

## 論文内容要旨

Expression of recipient CD47 on rat insulinoma cell xenografts prevents macrophage-mediated rejection through SIRP $\alpha$  inhibitory signaling in mice

(異種移植における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)

PLOS ONE, 2013, in press.

主指導教員：大段 秀樹 教授

(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)

副指導教員：越智 光夫 教授

(統合健康科学部門 整形外科学)

副指導教員：田代 裕尊 准教授

(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)

寺岡 義布史

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

## [背景・目的]

臓器移植ドナー不足の究極的解決策として、ヒトとの生理学的・解剖学的類似性からブタを用いた異種移植に期待がかかる。近年、主要異種抗原である $\alpha$ Gal 抗原をノックアウトしたブタが開発され、超急性拒絶反応はほぼ克服されつつあると考えられている。しかしながら、引き続きおこる細胞性免疫による遅延型異種移植反応については解明されていない。長期生着異種臓器にはマクロファージ浸潤を伴う血管病変が認められることから、同種移植に匹敵する成績を得るには、マクロファージ性拒絶反応を制御する必要があると考えられている。

マクロファージの自己寛容機構として、赤脾髄マクロファージの阻害受容体シグナル制御蛋白 $\alpha$  (SIRP $\alpha$ )が、赤血球上の CD47(インテグリン関連蛋白質)を認識し非特異的活性化を抑制することが報告された。当研究室では、CD47- SIRP $\alpha$ の抑制シグナルを応用し、ヒト CD47 をブタ細胞上に遺伝子導入することでブタ細胞に対するヒトマクロファージの貪食能を減弱させることを *in vitro* で証明してきた。

本研究では、ドナー細胞へのレシピエント種 CD47 の遺伝子導入による移植片生着延長効果を *in vivo* モデルを用いて証明した。

## [方法・結果]

マクロファージ SIRP $\alpha$ は CD47 を認識すると、細胞内チロシン残基がリン酸化され、抑制性シグナルが伝達する。まずマウスのマクロファージをマウス赤血球と共培養すると SIRP $\alpha$ のチロシンリン酸化を認めるが、ラット赤血球と共培養すると SIRP $\alpha$ のチロシンリン酸化を認めないことを Western blot で確認した。つまりラットとマウスにおいて CD47 遺伝子の塩基配列相同性は 85%と低いため、ラット-マウス間では CD47- SIRP $\alpha$ シグナル伝達に不応性があること証明した。

本研究では、ラット-マウス間における異種細胞移植モデルを用いて、マクロファージ性傷害に対するレシピエント種 CD47 分子の遺伝子導入の有効性を *in vivo* で解析した。

ラットのインスリノーマ細胞に遺伝子導入を用いてマウスの CD47 を発現させた。これをフローサイトメトリーで確認したところ、マウスの末梢血リンパ球よりも高発現していた。同時にコントロールベクタを遺伝子導入したラットインスリノーマも作成し、実験のコントロール群とした。そして、マウス CD47 を遺伝子導入したラットインスリノーマとマウスマクロファージと共培養すると、マクロファージ SIRP $\alpha$ のチロシンリン酸化が認められることを Western blot で証明した。

次に、T, B, NK 細胞は存在せず、マクロファージ機能のみ正常な Rag2<sup>-/-</sup>  $\gamma$  chain<sup>-/-</sup> マウス (DKO マウス)を糖尿病化した後、ラットインスリノーマを腹腔内に投与した。6 時間後に腹腔内細胞を回収し、マクロファージのインスリノーマ貪食率を測定した。コントロールベクタを遺伝子導入したラットインスリノーマをコントロール群として、マウス CD47 を遺伝子導入したラットインスリノーマを投与した群と比較した。コントロール群に比べて

マウス CD47 遺伝子導入群では、インスリノーマを貪食したマクロファージの比率が有意に低かった。

また、糖尿病化した DKO マウスにラットインスリノーマを腹腔内投与し、7日間血糖値の推移を測定した。コントロール群では腹腔内投与後、一時的な血糖値の降下を認めるものの再び高血糖となるのに対して、マウス CD47 遺伝子導入ラットインスリノーマを投与した群においては持続的な血糖値の降下を認めた。

さらに、抗 SIRP $\alpha$ 抗体を用いて CD47-SIRP $\alpha$ シグナルを遮断した条件下で、同様の実験を行った。コントロール群においては、変わらず一時的な血糖値の降下を認めるものの、再び高血糖となった。一方、マウス CD47 遺伝子導入ラットインスリノーマを投与した群においては、持続的な血糖値の降下は見られず、血糖値は再び高値となることを認めた。

#### [考察]

本研究では、マクロファージによる異種細胞の貪食機構には種特異的な CD47-SIRP $\alpha$ シグナルが関与しており、これを回避するにはレシピエント種 CD47 の遺伝子導入が有効であることを *in vivo* 疾患モデルで証明した。

この治療手段では、宿主に非特異的な免疫抑制を必要としないため、生体防御機構に影響を与えることなくマクロファージ性拒絶を制御し得る方法として、異種移植の臨床導入に大きく貢献できると考えられる。