

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16276

研究課題名(和文)人工バイオマーカーによる移植臓器機能のモニタリング

研究課題名(英文)Artificial biomarkers for monitoring graft function after organ transplantation

研究代表者

水野 直彬(MIZUNO, Naoaki)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：30815642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、臓器再生研究の基盤技術として「レシピエント臓器とドナー型臓器の機能を反映する“人工バイオマーカー”を有する遺伝子改変モデル動物の作成」を目標とした。概念実証実験として、移植による臓器再生手技の確立されている肝臓をモデル臓器とし、肝臓特異的の血清マーカーであるアルブミン(Alb)を標的とした。Alb coding sequenceに2A配列と薬剤誘導型自殺遺伝子を挿入した新規ノックインマウスを樹立した。当該マウスでは変異型Albと野生型Albを血清ELISAで測定し、低侵襲で臓器機能を一定程度推測することが可能であった。しかし、その相関は非線形であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器再生研究においては、もともとの臓器の残存機能と再生臓器の機能を切り分けて評価する手法が必要だが、これまでは実験個体を安楽死処理して病理学的に評価する必要があった。本研究では、元の臓器と再生臓器を個別に評価できる人工バイオマーカーを遺伝子改変により導入したマウスを作成し、血液検査を行うことで連続的に臓器機能の移り変わりを評価可能となることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we established a new mice model which monitors organ function after transplantation / regenerative medicine. We knocked-in 2A peptide and suicide gene following endogenous albumin coding sequence. 2A tagged Alb could be quantified by ELISA, so the mutant Alb works as an artificial biomarker that represent the residual recipient's liver function. We could estimate recipients' liver function by minimally invasive blood tests instead of pathological assessments from sacrificed mice. However, the serotype of transgenic/endogenous albumin does not linearly correlate with hepatocyte chimerism. It might be because mutant albumin is less-effectively recycled by the FcRn-mediated manner.

研究分野：再生医療

キーワード：臓器再生 発生工学 臓器移植 ゲノム編集 バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

近年、胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 等の多能性幹細胞、あるいは組織幹細胞を用いた臓器再生 / 人工臓器作出に関する研究が急速に進展している。手法は「各種の幹細胞から in vitro の培養系で分化誘導を行い、複雑な高次構造の構築を目指すもの」や、「in vivo に幹細胞を移植し自律的な分化・構造化を目指すもの」など様々だが、機能的な臓器が再生 / 作出されたか否かは、生体で十分機能するかで判定される。最もよく用いられている実験系は、マウスの腎被膜下などに作成した組織塊を異所性移植し、組織形態の維持と機能性タンパクの発現を評価する手法である。ところがこの手法では、レシピエント動物本来の臓器機能が残存している。臓器再生で重要なのは、作出した臓器が臓器不全の個体を救うか否かであり、その判定のためには、実際に臓器不全のレシピエント個体を用い、表現型が回復するか評価する必要がある。

組織幹細胞移植による臓器再生がヒト臨床でも確立されている造血幹細胞移植に関しては、全身放射線照射や抗がん剤を用いてレシピエント造血を廃絶する事が可能であり、移植前後の末梢血を経時的に評価することで、造血系の再構築と個体表現型の相関を見ることが可能である。また、血球表面マーカーの isoform を抗体で判別することで、レシピエントとドナー由来の造血を区別できるので、造血系がドナー型に置換されたという確証も得られる。

固形臓器の再生医療研究においても、薬剤誘導型の臓器障害モデル動物に対し臓器移植を行う系が用いられる。しかし固形臓器の系では、原則としてレシピエント個体から臓器を摘出し、免疫染色などで病理学的に評価する以外の方法で、レシピエントの臓器機能廃絶が完全であったかを評価する事が出来ない。移植治療を施さない場合に致死となる系であっても、他家移植等で救命すると、レシピエント臓器も自然に回復することがあり、ある時点で個体の表現型が回復しても、それがドナー型臓器の機能によるものか判断することは容易でない。レシピエント臓器全体をつぶさに評価することは理論上可能だが、移植手技が可能な成熟個体は臓器も大きく、現実的には部分的評価となる。また臓器全体を検索する場合、基本的には個体死するため以降の表現型観察が不可能となってしまう。申請者は、ストレプトゾトシン投与による I 型糖尿病モデルマウスを用いて、再生膵島移植による治療を行っていたが (Yamaguchi 等, Nature, 2017.) 致死的な糖尿病から回復した個体を晩期に安楽死処理して詳しく解析すると、レシピエント膵島も回復していたケースを相当数認めた。このような結果だと、途中段階での病態回復に移植臓器が貢献していたか、判定することができない。

以上の理由から、固形臓器の再生医療研究を行う上で、レシピエント臓器機能とドナー型臓器の機能を区別できる形で、定量的かつ長期にわたって経時的に測定できる、低侵襲性の測定系を開発する事が、極めて重要ではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

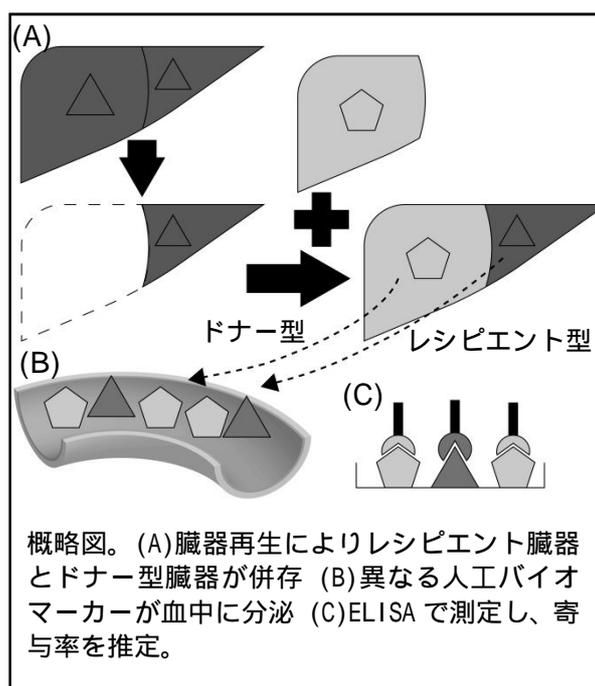
前項に記述した問題を解決するため、「レシピエント臓器とドナー型臓器の機能を反映する」人工バイオマーカーを有する遺伝子改変モデル動物の作成を試みた。

必要な評価系の条件は、以下の3点である。

- レシピエント / ドナーの臓器機能への貢献度・寄与率を定量的に評価できる。
- 測定用のサンプルを低侵襲で、長期間にわたって複数回採取できる。
- 異種移植のみならず、同種臓器再生・移植でも利用できる。

この条件を達成する最も単純な解決策は、「臓器機能を反映する血清学的バイオマーカーを、遺伝子改変によりレシピエント / ドナーで僅かに異なるものに変え、抗体で識別可能な状態とし、ELISA 等で定量する」ことである。

当該モデル動物を用いることで、単なる構造物としての人工臓器作出・臓器再生ではなく、生理的機能を代替可能な、機能的臓器が作られたか評価することが可能となる。



### 3. 研究の方法

本研究で採用する戦略自体は、限定された臓器によらず広範に適応可能なものである。しかし、まずは「現時点でも再生医療が可能な臓器」を対象として、概念実証を行う必要がある。また、対象臓器の機能を良く反映する血清学的マーカーが存在すれば、レシピエント動物の当該マーカー遺伝子を改変し、エピトープタグを付与するだけで良い。(レシピエント臓器機能：ドナー型臓器機能 タグ化タンパク質：非タグ化タンパク質という形で臓器機能への寄与率を評価できる。)

本研究では、標的臓器として、成熟分化した肝細胞や肝芽細胞による臓器再生実験系が確立されている肝臓をモデル臓器として選択した。肝臓の場合、血清アルブミン(AIb)値が臓器機能をよく反映することが知られている。またアルブミンは肝細胞で特異に産生されるため、ほかの臓器機能がバックグラウンドにならない。

そこで、マウス AIb 遺伝子に人工バイオマーカーとなるエピトープタグを導入した遺伝子改変系統を樹立し、臓器移植レシピエント動物として用いることとした。具体的には AIb 遺伝子 coding sequence 末端に 2A 自己切断配列で自殺遺伝子 X を挿入したノックインマウス系統である(自殺遺伝子名は特許状の理由により伏せる)。2A ペプチドは自己切断配列として polycistronic 遺伝子発現のため利用されるが、切断端がエピトープタグとして機能するため、2A 配列上流の遺伝子を anti-2A 抗体で検出できる。さらに、2A 下流に薬剤誘導型自殺遺伝子である TransgeneX を導入した事で、臓器移植後にレシピエント肝細胞を破壊し、同一個体内でのドナー寄与率を連続的に変化させることが可能となった。

当該マウスに対し、着床全胚への EGFP 標識した同種 ES 細胞注入により全身性キメラを作成し、薬剤投与によりレシピエント肝細胞のみを破壊し、肝臓をドナー ES 細胞型に置換できるか？またそれを血清 AIb 型の ELISA 定量で評価できるか？非移植モデルで検証した。その後、EGFP 発現マウスより採取した肝細胞を実際に経門脈移植し、同様にドナー寄与率と血清 AIb 型の相関を評価した。これらの相関関係は、肝臓の病理学的評価(EGFP 陽性率)、デジタル PCR による変異型 AIb 遺伝子のゲノムコピー数定量、qPCR による変異型 AIb 発現定量と、血清 AIb 型の結果を比較して行った。

また、本研究計画を期間内で完了するためには、ごく短期間でノックインマウス系統を樹立する必要があったため、並行して AAV ベクターを用いたマウス受精卵直接ゲノム編集による新規ノックイン方法を開発した。

#### 4. 研究成果

樹立した AIb-2A-TransgeneX マウスをレシピエントとして用いて、全身性キメラによる非移植モデルと、同種肝細胞移植モデルで以下の点を評価した。

- (1) 血清 ELISA によりレシピエント由来 2A 標識 AIb と野生型 AIb を定量的に評価できるか？
- (2) 血清 AIb 型と実際の肝細胞ドナー寄与率を反映するか？
- (3) 薬剤(iDimerizer)投与により、肝細胞の寄与率を連続的に変化させられるか？

まず(1)に関しては、抗 AIb 抗体と抗 2A ペプチド断端抗体を用いたサンドイッチ ELISA により、血清 AIb 値のダイナミックレンジ内では問題なく定量することが可能であった。

また(3)についても、iDimerizer 投与により、肝臓以外の臓器障害をもたらすことなく、肝細胞をレシピエント型からドナー型に高効率に置換できることが確認できた。さらに、この置換は既存のフマリルアセト酢酸ヒドラーゼ(*Fah*)ノックアウトマウスとの交配により Double transgenic 化することで、完全ドナー型まで置換しきることが可能であると確認できた。

一方、(2)に関してであるが、期待に反し、血清 ELISA による変異型 AIb 値と肝細胞のドナー/レシピエント比率は、相関はするものの線形関係ではない事が明らかとなった。具体的には、レシピエント肝細胞が 50%程度残存してる状態でも、血清 ELISA では変異型 AIb は検出限界以下になった。つまり、血清 AIb 型を参照することで、レシピエント肝細胞の廃絶率を定量的に評価するという当初の目的は、十分に達成できなかったと言える。この乖離について詳細に検討したところ、少なくとも遺伝子発現(転写レベル)では、変異型 AIb と野生型 AIb は線形相関を保っていた。このため、乖離現象は翻訳段階移行に原因があると推測された。またこの乖離は、完全変異型 AIb のみを有する AIb-2A-TransgeneX マウスホモ接合隊の血清と、野生型血清を人為的に混和しても生じなかった。明確な証明は得られなかったものの、最も可能性が高い仮説は、変異型 AIb の血中半減期が野生型 AIb より短いというものである。通常のタンパク質と異なり、血清中のアルブミンは半減期が 20 日程度と極めて長い。これは FcRn( neonatal Fc receptor ) を介した機構によりリサイクルされるという特殊性による。AIb と FcRn の結合には AIb の 3' 末端配列が重要であり、2A ペプチドタグが結合したことで、このリサイクル効率が低下し、結果として肝細胞のドナー/レシピエント比率と肝細胞から産生される AIb タンパク質量は線形相関を保っている、リサイクル量を含めた血清中の総 AIb 量には大きな乖離が生じたものと推測している。このような体内動態を示すタンパク質は、AIb の他には免疫グロブリンが知られているのみである。したがって、今回の概念実証実験は完全に成功したとはいえないもの、選択した AIb 遺伝子の固有性質に依存した問題であるため、他の遺伝子を標的とした場合、人工バイオマーカーにより臓器移植レシピエント動物の残存臓器機能とドナー臓器機能を血清学的に評価することは、十分に可能と思われる。

本研究では同種(マウス)肝再生のみ実施したが、将来的にはヒト化肝臓の作出を行うことで、ヒト臨床へ大きく資することが期待される。そのため、樹立した AIb-2A-TransgeneX マウ

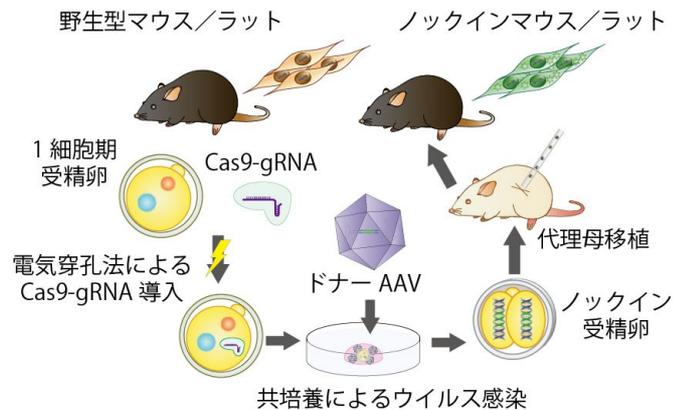
スに高度免疫不全化する方針とし、本研究計画は一旦終了の上、他の研究に発展的統合することとした。

また、本研究の一環として、ごく短期間でノックインマウスを作出する方法を開発した。古典的には、ES細胞を用いて培養化に相同組み換えにより標的遺伝子座へ外来配列を挿入し、その後、野生型マウス着床前胚とのキメラ形成と交配により、ノックインマウス系統は樹立される。しかし、きわめて順調に進んだとしても、実験に用いられる個体数のコロニーを形成するまで、1年以上の期間を必要とする。実際には、樹立した遺伝子改変ES細胞がキメラ個体の生殖細胞系列に寄与しないことが多く、系統樹率のみで数年かかることも稀ではない。

そこで、本研究の限られた実施期間内に確実に系統を樹立するため、全く新しいノックインマウス作成方法自体を開発した。

当該手法の概要は右図に示すとおりであるが、1細胞期着床前胚に対する電気穿孔法によるCRISPR/Cas9ゲノム編集を基としている。これまで同様の手法により遺伝子改変は行われていたが、小欠失・挿入導入による遺伝子ノックアウトは高効率に達成できるものの、本研究で用いるような500 bp以上の長鎖配列のノックインは、達成困難であった。興味深いことに、電気穿孔法ではなくガラスキャピラリーを用いたマイクロインジェクションで直接前核にノックイン参照配列(ドナーDNA)を注入すれば、ノックインも高効率で達成できるが、電気穿孔法では(ノックアウトはマイクロインジェクションと同等の効率示すにもかかわらず)ノックインは著しく低頻度にしか成功しない。この差異を突き詰めた結果、ドナーDNAが核へ移動する駆動力を持っていないことが問題の本質と考え、ウイルスベクターによるノックインドナー配列導入を併用する事とした。この新手法の唯一にして最大の問題は「そもそも着床前受精卵は、透明帯で保護されているため、Cas9タンパクや短い核酸はともかく、ウイルスは感染しない」という点である。これは過去に多くの検証がなされた事実であったのだが、本研究の結果、最小のウイルスであるパルボウイルス科に属するアデノ随伴ウイルスベクター(AAVベクター)は、無傷の透明帯を通過可能であることが明らかとなった。

そこで、1細胞期にCRISPR/Cas9 ribonucleoproteinを電気穿孔法で導入した後、ごく単純にノックインドナー配列を有するAAVベクターを添加した培地中で胚培養することで、受精卵ゲノムを直接編集してノックインするという手法に至った。この手法は極めて高効率、かつマイクロマニピュレーション技術などの専門技術を必要としない。またES細胞を用いず直接受精卵ゲノムを改変するため、古典的手法と異なり、確実に生殖細胞系列に寄与する。また、マウス以外の哺乳類にも適用可能である。圧倒的な利点が多数存在し、学術誌上での発表(iScience, 2018. Bio-protocol, 2019. Scientific Reports, 2019.)と共に、他施設導入に向けた技術供与を行っている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Naoaki Mizuno, Eiji Mizutani, Hideyuki Sato, Mariko Kasai, Hiromitsu Nakauchi and *Tomoyuki Yamaguchi.	4. 巻 Vol 9
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 + AAV-mediated Intra-embryonic Gene Knocking in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio-protocol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.3295	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Arata Honda, Ryoma Tachibana, Kazuya Hamada, Kohtaro Morita, Naoaki Mizuno, Kento Morita & Masahide Asano.	4. 巻 9
2. 論文標題 Efficient derivation of knock-out and knock-in rats using embryos obtained by in vitro fertilization.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-47964-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mizuno Naoaki, Mizutani Eiji, Sato Hideyuki, Kasai Mariko, Ogawa Aki, Suchy Fabian, Yamaguchi Tomoyuki, Nakauchi Hiromitsu	4. 巻 9
2. 論文標題 Intra-embryo Gene Cassette Knockin by CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing with Adeno-Associated Viral Vector	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 286 ~ 297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2018.10.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoaki Mizuno, Eiji Mizutani, Hideyuki Sato, Mariko Kasai, Tomoyuki Yamaguchi, Hiromitsu Nakauchi.
2. 発表標題 INTRA-EMBRYO LARGE FRAGMENT EXCHANGE BY CRISPR/CAS9-MEDIATED GENOME EDITING WITH ADENOASSOCIATED VIRAL VECTOR.
3. 学会等名 GENOME ENGINEERING: FRONTIERS OF CRISPR/CAS. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野 直彬、水谷 英二、佐藤 秀征、笠井 真理子、山口 智之、中内 啓光。
2. 発表標題 アデノ随伴ウイルスベクターとCRISPR/Cas9ゲノム編集による動物胚への長鎖ノックイン法
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第4回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野 直彬、水谷 英二、佐藤 秀征、笠井 真理子、山口 智之、中内 啓光。
2. 発表標題 AAVベクターとCas9 RNPエレクトロポレーションによる受精卵遺伝子ノックインの実践
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野 直彬、水谷 英二、佐藤 秀征、笠井 真理子、山口 智之、中内 啓光
2. 発表標題 アデノ随伴ウイルスベクターとCRISPR/Cas9ゲノム編集による動物胚への長鎖ノックイン法
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ゲノム編集による動物受精卵の遺伝子組み換え・遺伝子治療の簡便化に成功  
[https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/articles/z0201\\_00027.html](https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/articles/z0201_00027.html)  
 ゲノム編集による動物受精卵の遺伝子組み換え・遺伝子治療の簡便化に成功  
[https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/articles/z0201\\_00027.html](https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/articles/z0201_00027.html)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------