

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19527

研究課題名（和文）日本発の遺伝子編集ブタ作出方法の検証

研究課題名（英文）Verification of gene-edited pig production method from Japan

研究代表者

宮川 周士（MIYAGAWA, Shuji）

大阪大学・微生物病研究所・招へい研究員

研究者番号：90273648

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：CISPR/Cas3法をブタ細胞に適用するために、GGTA1とPERV-Cに対するKOを試みた。まずGGTA1のexon 9にtarget用plasmidsを用意し、ブタの線維芽細胞に遺伝子導入した。Gal-epitopeの発現をFACSにて分析、次にnested PCRを実行した。さらに、各グループのPCR産物を大腸菌に形質転換させ、各コロニーをPCRチェックした。結果は294-754bpの欠失が証明された。次に、PERV-Cに焦点を置き、Cas3法でKOを試みた。しかし、大腸菌のコロニーを解析するには至らなかった。結論、異種移植におけるCRISPR/Cas3法の効果及び特徴を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究で、異種移植分野の（ブタを使った）臓器開発での遺伝子のtargeting法で、一般に普及しているCRISPR/Cas9を使わずに、日本で開発されている新たな方法であるCRISPR/Cas3を使うことが可能になれば、特許の問題を気にせずに遺伝子編集が可能になる。これは単に異種移植分野だけでなく、他の医学・畜産、等の分野に大きく影響をもたらす。

研究成果の概要（英文）：In order to apply the CISPR/Cas3 method to pig cells, we attempted knockout (KO) of GGTA1 and porcine endogenous retrovirus (PERV)-C. Focusing on exon 9 of GGTA1, we prepared target plasmids and introduced them into pig fibroblast cells. First, the expression of Gal-epitope was analyzed by FACS, and then nested PCR was performed. Furthermore, the PCR products of each group were transformed into E. coli, and a large number of colonies were checked by PCR, Sanger method. The results demonstrated a deletion of 294-754bp was produced in GGTA1 gene. Next, we focused on PERV-C and attempted to KO it using just the same as the Cas3 method for GGTA1. However, it was not possible to analyze the deletion of PERV-C in E.coli colonies, because of sit number of PERV. However, in conclusion, we confirmed the effectiveness and feature of the CRISPR/Cas3 method in xenotransplantation.

研究分野：Xenotransplantation

キーワード：CISPR/Cas3 Knockout GGTA1 PERV-C Xenotransplantation

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 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。一方、バイオ人工臓器(異種移植)の開発に関しては素晴らしいものがある。ブタの心移植が2例、そして今年ブタ腎移植がアメリカで行われている。これらは遺伝子を改変したブタからの臓器移植で、すでに10個以上の遺伝子が改変されている。また、内4つ以上の遺伝子がknockout(KO)されている。このKO法の開発は、かつての相同組み替え法では困難を極めたが、幸い10年前より新法(ZFN法、TALEN法、CRISPR法)によるKO法が、我々も含めブタでも成功している。

しかし、各国の多くのチームが使っているCRISPR/Cas9法のブタへの応用は進んでいるが、“特許”の問題が大きく絡んでいる。今回、我々のチームとしてはこれ以外の方法、つまり新規・国産のCRISPR/Cas3法を応用して、遺伝子編集ブタの作出を進めることとした。

### 2. 研究の目的

Cas9、Cas 12a、Cas 14aなどのClass IIシステムに加え、Class Iシステムに分類されるCPISPR/Cas3システムも最近新しい技術として注目されている。このClass IシステムはCRISPRシステムの大部分を表し、細菌および古細菌のClass IIグループよりも広く普及している。

本研究では、このCas3システムをブタ細胞に適用できるかどうかを検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) GGTA1のKOに関して

異種移植の開発に国産のCRISPR/Cas3法を検討している。既にCas9法でknockout(KO)経験のあるブタCMAHやb4GalNT2のKOと比較しながら、GalT(GGTA1)のKOをCas3法で進めた。

まず、ブタでのgenome情報をもとにcrRNAをGGTA1の機能ドメインであるexon 9の上下に置いた(crRNA=#45と#86)。

次に、4群を置いた、

群 Control (No Cascade)、

群 Cascade+Cas3+#45、

群 Cascade+Cas3+#86、

群 Cascade+Cas3+#45+#86を置いた。

そして、必要なplasmidであるCascade:pX-puro/Cascade(=bpNLS-Cascade)、Cas3:BP-NLS-hCas3、crRNA=45:pBS-U6-crRNA=45、crRNA=86:pBS-U6-crRNA=86を用意した。

これらをブタ線維芽細胞にNeonトランスフェクションシステム(ThermoFisher)を使用したエレクトロポレーション法によって遺伝子導入を行い、48時間後の細胞を回収し、GSIB4を使ったFACS解析、およびゲノム抽出PCRにて解析した。

GGTA1遺伝子の標的領域に対するnested PCRをPrimeSTAR GXL(タカラバイオ)を用いて実施した。nested PCRは、最初のF-Rプライマー、F1:TCACCAGTCAGGTAAGCCACおよびR1:TTCCAGAGTCTGGCAGACTGを使用した。続いて、第2のF-Rプライマー、F2:TGTCTCCTCTAGAAATCCCAGおよびR2:CAGAGTCATTCCCCATTTGACを使用して、標的領域を含むPCR断片を検査した。

#### (2) PERVのKOに関して

COSMID:CRISPR Search、susScr3を利用し、mismatch、insertion and/or deficitを検討しながら、特にA/Cキメラの場合5'側にPERV-Aが来る事を考慮し、PERV-Cのenvの3'側にcrRNAのsiteを決定した。

そして、U6-crRNAを作成した。

次に、ブタ胎仔線維芽細胞へ、このU6-crRNAを加えたbpNLS-Cascade/U6-crRNAに加え、bpNLS-CascadeとpCX-EGFP(CAG-EGFP)をco-transfectionして、EGFP陽性の細胞(トランスフェクション効率としては66.7%)をSortingして、そのsorting cellについて変異解析を行った。

変異解析に使用したPrimerは、1875(CTCTTAGGCTCAAGGCACTTGAGTGG)と1877(CACATTTGCGCATGTTTCGG)、1813(CCAGGACCACCAATAATGG)と1864(TCATGCCTAGAGATGTACTCAGGGCCA)でnested PCRを行い、PCR後の泳動ではスメアが無いわけでは無かったが、結局数度にわたり、PCR産物をTOPOクローニングした。出来た大腸菌コロニーをシーケンシングしたが、変異は検出できなかった。

## 4 . 研究成果

### (1)GGTA1 の KO に関して

まず、FACS 解析の結果として、G4 > G2 > G3 の順に発現変化が見られ、Cas3 システムの効果が示された。

そして、これらの PCR の結果は、G2 では 754 bp の欠失、G3 では 370 bp および 294 bp の欠失、G4 では 547 bp の欠失、637 bp の欠失および 749 bp の欠失が証明された。

FACS の結果としては、欠損は 群、 群で多くみられた。遺伝子変異に関しては、 群が一番多く認められた。より大きなサイズの変異はこの方法では確認できなかったが、CRISPR/Cas3 による KO でブタ線維芽細胞において確かな変異 (del:294 - 754bp) が確認できた。

次に、この 群 の Cas3 と #45-crRNA 及び #8-crRNA をそれぞれ pCXN に組み、pCXN/Cas3+#45-crRNA 及び pCXN/Cas3+#45-crRN を作成し、これらを用いて、今度はブタ血管内皮細胞 (SEC) に遺伝子導入を行い、SEC/GGTA1-KO の作出を試みている。同時に pCXN-GFP を導入し遺伝子効率を考慮しながら試みるも、selection に難渋し、現時点では clone の確立には至っていない。

### (2)PERV-C に関して

大腸菌のコロニーを sequence したが、変異を検出するには至らなかった。

異種移植におけるブタ細胞に対する CRISPR/Cas3 システムの効果を GGTA1 に関しては確認した。しかし、PERV-C に関してはその効果は確認できなかったが、これは PERV がブタのゲノムに内在性に 50-60 箇所存在することに起因すると考えられた。又、CRISPR/Cas3 システムが、標的ゲノムに比較的大きな欠失を与えることにも起因すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10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 著者名 Miyagawa S, Kodama T, Matsuura R, Lo PC, Sakai R, Toyama C, Takama Y, Ihara Y, Kakuta Y, Yamanaka K, Matsunami K, Eguchi H, Maeda A, Okuyama H.	4. 巻 -
2. 論文標題 A study of the mechanisms responsible for the action of new immunosuppressants and their effects on rat small intestinal transplantation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transpl 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） 10.1016/j.trim.2021.101497.	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 Miyagawa S, Maeda A, Toyama C, Kogata S, Okamatsu C, Yamamoto R, Masahata K, Kamiyama M, Eguchi H, Watanabe M, Nagashima H, Ikawa M, Matsunami K, Okuyama H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Complement regulation in the Triple-KO era,	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.2022.860165.	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8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

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 Tomohisa Yoneyama, Akira Maeda, Shuhei Kogata, Chiyoshi Toyama, Kazunori Masahata, Masafumi Kamiyama, Chizu Okamatu, Yuko Tazuke, Takehisa Ueno, Hiroshi Eguchi, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa
2 . 発表標題 T Human CD177 suppresses the neutrophil-mediated xenocytotoxicity
3 . 学会等名 CAST 2021 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Chiyoshi Toyama, Akira Maeda, Shuhei Kogata, Kazuki Sato, Chizu Okamatsu, Hiroshi Eguchi, Masafumi Kamiyama, Yuko Tazuke, Takehisa Ueno, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa
2 . 発表標題 T A membrane-type surfactant protein A (SP-A) suppresses macrophage-mediated cytotoxicity in swine endothelial cells
3 . 学会等名 CAST 2021 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Shuji Miyagawa, Masahito Watanabe, Kazuki Sato, Shuhei Kogata, Chiyoshi Toyama, Kazunori Masahata, Masahumi Kamiyama, Hiroshi Eguchi, Akira Maeda, Kazuto Yoshimi, Tomoji Mashimo, Hiroomi Okuyama, Hiroshi Nagashima
2 . 発表標題 Testing the CPISPR / Cas3 system for the xenotransplantation field.
3 . 学会等名 CAST 2021 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021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 CPIPR / Cas3 system for pig Gal-T (GGTA1)
3. 学会等名 The 16th International Xenotransplantation Association (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuhei Kogata, Akira Maeda, Pei-Chi Lo, Chizu Okamatsu, Kazuki Sato, Riho Yamamoto, Tomohisa Yoneyama, Chiyoshi Toyama, Hiroshi Eguchi, Yuko Tazuke, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa
2. 発表標題 Human CD177 Suppress Macrophage-Mediated Xenogeneic Rejection
3. 学会等名 The 16th International Xenotransplantation Association (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 宮川周士	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 3
3. 書名 異種移植の現状。「異種移植の現状と展望」医学のあゆみ、vol283 no.4	

1. 著者名 宮川周士	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本臨床	5. 総ページ数 6
3. 書名 移植と補体。「補体と疾患」	

〔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