導入異種培養細胞では，ヒト補体反応活性化に抵抗性を示すこと，遺伝子発現が高ければ高いほどより補体反応を抑制することを示している．我々の研究では，補体制御因子遺伝子をひとつだけ導入するよりも複数導入したほうがより効果的であるという結果が認められており[8]，したがって，異種補体反応をより効果的に抑制するためには，補体制御因子を高発現させるか，複数導入したほうが望ましいであろうと考えられる．実際，DAFおよびHRF20遺伝子を同時に導入したtransgenic mouseを用いた実験でも，これを裏づけるデータを得ている．我々は，移植臓器に遺伝子を高発現させる方法論として，近年欧米で臨床応用され始めてお

Fig. 3 Expression of LaeZ gene on the liver using adenoviral vector.
A : pig liver, B : rat liver.

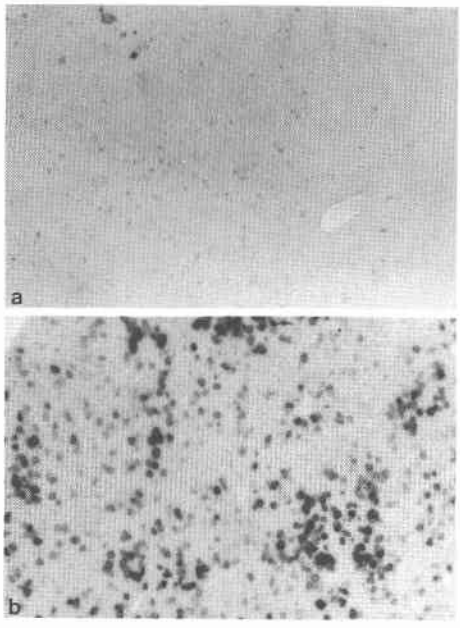
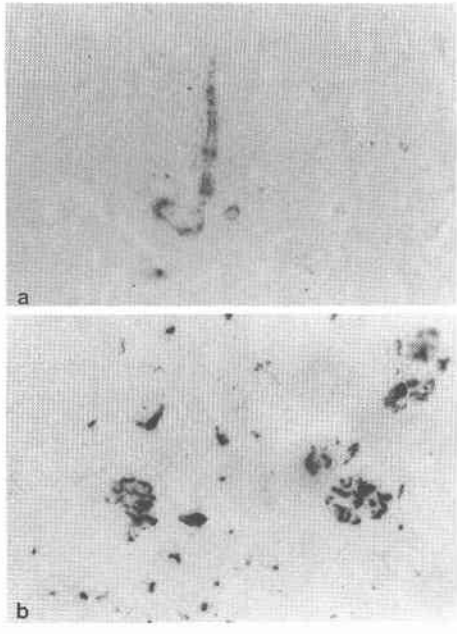


Fig. 4 Expression of LacZ gene on the kidney using adenoviral vector.
A : pig kidney, B : rat kidney.



り，移植臓器に対する遺伝子導入方法として最適と考えられるアデノウイルス法を用いて臓器への遺伝子導入を検討した[9)10)]．その結果，ブタ肝では内皮細胞，ラット肝では肝実質細胞と遺伝子導入細胞に違いはあるが肝で高発現が得られることが明らかとなった．特にブタ肝では超急性拒絶反応の最大のターゲットである内皮細胞に高発現を認め，遺伝子導入臓器として適していると考えられた．しかしこれまでの報告では，アデノウイルス法では遺伝子発現は一過性であり免疫学的機序によりウイルスの再使用は困難と考えられている[11)]．事実，我々の検討でも，免疫反応に大きな役割を果たす脾臓で遺伝子の取り込みが認められている．特に marzinal zone はTリンパ球非依存性抗体産生が行われることが知られている．したがって遺伝子導入後早期の抗体産生を抑制することが遺伝子発現の程度および持続時間に関係するのではないかと考えられ，この点から検討を行っている．

文　献

1) 林　衆治，小池千裕，磯部健一ほか：ヒト補体制御因子遺伝子を用いた異種臓器移植の研究．日臨 **52**：1－12，1994
2) 林　衆治，磯部健一，恵美宣彦ほか：遺伝子制御による異種移植．今日の移植　**7**：351－355，1994
3) Hayashi S, Ito M, Yokoyama I et al: Evidence that combination therapy using cobra venom factor, splenectomy, and deoxyspergualin is effective in guinea pig to rat cardiac xenotransplantation. Transplantation **57**: 777－779, 1994
4) Fodor WL, Squinto SP: Engineering of transgenic pigs for xenogeneic organ transplantation. Xeno **3**: 23－25, 1995
5) Fodor WC, Williams BL, Matis LA et al: Expression of a functional complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. Proc Natl Acad Sci USA **91**: 11153－11157, 1994
6) McCurry KR, Kooyman DL, Alvarado CG et al: Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. Nature Med **1**: 423－427, 1995
7) Rosengard AM, Cary NRB, Langford GA et al: Tissue expression of human complement inhibitor, decay-accelerating factor, in transgenic pigs. Transplantation **59**: 1325－1333, 1995
8) Hayashi S, Isobe K, Emi N et al: Evidence double transfection to xenoendothelial cells

using GPI-anchoring complement regulatory factor (decay accelerating factor and homologous restriction factor 20) gene is useful for the inhibition of human complement mediated cytolysis. Transplant Proc 27 : 330, 1995

9) Jaffe HA, Danel C, Longenecker G et al: Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat. Nature Genetics 1 : 372−378, 1992

10) Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL et al: Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. J Clin Invest 92 : 536−537, 1993

11) Yang Y, Nunes FA, Berencsi K et al: Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA 91 : 4407−4411, 1994

Organ Xenotransplantation with Gene Enginerring

Shuji Hayashi, Takaharu Nagasaka, Akiko Katayama, Masataka Negita,
Chihiro Koike, Itsuo Yokoyama and Hiroshi Takagi
Department of Surgery II, Nagoya University School of Medicine

Organ xenotransplantation is an attractive method to compensate for the cadaveric donor shortage. However, hyperacute rejection is a great barrier to successful organ xenotransplantation. In this study, the authors examined the effect of in vitro gene engineering with regulator of complement activation (RCA) molecules such as DAF and HRF20, and the possibility of applying in vivo gene enginerring to the xenogeneic liver and kidney using an adenoviral vector. It was concluded that complement activation is inhibited by the gene engineering with RCA molecules against the xenogeneic cells, and that an adenoviral vector is a useful method for in vivo gene engineering to the xenogenic organs.

Reprint requests: Shuji Hayashi Department of Surgery II, Nagoya University School of Medicine
65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, 466 JAPAN