

令和元年6月7日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19325

研究課題名(和文) 内在性レトロウイルス感染制御による安全な異種移植用ブタの作製

研究課題名(英文) Production of pigs for safe xenotransplantation by controlling infectious porcine endogenous retrovirus (PERV)

研究代表者

音井 威重 (OTOI, Takeshige)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・教授

研究者番号：30311814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ブタ臓器の異種移植後のヒトへのブタ内在性レトロウイルス(PERV)の感染は、潜在的なリスクである。本研究は、受精卵の段階でゲノム編集(GEEP)システムを使用してPERVフリーのブタを作ることを目的に、受精卵の発育とPERVの変異効率との関係を調べた。その結果、受精卵の発育能力がPERV遺伝子の改変によって影響を受ける可能性のあることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、クローン技術を用いずに体外受精卵からPERV遺伝子をノックアウトすることである。使用したGEEP法は、妊娠率、産子作製率が格段に高いことから、今後の遺伝子改変ブタ作製の手法を一変させる可能性がある。本研究成果において、PERV遺伝子を含め複数の候補遺伝子をノックアウトできることを明らかにしたことから、移植用代替臓器の提供動物として安全なブタが得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The transmission of porcine endogenous retrovirus (PERV) to humans is a potential risk after xenotransplantation of porcine organs. We investigated the relationship between the embryonic development and the efficiency of target mutations in the PERV gene on porcine zygotes, to produce PERV-free pigs using the genome editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system. The present results indicate that the developmental competence of zygotes may have been affected by the modification of PERV genes.

研究分野：生殖工学

キーワード：内在性レトロウイルス ゲノム編集 ブタ 異種移植 CRISPR/Cas9

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臓器移植は医療として確立しているが、ドナー不足が解消される見込みはない。この解決策として、臓器の形態、サイズ、生理学的機能がヒトと類似しているブタ臓器を利用する異種移植に期待が寄せられている。近年、海外では1型糖尿病患者へのブタの膵島細胞移植が行われており、国内にも数年以内の臨床実施を目指すグループがある。

(1) 人獣共通感染症としてのブタ内在性レトロウイルス (porcine endogenous retrovirus : PERV) : ブタは家畜の中で、もっとも微生物学的品質が管理された動物であるが、PERV は染色体に組み込まれているため、ブタ臓器をヒトに移植した場合、PERV がヒトに感染する可能性が示唆されている。また、日本で飼養されている全てのブタに PERV の感染が確認されており、西洋品種で <35 コピー程度と推定されている。

(2) 厚生労働省による異種移植の容認 : 画期的なこととして、平成 28 年、厚生労働省の研究班は動物の臓器・細胞を人に移植する「異種移植」で、ブタからの移植を容認する方針を示した。しかし、本指針では、PERV の組み込みが少ないブタを選ぶことや、移植を受けた患者らの健康状態を生涯にわたって調べ、新たな感染症が生じた場合に見逃さないようにすることを求めている。

(3) PERV ノックアウト細胞での感染性の消滅 : 2015 年ハーバード大学のグループは、62 個の PERV を確認したブタ細胞内の *pol* 遺伝子をゲノム編集技術でノックアウトすることにより、ヒト細胞へ PERV 感染を劇的に減少させることに成功した。

上記のように、急速に進展が予測される異種移植において、臓器提供動物としてブタを使用する場合、感染の危険性がある PERV をブタから排除するか、もしくはノックアウトする以外、安全な異種移植医療は達成できないと思われる。

2. 研究の目的

臓器不足の解決手段として、ブタの臓器・組織を用いる異種移植の研究が進んでいるが、全てのブタは人への感染が懸念される PERV をゲノム中に保有しており、ヒト細胞への感染が疑われることから移植用代替臓器の提供動物として最適でない。本研究は、ゲノム編集技術によりブタゲノムに内在するレトロウイルスをノックアウトし、安全な異種移植用ブタを作製することを目標とした。特に、申請者が開発したエレクトロポレーションによる GEEP 法 (Genome Editing by Electroporation of Cas9 Protein) を用い、PERV の複製に関与する重要遺伝子 (*pol*) をノックアウトすることにより、ヒトへの感染能力をなくした安全なブタを作製することを目標とし、ゲノム編集に用いる *pol* 遺伝子をターゲットとした最適のガイド RNA (gRNA) を決定することを試みた。一方、複数の PERV 部位での CRISPR/Cas9 システムによる DNA 切断が、DNA 損傷誘導性の老化またはアポトーシスを引き起こし、変異細胞の増殖に影響を及ぼすことが報告されていることから、胚盤胞発生率および変異効率を指標にゲノム編集に用いる gRNA の組み合わせを検討した。

3. 研究の方法

細胞内で PERV 自身が複製する際に重要な役割を果たす *pol* 遺伝子を、開発した GEEP 法を用い 1 細胞期 (体外受精胚) の段階でゲノム編集によりノックアウトした。なお、ハーバード大学のグループが使用した gRNA のほか数種の gRNA を新規構築し、ゲノム編集後の胚盤胞発生率および *pol* 遺伝子の変異効率を指標に、最適の gRNA を複数選別した。さらに、2 種類以上の gRNA を用い *pol* 遺伝子の変異程度を指標に、編集可能な gRNA の組み合わせを明らかにし、胚の発生能とゲノム編集による変異効率の関連性について検討した。

4. 研究成果

PERV *Pol* 遺伝子を標的とする 5 種類の gRNA を構築し、胚盤胞発生率から 3 種類の gRNA を選別し、変異効率との関連性について検討した。

(1) PERV *Pol* 遺伝子を標的とする gRNA を用いたエレクトロポレーション処理は、1 細胞期胚の編集率に影響を及ぼさなかった。しかしながら、gRNA の種類および組み合わせにかかわらず、対照と比較して、エレクトロポレーション処理した胚の胚盤胞形成率は減少した (図 1)。各 gRNA でゲノム編集した胚において、gRNA 3 をエレクトロポレーションした胚の胚盤胞形成率は、gRNA 1 をエレクトロポレーションした胚の胚盤胞形成率よりも有意に低値を示した ($p < 0.05$)。同様に、gRNA3

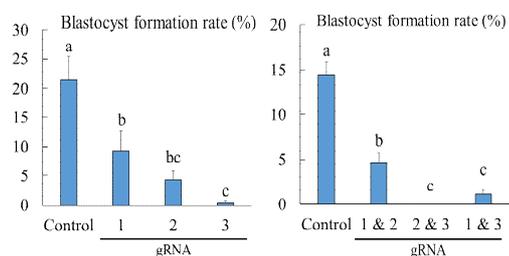


図 1. PERV *Pol* 遺伝子を標的にゲノム編集した胚の胚盤胞発生率

と他の gRNA を組み合わせると、gRNA1 と gRNA2 の組み合わせと比較して、胚盤胞形成率が有意に減少した ($p < 0.05$)。個々の胚盤胞における PERV *pol* 遺伝子の標的部位の変異率を評価した結果、gRNA の種類または組み合わせにかかわらず、3 グループ間で変異率は同様であった。さらに、変異をもつ胚盤胞における indel 変異の頻度 (変異効率) を TIDE で調べたところ、群間に有意差は認められなかった (図 2)。

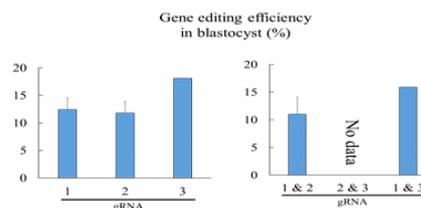


図 2 . 変異効率の比較

(2) 次に、gRNA3 を単独もしくは他との組み合わせによりエレクトロポレーションした 1 細胞期胚から十分な数の胚盤胞を得ることができなかったため、分割胚 (2 ~ 8 細胞期) における胚の変異率および変異効率を調べた。分割胚の変異率は 80.0% から 100% の範囲であり、gRNA の種類や組み合わせに関係なく、すべてのグループで差がなかった。一方、gRNA3 単独群における変異効率は gRNA2 単独群の変異効率より有意に高かったが ($p < 0.05$) gRNA1 群における変異効率と同様であった (図 3)。しかしながら、gRNA3 と他の gRNA との組み合わせは、gRNA1 と gRNA2 との組み合わせと比較して、変異効率を有意に増加させた ($p < 0.05$)。

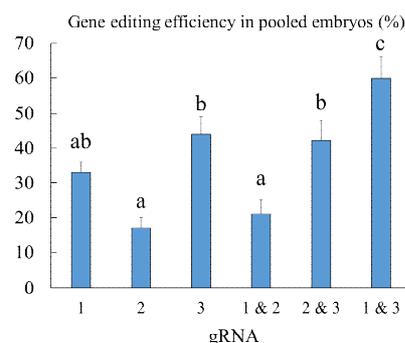


図 3 . 分割胚での変異効率の比較

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Tanihara, F., Hirata, M., Iizuka, S., Sairiki, S., Nii, M., Nguyen, T.N., Le A.Q., Hirano, T. and Otoi T. Relationship among ovarian follicular status, developmental competence of oocytes, and anti-Müllerian hormone levels: a comparative study in Japanese wild boar crossbred gilts and Large White gilts. *Anim. Sci. J.*, (2019) in press. doi: 10.1111/asj.13200. (査読あり)
2. Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, T.N., Le A.Q., Hirano, T. and Otoi T. Effects of the concentration of CRISPR/Cas9 components on genetic mosaicism of cytoplasmic microinjected porcine embryos. *J. Reprod. Dev.*, (2019) in press. doi: 10.1262/jrd.2018-116. (査読あり)
3. Nguyen, T.N., Hirata, M., Tanihara, F., Hirano, T., Le A.Q., Nii, M. and Otoi T. Hypothermic storage of porcine zygotes in serum supplemented with chlorogenic acid. *Reprod. Dom. Anim.*, 54, 750-755, (2019). doi: 10.1111/rda.13417. (査読あり)
4. Hirata, M., Tanihara, F., Wittayarat, M., Hirano, T., Nguyen, T.N., Le A.Q., Namula, Z., Nii, M. and Otoi, T. Genome mutation after introduction of the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system in matured oocytes and putative zygotes. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 55, 237-242, (2019).doi:10.1007/s11626-019-00338-3. (査読あり)
5. Namula, Z., Tanihara, F., Wittayarat, M., Hirata, M., Nguyen, T.N., Hirano, T., Le A.Q., Nii, M. and Otoi, T. Effects of tris (hydroxymethyl) aminomethane on the quality of frozen-thawed boar spermatozoa. *Acta Vet. Hung.*, 67, 106-114, (2019). doi: 10.1556/004.2019.012. (査読あり)
6. Namula, Z., Hirata, M., Wittayarat, M., Tanihara, F., Nguyen, T.N., Hirano, T., Nii, M. and Otoi, T. Effects of chlorogenic acid and caffeic acid on the quality of frozen-thawed boar sperm. *Reprod. Dom. Anim.*, 53, 1600-1604, (2018). doi: 10.1111/rda.13288. (査読あり)
7. Nguyen, V-T., Wittayarat, M., Do, T.K.L., Nguyen, V.T., Nii, M., Namula, Z., Kuniyama, T., Tanihara, F., Hirata, M. and Otoi, T. Effects of chlorogenic acid (CGA) supplementation during in vitro maturation culture on the development and quality of porcine embryos with electroporation treatment after in vitro fertilization. *Anim. Sci. J.*, 89, 1207-1213, (2018). doi: 10.1111/asj.13049. (査読あり)
8. Nguyen, V-T., Tanihara, F., Hirata, M., Hirano, T., Nishio, K., Do, T.K.L., Nguyen, V.T., Nii, M. and Otoi, T. Effects of antifreeze protein supplementation on the development of porcine morulae stored at hypothermic temperatures. *CryoLetters*, 39, 131-136, (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29734422> (査読あり)

〔学会発表〕(計8件)

1. Le Anh Quynh, Fuminori Tanihara, Maki Hirata, Nguyen Thi Nhien, Takayuki Hirano and Takeshige Otoi Concentration of CRISPR/Cas9 components effects on genetic mosaicism of cytoplasmic microinjected porcine embryos,第6回日本先進医工学ブタ研究会, 2018年10月19日,三島市.
2. Nguyen Thi Nhien, Fuminori Tanihara, Maki Hirata, Takayuki Hirano, Le Anh Quynh, 新居 雅宏 and Takeshige Otoi Hypothermic storage of porcine zygotes in serum supplemented with chlorogenic acid, 第6回日本先進医工学ブタ研究会, 2018年10月19日,三島市.
3. 平田 真樹, 谷原 史倫, 平野 隆之, NGUYEN NHIEN THI, LE ANH QUYNH, 新居 雅宏, 音井 威重 ブタにおける受精前後でのゲノム編集が胚盤胞の変異導入効率に及ぼす影響, 第6回日本先進医工学ブタ研究会, 2018年10月19日,三島市.
4. 谷原 史倫, 平田 真樹, NGUYEN NHIEN THI, LE ANH QUYNH, 平野 隆之, 竹本 龍也, 中井 美智子, 淵本 大一郎, 音井 威重 ゲノム編集によるTP53遺伝子改変ブタの作製と表現型の解析, 第6回日本先進医工学ブタ研究会, 2018年10月19日,三島市.
5. 平田 真樹, 谷原 史倫, Nhien Thi Nguyen, Zhao Namula, 音井威重 ブタ体外受精卵におけるCrispr/Cas9システムを使用したゲノム編集の効率. 第3回ゲノム編集学会, 2018年6月18日 広島市.
6. 谷原史倫, 平田真樹, Nguyen Thi Nhien, 平野隆之, 音井威重 ブタ内在性レトロウイルス遺伝子を標的としたゲノム編集が胚発育能に及ぼす影響. 第3回ゲノム編集学会, 2018年6月18日 広島市.
7. Nishio, K., Tanihara, F., Nguyen, T.V., Kuniyama, T. and Otoi, T. Effects of voltage strength on development and quality of electroporated porcine embryos. 2017 Transgenic Technology Meeting 2017年10月1日, Utah, USA.
8. Fuminori Tanihara and Takeshige Otoi A simple-step generation of genetically modified pigs by genome editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) method., Forth World Congress of Reproductive Biology (WCRB2017), 2017年9月17日, Okinawa.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：竹本 龍也

ローマ字氏名：(TAKEMOTO, Tatsuya)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：先端酵素学研究所(オープンイノベ)

職名：教授

研究者番号：30443899

研究分担者氏名：谷原 史倫

ローマ字氏名：(TANIHARA, Fuminori)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)

職名：特任助教

研究者番号：90754680