

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08665

研究課題名(和文) バイオ人工臓器研究における(膜型)レクチンの制御機能の利用

研究課題名(英文) Utilization of regulatory functions of (membrane-type) lectins in bioartificial organ research

研究代表者

正畠 和典(MASAHATA, Kazunori)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：40588381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、macrophage(Ma)の異種拒絶反応に対する肺胞蛋白 A (SPA) の抑制効果を調べた。その細胞毒性と食作用の検査に、THP-1及びヒトMaをSEC、SEC/SP-Aと共培養し、食作用とROS産生を評価した。MaのcytokineのmRNAレベルはrt-PCRで測定した。SEC/SP-Aの細胞毒性と食作用は野生型SECに比較して有意に減少し、さらにROS産生も減少した。MaにおけるTNF- α のmRNAが減少するのに対し、IL-10のmRNAは増加した。又、NF- κ B転写もSEC/SP-Aで減少した。結論、SP-Aの発現は異種移植のための魅力的な方法であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究で、異種移植におけるmacrophageの働きを制御する分子が、一般に知られているCD47や、我々が初めて報告したCD200、TIGIT(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains)以外にも見つかった事で、macrophageに対する多角的な制御が可能になる事が判明した。今後、この自然免疫系細胞に対する研究を中心に異種移植全体の研究が進み、この分野の医療に大いなる進歩に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to examine the suppressive effect of surfactant protein A (SPA) on macrophage-mediated xenogeneic rejection. To investigate the effect of SPA on cytotoxicity and phagocytosis, THP-1 and human macrophages were co-cultured with SEC or SEC/SP-A, and the extent of phagocytosis and production of ROS were assessed. The mRNA expression levels of inflammatory cytokines in macrophages were determined using rt-PCR. The cytotoxicity and phagocytosis of SEC/SP-A were significantly decreased compared with those of naive SEC. Furthermore, the co-culture of human macrophages with SEC/SP-A decreased reactive oxygen species production, and the mRNA expression levels of TNF- α were decreased in macrophages, whereas those of IL-10 were increased. In addition, NF- κ B transcription was decreased in SEC/SP-A compared with that in SEC. In conclusion, the expression of SP-A represents an attractive method for xenotransplantation.

研究分野：Xenotransplantation

キーワード：Xenotransplantation 糖鎖認識部位 SP-A プタ血管内皮細胞 細胞障害率 Galectin 3/9

1. 研究開始当初の背景

近年、世界中でドナー不足が深刻な問題となっている。また、日本では脳死移植数は外国と比べて極めて少ない。一方、異種移植の拒絶反応の機序が徐々に明らかになって行く中、ブタの臍島細胞を用いたバイオ人工臍島の移植が New Zealand や中国を中心に再開されており、2022年にはブタの心臓移植、2024年にはブタの腎移植がアメリカ合衆国で始まっており、日本での臨床治験の開始が待たれている。

バイオ臓器・組織の開発の分野では、当初阪大のグループが提唱した補体系の種差に注目が集まり、ブタでの 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、Gal (最大の糖鎖抗原) の存在が明らかになり、その制御方法 (knockout : KO) の開発が中心になったが、当初は困難を極めた。幸い 10 年前より新法 (ZFN 法、TALEN 法、CRISPR 法) による KO がブタでも成功し、KO 自体は格段容易になり、既に 4 つの遺伝子を同時に KO したブタや、内在性レトロウイルス (PERV) をすべて KO したブタも報告されている。

最近の研究では、国際異種移植学会で報告された前臨床試験 (遺伝子改変ブタからサルへの移植) の成績には、目を見張るものがある。例えば、心臓~異所性/同所性ではそれぞれ 945 日/264 日の最大生着日数を数え、腎臓では既に 2 年を超えている。

これらの結果は既に十分に臨床治験を開始できるものであるが、問題点としては、依然大量の免疫抑制剤が必要であることである。そのために、更に細部に渡って異種移植における拒絶反応の機序を、自然免疫細胞の観点から調べ、さらなる遺伝子改変をいかに加えるかの研究成果が待たれている。

肺胞サーファクタント A (SP-A) および SP-D は、C 型コラーゲン様レクチンである上皮細胞由来の免疫調節因子である。SP-A および SP-D は、さまざまな臓器の粘膜表面で検出され、両方のタンパク質は免疫応答で重要な役割を果たす。N 末端コラーゲンドメインと calreticulin/CD91 受容体複合体との結合は炎症誘発反応を誘発するが、糖鎖認識ドメイン (CRD) とシグナル抑制調節タンパク質 (SIRP) との結合は炎症を防げることが報じられている。我々は以前、膜型タンパク質 collectin placenta 1 (CL-P1) の cDNA を SP-D の CRD (CL-SPD) と調製し、それをブタ内皮細胞 (SEC) に導入した。このハイブリッド分子は SEC における macrophage 介在性細胞毒性を著しく抑制した。さらに、in vitro 研究では、マクロファージ介在性細胞毒性における CL-SPD の抑制機能は CD47 よりも強力であることが示した。しかし、SP-A の CRD が異種細胞上で macrophage に及ぼす影響は不明のままである。

本研究は、macrophage 介在性異種自然免疫応答に対する SP-A の CRD の抑制効果を調べることを目的とした。

2. 研究の目的

目的は、バイオ人工臓器 (異種移植) の開発であり、その為の基礎研究である。

ヒトからヒトへの移植に関しては、獲得免疫 (T, B 細胞) の制御に重きを置かれ、自然免疫系の細胞、特に Monocyte/Macrophage (Mo/M) の制御には重きを置かれてこなかった。

Mo/M の制御に関しては、最近まで CD47 の研究のみが先行し、CD47 を発現する transgenic ブタは既に作られているが、CD47 の高発現は期待されるほどの効果は得られていない。そこで、肺胞サーファクタントである SP-A の Mo/M 制御能に着目し、この分子を膜型に変換し、その Mo/M に対する制御の可能性を調べる事にした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組み換えを施工

肺胞サーファクタント SP-A に目をつけ、その CDR (糖鎖認識部位) 部分 (GenBank accession no. M68519.1) を膜型レクチンの一つ CL-1 の CDR に置き換えるべく、遺伝子組み換えを施工した。そして、PCXN2-Vector (chick beta actin promoter + CMV enhancer + neomycin resistance) の cloning site にヒト CL-1 を組み込んだ。次に、その CDR 部分に SPA の CDR 部分を置き換え、pCXN2-CL-SPA を作製した。そして、ブタ血管内皮細胞 (swine endothelial cells : SEC) : MYP30 に、この遺伝子を Lipofectamine™ LTX with Plus™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) を用い遺伝子導入し、96 穴 plate による limiting dilution を行い、G418 による薬物選択法で、高発現の line : SEC/CL-SP-A を得た。

(2) Cell line

まず、ヒト monocyte/macrophage の代わりに、cell line の THP-1 (Human acute monocytic leukemia.) を用意し、通常の SEC とこの SEC/CL-SPA の line を使い、これらの細胞障害率の差を検討した。細胞障害検査は、200 nM の phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) と 10 μ l の WST-8 reagent solution を使い、450 nm のマイクロプレートリーダー (Thermo Fischer Scientific, Inc.) を用い計算した。

(3) 細胞障害検査

次に、ヒト末梢血からの顆粒球 (PBMC) を取り出し、M-CSF (100ng/mL) を加え 6 日間培養し macrophage に誘導した後、FACS にて CD14 の発現を確認し、同時に SIRP の発現も検証した。そして、CL-SP-A による phagocytosis (貪食) に対する抑制効果を検討した。SEC または SEC/SP-A (3×10^5) を、2 μ l/ml の calcein-AM (Nakalai Tesque) とともに 37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートして calcein-AM で標識した。calcein-AM で染色した SEC または SEC/SP-A をプレートに加え、細胞を 24 時間共培養した。その後、細胞を採取し、APC 標識抗ヒト CD14 抗体 (1:40, BioLegend) で染色した。染色した細胞は、BD FAC Suite software (ver. 10.6) を使用し、fluorescence-activated cell sorter (FACS) FACSVerseTM flow cytometer (BD Bioscience) で分析した。貪食率は、(CD14+ および calcein-AM + 細胞)/(CD14+ 細胞) $\times 100$ (%) として計算した。

(4) THP-1-Lucia NF- κ B cells による NF- κ B の動き

THP-1-Lucia NF- κ B 細胞の PMA 誘導活性化を評価するために、PMA を 20 nM ~ 2 μ M の濃度で細胞培養に加えた。24 時間後、各ウェルの上清 10 μ l を 96 ウェルのプレートに入れた。その後、ルシフェラーゼ反応の基質である QUANTI-LucTM アッセイ溶液 50 μ l を各ウェルに加え、ルミノメーター (Centro XS3 LB960, Berthold Technologies) を使用して光信号を測定した。

SEC または SEC/SP-A を、0 日目の細胞毒性アッセイと同様に 96 ウェル プレートにまき、1 日目に THP-1-Lucia NF- κ B 細胞 (5.0×10^4) を各ウェルに加えた。共培養後、各ウェルの上清 10 μ l を QUANTI-LucTM assay solution 50 μ l とルミノメーターで測定した。

(5) RT-qPCR

mRNA を反応する macrophage から抽出し、RT-qPCR で各サイトカインの変化を追った。

細胞から TRIzol[®] reagent (Invitrogen) を使い全 RNA を抽出し、RT-qPCR 実験に使用した。mRNA は One-Step SYBR[®] Prime Script[®] RT-PCR KIT (Takara Bio Inc.) を使用して増幅し、Light Cycler 96 (Roche) を使用して定量した。合計 20 μ l の PCR 混合物を調製し、これには 50 ng の RNA、2 U TaKaRa Ex Taq HS、0.4 μ l PrimerScript RT 酵素 Mix II、および各プライマーの濃度が 0.2 μ mol/l の対応するプライマーペアが含まれていた。熱サイクル条件は次のとおりである。42 $^{\circ}$ C で 5 分間、続いて 95 $^{\circ}$ C で 10 秒間、次に 95 $^{\circ}$ C で 5 秒間、60 $^{\circ}$ C で 20 秒間を 40 サイクル。mRNA の量は GAPDH mRNA の量に標準化し、分析した。

使った各遺伝子の primers は、

iNOS-Fwd, ATTCTGCTGCTTGCTGAGGT;	iNOS-Rev, TTCAAGACCAATTCCACCAC;	IL-1 -Fwd,
ACAGATGAAGTGCTCCTCCA;	IL-1 -Rev, GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT;	TNF- -Fwd,
CCCAGGGACCTCTCTAATC;	TNF- -Rev, ATGGGCTACAGGCTTGCTACT;	ARG-1-Fwd,
GTTTCTCAAGCAGACCAGCC;	ARG-1-Rev, GCTCAAGTGCAGCAAAGAGA;	IL-10-Fwd,
GGCGTGTATCATGATTTCTT;	IL-10-Rev, GGCTTTGTAGATGCCTTTCTCTTG;	GAPDH-Fwd,
TAAAAGCAGCCCTGGTGAC, GAPDH-Rev, CTCTGCTCCTCTGTTCCGAC.		

4. 研究成果

SEC に対するヒト macrophage の貪食率は $69.8 \pm 11.5\%$ であったのに対し、SEC/CL-SP-A に対しては 29.0 ± 12 の値を示した。

また、続いて ROS 産性能を検討した。SEC の場合を 100% とすると、SEC/CL-SP-A では約 75% 程度に落ちていた。

さらに、反応の際の macrophage でのサイトカイン産性能については mRNA を取り rt-PCR 法で測定した。SEC/CL-SP-A に対する場合は、SEC に対する場合と比べて、IL-1b の産生に変化は示さなかったが、TNF-a や iNOS/Arg1 は有意に下がっていた。一方、IL-10 は有意に上昇していた。

加えて、THP-1 Lucia NF κ B 細胞を用いて細胞障害を測定したが、SEC/CL-SP-A では SEC に比してやはり有意に NF- κ B 遺伝子発現が押さえられていた。

これらの事から、hybrid 分子 CL-SP-A が macrophage の SEC に対する攻撃の際、その抑制に有効であることが証明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akira Maeda, Shuhei Kogata, Chiyoshi Toyama, Pei-Chi Lo, Chizu Okamatsu, Riho Yamamoto, Kazunori Masahata, Masafumi Kamiyama, Hiroshi Eguchi, Masahito Watanabe, Hiroshi Nagashima, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa,	4. 巻 -
2. 論文標題 The innate cellular immune response in xenotransplantation,	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunol	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） 10.3389/fimmu.2022.858604.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toyama C, Maeda A, Kogata S, Yamamoto R, Masahata K, Ueno T, Kamiyama M, Tazuke Y, Eguchi H, Okuyama H, Miyagawa S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Suppression of xenogeneic innate immune response by a membrane-type human surfactant protein-A.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Exp Ther Med.	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） 10.3892/etm.2022.11527.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K Iemitsu, R Sakai, A Maeda, K Gadomska, S Kogata, D Yasufuku, J Matsui, K Masahata, M Kamiyama, H Eguchi, S Matsumura, Y Kakuta, H Nagashima, H Okuyama, S Miyagawa	4. 巻 84
2. 論文標題 The hybrid CL-SP-D molecule has the potential to regulate xenogeneic rejection by human neutrophils more efficiently than CD47	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Transpl Immunol.	6. 最初と最後の頁 102020
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.trim.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Akira Maeda, Shuhei Kogata, Pei-Chi Lo, Keigo Iemitsu, Makiko Tani, Fitri Hasnaulia, Koki Takase, Kazunori Masahata, Masafumi Kamiyama, Hiroshi Eguchi, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa
2. 発表標題 The suppression of xenogeneic NK cell degranulation by human CD31.
3. 学会等名 The 17th International Xenotransplantation Association (国際学会)
4. 発表年 2023年

1 . 発表者名 Shuji Miyagawa, Keigo Iemitsu, Akira Maeda, Rieko Sakai, Daiki Yasufuku, Makiko Tani, Fitri Hasnaulia, Katarzyna Gadomska, Kazunori Masahata, Masafumi Kamiyama, Hiroshi Eguchi, Hiroshi Nagashima, Hiroomi Okuyama.
2 . 発表標題 he hybrid molecule CL-SP-D has the potential to regulate xenogeneic rejection by human neutrophils
3 . 学会等名 The 17th International Xenotransplantation Association (国際学会)
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Chiyoshi Toyama, Akira Maeda, Shuhei Kogata, Koki Takase, Tasuku Kodama, Kazunori Masahata, Takehisa Ueno, Masafumi Kamiyama, Yuko Tazuke, Hiroshi Eguchi, Katsuyoshi Matsunami, Shuji Miyagawa, Hiroomi Okuyama
2 . 発表標題 The suppression of macrophage-mediated intestinal transplant rejection by C5a receptor antagonist.
3 . 学会等名 The Transplantation Society 2022
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Chiyoshi Toyama, Akira Maeda, Shuhei Kogata, Koki Takase, Tasuku Kodama, Kazunori Masahata, Takehisa Ueno, Masafumi Kamiyama, Yuko Tazuke, Hiroshi Eguchi, Katsuyoshi Matsunami, Shuji Miyagawa, Hiroomi Okuyama
2 . 発表標題 Effect of a C5a receptor antagonist on macrophage function in an intestinal transplant rat model
3 . 学会等名 The Transplantation Society 2022
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Shuji Miyagawa, Takuji Kawamura, Hiroomi Okuyama, and Akira Maeda
2 . 発表標題 Macrophages in xenotransplantation
3 . 学会等名 ATW 2022
4 . 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuji Miyagawa, Masahito Watanabe, Kazuki Sato, Shuhei Kogata, Chiyoshi Toyama, Kazunori Masahata, Masafumi Kamiyama, Hiroshi Eguchi, Akira Maeda, Kazuto Yoshimi, Tomoji Mashimo, Hiroomi Okuyama, Hiroshi Nagashima
2. 発表標題 CPI SPR / Cas3 system for pig Gal-T (GGTA1)
3. 学会等名 IXA 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	前田 晃 (MAEDA Akira) (00319708)	大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員 (14401)	

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
---------	---------