

令和元年5月27日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05401

研究課題名(和文) 多分子を同時安定高発現する遺伝子導入法の開発

研究課題名(英文) The development for the stable high expression of numerous transgenes.

研究代表者

宮川 周士 (Miyagawa, Shuji)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90273648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：トランスジェニックブタ用に(N)CTDMとHLA-Ev(147)を作出した。CTDMは発現が効率的でなく、C1DMとTMに分けた。HLA-Ev(147)は、2Aシステムを利用してbeta2mを繋いだ。他、CD47とTFPIをPI-anchorに繋いだ。

次に、ROSA26へのknock-inを研究した。CRISPR/Cas9法を用い、3箇所にguide-RNAを設定し、DNA切断効率を判定した。また、新しくCD200とCL-S-Dのマクロファージと、CD31の好中球の制御方法を研究し証明した。更に、PQA-18を検定し、マクロファージの制御に有効であることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の我々の研究は、国際的にも独自性が高いものであり、遺伝子改変ブタ作りに有効である。また、ROSA26の座に遺伝子をknockinさせる方法を確立させる事も有効である。更に、新たに異種移植に有効な分子を数々検定し、また免疫抑制剤を研究する事も、この分野に非常に有効と考えられる。

我々がこれらの遺伝子改変ブタを作出できなければ、外国の遺伝子改変ブタを使う事になる。これに伴い、関連する分野も含めて日本のこの分野での立ち遅れが必至となる。逆に、成功すれば、アジアを中心に、アメリカ、欧州への輸出が可能になり、これまで人の死を前提としていた移植医療を根本的に変える事になる。

研究成果の概要(英文)：We have produced special construct genes. The expression of NCTDM was not efficient, then separated to C1DM & TM. HLA-Ev(147)-2A-beta2m was also produced. In addition, we produced PI-anchored CD47, PI-anchored TFPI. A project of pig ROSA26 locus was started. We demonstrated the targeted knock-in of a gene cassette in this locus. Three guide RNA-sequences were designed, using CRISPR/Cas9 system, and the cleavage efficiency of each plasmid was assessed. We studied novel strategies for suppressing macrophages and neutrophil-mediated xenogeneic rejection using pig ROSA26 locus. Moreover, we focused on the effect of new immunosuppressants on monocyte/macrophages, such as a PQA-18. PQA-18 showed the potential function on macrophage-mediated cytotoxicity, as an immunosuppressant for xenotransplantation.

研究分野：異種移植

キーワード：special construct pig ROSA26 locus CD200 CL-SP-D CD31 PQA-18

1. 研究開始当初の背景

歴史的に、我々が世界に先駆けて異種移植の拒絶反応は宿主の補体と移植片の補体制御因子の種差による現象であることを明らかにした。そこにtransgenic(TG)技術の進歩が加わり、世界的にヒト補体制御因子のTG-ブタの開発競争が始まった。次に、 α -Gal (最大の糖鎖抗原)の存在が明らかになり、異種糖鎖抗原の研究とその除去(knockout:KO)が中心になった。数年前、新規法によるKOがブタでも成功し、 α -Galと同時に、異種糖鎖抗原の一つであるH-D抗原(CMAH gene)のDKOブタの報告が出た。我々もこのDKOブタの作出に成功している。多分子発現の現況では、各国とも多分子発現のブタを開発している。しかし、遺伝子導入に関しては一定していない。つまり、KOの簡便化に伴い、時代は、多分子をいかに同時に安定高発現させるかに焦点を移している。

2. 研究の目的

臨床に使えるDPFのブタを用意し、そのブタで新たに α -GalとCMAHにKOをかけ、補体制御因子や凝固因子やHLA-class I 遺伝子、等をhybridや2Aで繋いだ遺伝子を遺伝子導入させ、臨床応用可能なバイオ人工膵島細胞の供給源となる移植用ブタを作出する事を目的とする。移植用ブタのhybrid遺伝子つくりと、同時に、新たに有益な分子見つけ出す事を目的とする。

3. 研究の方法

(1)新奇遺伝子構築

基本的戦略としては、我々はこれらの分子のhybridを作製し、高発現株をin vitroで作り、その核を導入する方法を取れるように設計する。既存の遺伝子をつなぎ合わせる。また、発現しやすい格好に組み替える。高発現を得るのに、cDNAのcodonを改変しブタで至適なものとする。

(2) 導入分子発現の確認

作出したHybridsを通常通り遺伝子導入し、Cell Sorting法(FACS)でhybrids分子のブタ細胞での発現を確認する。

(3) Rosa26 Locusへのknock in (KI) 法

(ブタでも安定高発現とされる)Rosa26 Locusに、CRISPR法を用いて、導入予定遺伝子をKIさせるための操作。マウスでの報告から、遺伝上でブタでの相同部位を同定。そこに、多数箇所targeting siteを設定、off targeting効果を調べ、可能性の少ない部位を3箇所選出した。CRISPR/Cas9(U6-qRNA of ROSA-pX330)を作成、各移植用のブタ線維芽細胞でKI効率を検討する。

(4) 免疫学的解析

CD200の研究では、ヒト単球様細胞株、THP-1はCD200Rを発現していないため、CD200Rを発現するTHP-1/CD200Rを作成。次いでSECおよびSEC/CD200に対するTHP-1若しくはTHP-1/CD200Rによる細胞傷害活性を検討した。CD31では、遺伝子をブタ血管内皮細胞(SEC)に移入し、CD31発現SECを作成。SECもしくはSEC/CD31をHL-60(好中球様細胞)及び末梢血中の好中球と共培養し、好中球誘導細胞傷害活性におけるCD31の効果はWST-8 assayにて検討した。好中球のネトーシスの検査はSYTOXgreen染色及びCD66b染色の二重染色によった。また、M1 Macrophageへの分化・極性は、HLA-DR、及びCCR7とCD14の発現を調べた。

4. 研究成果

(1) 新奇遺伝子構築に関する研究 (既存遺伝子の hybrid)

NCTDM : C1-INHH・Thrombomodulin(Tm)・DAF・MCP の機能ドメインの hybrid.

この構築はブタ血管内皮細胞 (PEC) 及びブタ線維芽細胞での発現検定で、わずかの発現しか得られなかったため、方針を変え、C1DM と TM に分けた。検定には CAG を使用し、PEC 及びブタ線維芽細胞で一定の発現を得た。

HLA-Ev : HLA-Ev(147)-2A-human-b2-microglobulin (hb2m). 同じく、CAG 下で、PEC 及びブタ線維芽細胞で一定の発現を得た。

PI-anchored CD47 と PI-anchored TFPI

CD47 が細胞内 tail を持ち、導入ブタ細胞に何らかのシグナルを入れるため、DAF (CD55) の PI-anchored を CD47 の機能ドメインの下につけた。TFPI は 3 つのドメインに分かれ、K1 は凝固因子 VIIa・TF、K2 は凝固因子 Xa、K3 はヘパリンの結合部位であるが、この K1 と K2 に DAF (CD55) の PI-anchored を新奇に繋げた構造を作成した。これらは CAG に繋ぎ、ブタ細胞での発現を確かめた。

(2) Rosa26 Locus への knock in (KI) に関する研究

ブタでのこの部位への遺伝子導入に際し、CRISPR/Cas9 (U6-qRNA of ROSA-pX330) を 3 種類 (3 箇所) 用意し、胎児ブタの線維芽細胞を用いてその target の効率を検討した。最も効率の高い KI-vector (ROSA-pX330) を得た。

(3) 新規有効遺伝子の開発

CD200: CD47 以外にも monocyte/macrophage の制御効果を持つ分子の作成が重要と考え、この分子を同じく CAG に繋ぎ、PEC へ遺伝子導入し一定の発現を得た。ヒト単球様細胞株である THP-1 細胞は CD200R を発現していないため、CD200R 遺伝子を THP-1 細胞に遺伝子導入し、まずはヒト monocyte/macrophage の代わりとし、抑制効果を検討した。さらに、ヒト抹消血 (PBMC) から monocyte/macrophage を誘導、同じくその抑制効果を検討し、一定の効果を得た。

(肺細胞サーファクタント) SP-D: この分子が同じく macrophage のシアル酸に効果的に接着し、その抑制効果があることを踏まえ、PL-SP-D 遺伝子を開発した。同じく CAG に繋ぎ、PEC へ遺伝子導入し一定の発現を得た。さらに、THP-1 細胞による SEC 細胞への障害性試験では、この分子は有意に THP-1 細胞を抑制した。

CD31: この分子の neutrophil に対する抑制効果を検討した。CD31 は、DMSO 存在下で培養した HL-60 (好中球様細胞) 及び neutrophil の SEC に対する細胞傷害活性を著明に抑制した。次に CD31 の neutrophil NETosis に対する影響を検討したところ、同じく著明に抑制した。

(4) 新奇免疫抑制剤の検討

PAK2 inhibitor (PQA-18)、及び JAK-3 inhibitor (Tofacitinib) について、macrophage や lymphocyte に対する抑制効果を invitro で検討した。PQA-18 に関しては、ブタ細胞に対する毒性が低いことを証明した上で、両薬がヒト macrophage の分化を抑え、SEC 細胞への細胞障害性も有意に抑える事を証明した。また、IL-2 刺激による T 細胞の増殖に関しても効果を認めた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Lo PC, (10), Miyagawa S. The novel immunosuppressant prenylated quinolinecarboxylic acid-18 (PQA-18) suppresses macrophage differentiation and cytotoxicity in xenotransplantation. Immunobiology. 2019 Apr 2. DOI: 10.1016/j.imbio.2019.04.003. 査読有

R Sakai, (10), H Nagashima, H Okuyama, S Miyagawa. Immunological response of pigs anti-human cell, including issues such as the production of natural antibodies in newborns. Transplant Proc. 2018;50:2839-2841. DOI: 10.1016/j.transproceed.2018.03.074. 査読有

Sakai R, (10), Miyagawa S. Human CD200 suppresses macrophage-mediated xenogeneic cytotoxicity and phagocytosis. Surg Today. 2018;48:119-126. DOI: 10.1007/s00595-017-1546-2. 査読有

P Jiaravuthisan, (10), S Miyagawa. A membrane-type surfactant protein D (SP-D) suppresses macrophage-mediated cytotoxicity in swine endothelial cells. Transplant Immunol 2018;47:44-48. DOI: 10.1016/j.trim.2018.02.003. 査読有

H-T Wang, (11) and S Miyagawa. Human CD31 on porcine cells suppress xenogeneic neutrophil-mediated cytotoxicity via the inhibition of NETosis. Xenotransplantation 2018:e12396. DOI:10.1111/xen.12396. 査読有

R Sakai, (5), H Nagashima, H Okuyama, S Miyagawa. Studies of innate immune systems against human cells. Transplant Immunol 2017; 40:66-71. DOI: 10.1016/j.trim.2016.12.002. 査読有

〔学会発表〕(計18件)

Asia Pancreas and islet Transplantation Association. Seoul, South Korea 2019 Feb 21-23

The strategies for preventing the macrophage-mediated rejection in xenotransplantation. A Maeda, (11), S Miyagawa.

The Transplantation Society. Madrid, Spain 2018 June 30 to July 5

Human CD31 suppress macrophage-mediated xenogeneic rejection. A Maeda, (9), S Miyagawa.

PQA-18, a novel immunosuppressant, suppresses macrophage differentiation and macrophage-mediated xenogeneic cytotoxicity. P-C Lo, (8), S Miyagawa.

Human CD47 suppresses neutrophil-mediated xenogeneic rejection. R Sakai,(8), S Miyagawa.

15th Congress of the Asian Society of Transplantation. Cebu,Philippine 2017 Nov.28-30.

The membrane-type surfactant protein D may provide an effective therapeutic strategy to inhibit macrophage-mediated xenograft rejection. S Miyagawa, et al.

The immunological response of pigs anti-human cell, included issues such as the production of natural antibodies in newborn. R Sakai,(10), H Nagashima, H Okuyama, S Miyagawa.

CD200 suppresses the M0 but not M1 macrophage mediated xenocytotoxicity. R Sakai, (9),

S Miyagawa.

The 14th International Xenotransplantation Association, in Baltimore
2017 Sep 20-13.

The innate immunological response of pigs against humans. R Sakai, (9), H Nagashima,
H Okuyama, S Miyagawa.

Suppression of macrophage-mediated cytotoxicity by a membrane-type SP-D. P
Jiaravuthisan,(8), S Miyagawa.

hCD200 suppresses the M0 macrophage-mediated cytotoxicity through binding to CD200R.
A Maeda, (7), S Miyagawa.

Human CD31 suppresses the neutrophil-mediated xenogeneic rejection. A Maeda,(6), S
Miyagawa.

Joint Conference 5th KXA Symposium & 12th Seoul Forum on Xenotransplantation 2016 Nov.24

The Strategies for Preventing the Macrophage-mediated Rejection in
Xenotransplantation. Akira Maeda.

JAACT/日本動物細胞工学会 2016 Kobe Nov.9-13.

ROSA26-targeted knock-in using CRISPR/Cas9 system in pigs. M Watanabe, (5), M Ikawa,
S Miyagawa, H Nagashima.

International Complement Workshop in Kanazawa 2016 Sep. 4-8.

Human DAF suppresses macrophage-mediated xenogeneic cytotoxicity and phagocytosis
through the binding of SCR-4 to the inhibitory receptor. R Sakai,(10),S Miyagawa.

Expression of complement regulatory factors in the rat renal grafts is associated with
the progress of acute T-cell mediated rejection. K Yamanaka, S Miyagawa, et al.

The Transplantation Society Hong Kong 2016 Aug 20-23

SCR-4 is required for CD55-induced suppression on macrophage-mediated cytotoxicity.
A Maeda, (9), S Miyagawa.

Human CD200 suppresses the M0 macrophage-mediated cytotoxicity in xenotransplantation.
A Maeda, (9), S Miyagawa.

Depression of complement regulatory factors in rat and human renal grafts is associated
with the progress of acute T-cell mediated rejection. K Yamanaka,(1), S Miyagawa, et al.

〔図書〕(計 2 件)

S Miyagawa. REMINISCENCES OF XENOTRANSPLANTATION STUDIES
2018, p241-266. [Recollections of Pioneers in Xenotransplantation Research Edit by David
K.C. Cooper MD, PhD, FRCS] by Nova science publisher.

S Miyagawa, et al. The State of Xenotransplantation. [Xenotransplantation New Insights] Open access Publisher INTECH. 2017, p3-10.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：長嶋 比呂志

ローマ字氏名：Hiroshi Nagashima

所属研究機関名：明治大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 50318664

(2)研究協力者

研究協力者氏名：伊川 正人

ローマ字氏名：Masahito Ikawa