

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19579

研究課題名(和文)ブタを足場としての再生医療とバイオ臓器の開発における内在性レトロウイルスの制御

研究課題名(英文)Control of porcine endogenous retrovirus for regenerative medicine using pigs as a scaffold and development of bio-organs

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):新法CRISPR/Cas3のブタ細胞への応用を目指し、代表的遺伝子Gal-T(GGTA1)を用い、2か所にsiteを設定し、ブタ線維芽細胞を用いてknockoutを試みた。pX-Cascade、BPNLS-hCas3、pBS-U6-crRNAを同時に導入し、Sequenceでdelを確認した。H-D抗原(CMAH)に対しても2か所のCas3-crRNAを作出した。次に、PERV制御のためにdolichyl P-mannosidase用のCas3-crRNAも作出した。PERV-Cの直接KOを考え、A/CキメラのenvのTM側にCas3-crRNAを作成し、ブタ細胞での効果を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特許が障害となっているCRISPR/Cas9法ではなく、日本発の新法であるCRISPR/Cas3法がブタの細胞でも有効であることが証明された。また、ブタPERVのKOに関しても、この方法が利用できることが期待される。これにより、PERV感染の可能性の少ないブタが作出され、再生医療やバイオ人工臓器に使われれば、現実の医療を変える効果が期待できる。

研究成果の概要(英文):First, aiming to establish a new method of CRISPR/Cas3 in porcine cells, we set two sites in Exon9 of Gal-T (GGTA1), and tried KO using porcine fibroblasts. We introduced pX-Cascade, BPNLS-hCas3 and pBS-U6-crRNA at the same time, and confirmed a del of 294-754 bp in Sequence. Furthermore, Cas3-crRNA was produced at two sites for HD CMAH. Next, Cas3-crRNA for DoI-P-mannosidase was also created. Moreover, as to KO PERV-C, Cas3-crRNA was prepared on the TM side of env in the A/C chimera, and its effect on porcine fibroblasts was examined.

研究分野：移植免疫

キーワード：PERV-C CRISPR/Cas3 ブタ線維芽細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ブタを臓器発生の足場として使う再生医療やバイオ人工臓器 (異種移植) の開発が進んでいる一方で、未だブタ内在性レトロウイルス (PERV) の問題が取り沙汰され続けている。歴史的に、我々は世界に先駆けて異種間の拒絶反応が補体系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、Gal-T (GGTA1) (最大の異種糖鎖抗原) 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) が研究の一つの中心になった。今では、新規法 (CRISPR、等) による KO がブタでも成功し、Gal-T と同時に、異種糖鎖抗原の一つである H-D 抗原 (CMAH) の Doble-KO ブタの報告が続き、この他、GalNT-2 の KO や、Swine class-I の KO もされている。我々も Doble-KO ブタの作出には成功している。また、これらの進歩により、臨床前試験 (遺伝子改変ブタからサルへの移植) の成績では、異所性心臓の実験で最大生着日数 945 日を数えており、この結果は十分に臨床治験を開始できるものであると考えられている。また、ブタを使うバイオ臓器の開発は再生医療の面でも盛んで、ブタの体を足場としてヒトの膵臓や腎臓を作出する試みが進んでいる。

一方、1997 年に *in vitro* でヒトの細胞が PERV に感染する事が分かり、今も一応の問題になっている。我々はこれまで PERV の制御法の研究を続けている。まずは RNA 干渉法で、世界に先駆けて PERV の制御に成功している<J Biol 2005;137:503>。つぎに、糖鎖工学的アプローチとして N 型糖鎖の初期合成酵素 Dolicoase-P-Mannosidase (DPM) に着目し、これに knockdown (KD) を加える事により、PERV 感染制御の可能性を検証している<Transplant Int 2010;23:424>。この間、CRISPR/Cas9 法が報告され、容易に knockout (KO)/knockin (KI) ができる様になり、米国では既に全 PERV の KO に成功したとの報告もある<Science 2017;357:1303-1307>。

### 2. 研究の目的

今回の研究は大きくはヒトへの PERV 感染の可能性の少ないブタを作る事にある。

一方、世界的には CRISPR/Cas9 法により、米国の Venture が既に PERV-KO ブタを開発し、ドイツでは PERV-C の KO ブタを開発している。しかし、これらには Cas9 法の特許の問題が絡んでいる。我々は特許が問題視されている CRISPR/Cas9 法を避けて、日本独自の遺伝子 KO 法である CRISPR/Cas3 法を用いてこのブタ作りをする事を目指している。

### 3. 研究の方法

#### (1) CRISPR/Cas3法のブタ細胞での確立

ヒト細胞用に使われている pX-Cascade, BP-NLS-hCas3, pBS-U6-crRNA を用意した。また、BP-NLS-hCas3 と pBS-U6-crRNA、さらに Neo-耐性遺伝子 (tk-promoter) を組み込んだ pCXN2/hCas3+U6-crRNA を作出した。

使用する細胞としては、PERV を自然に放出している PK-15 細胞 (ブタ腎癌由来) を当初考えたが、PCR 検査の結果 PERV-C free であることが判明したため、ブタ胎児の繊維芽細胞 (D3) を用いる事にした。

(2) PERV感染の評価

ヒトの細胞へのPERV-C(A/C)の感染実験に関して、従来より当科で活用してきたPERV-Bに対するLacZ-P/B Pseudotype assay法が応用困難な為、通常のPCR検定による方法を整備した。(例、PERV-Cに関しては、5' -CTGACCTGGATTAGAACTGG-3'、5' -ATGTTGAGGATGGTCCTGG-3'、92℃-4分 x 1回、94℃-30秒—58℃-45秒—72℃-30秒 x 30回、72℃-5分 x 1回、〈J Virology 1998;72:9986〉)

4. 研究成果

1) CRISPR/Cas3 法のブタ細胞での方法論的確立

まず、他の方法で経験のあるGal-T(GGTAl)に対するKOで検証した。

CRISPR/Cas3 法にて、機能ドメイン Exon9 を target とし5'側に1箇所 (#45)、3'側に1箇所 (#86) の site をを設定し、それらをU6のpromoterに組み込み、ブタ線維芽細胞(D3)を用いてKOを試みた。(6x10<sup>5</sup>個の)ブタ線維芽細胞に、pX-Cascade, BPNSL-hCas3, pBS-U6-crRNA をそれぞれ0.5μgずつ遺伝子導入する方法をとった。Neon Transfection Systemによる電気刺激を使った。

① FACS を使用し、GSIB-4 lectin を使って、Gal 抗原の発現の変化を確認した。

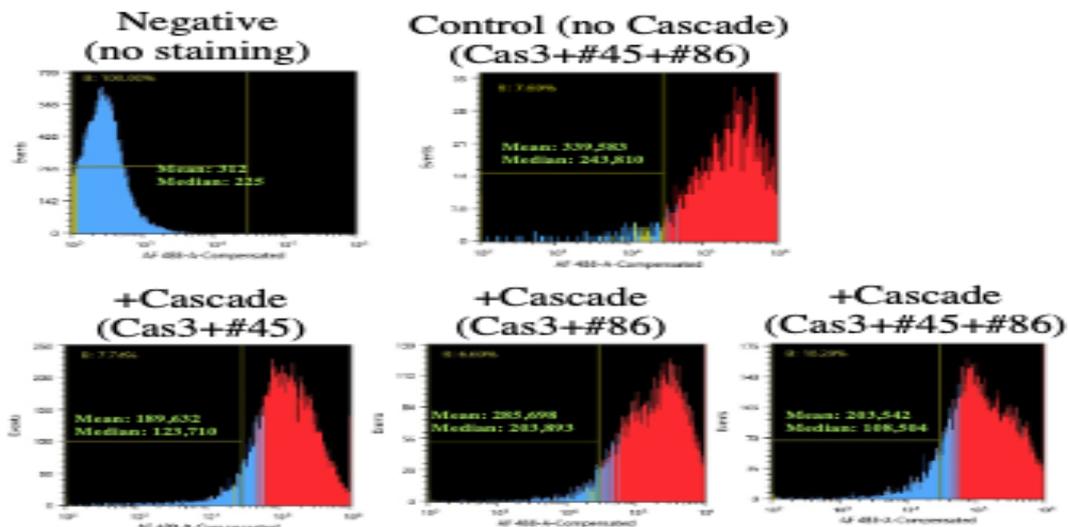


図1. FACS での Gal 抗原の発現の変化

② さらに、これらの細胞の Exon9 を target にした PCR を行い、その産物を TOPO Cloning Kit で vector に組み込み、大腸菌に transform した。KO がなかったと思われる9つ (#45:2つ, #86:2つ, #45+#86:5つ) のコロニーを選び、Sequence をかけた結果、294-754bp の del を確認している。



図2. Sequence 結果の例 (Del=294bp)。

- ③ 次に、Hanganutziu-Deicher 抗原の遺伝子 CMAH に対しても、同じく、Exon の 2 箇所 site を設定し、pBS-U6-crRNA を作出した (#52 と #64)。

## (2) PERV の直接的制御

- ① PERV-C の KO に関しては、まずは A/C キメラを検討し、多くの論文より、PERV-A 部位は常に env 領域の 5' 側にあり、反対に PERV-C の部位は TM 側であることを確かめた。そこで、env の stop codon の位置から上流へ向けた CRISPR/Cas3 の site 部位を設定し pBS-U6-crRNA を作り、これと BP-NLS-hCas3 および tk-Neo を融合した plasmid を作り出した (pCXN2/hCas3+U6-crRNA)。

そしてこの plasmid と、pCX-Cascade、さらに pCX-GFP を reporter gene として、これらを 2 : 2 : 1 の割合でブタの繊維芽細胞に同時に遺伝子導入を試みた。同じく、Neon Transfection System による電気刺激を使用した。

- ② FACS で GFP の発現を調べ、これを確認した。次に、その cell line に PCR 検査を施行し、KO がなかったと思われるの PCR 産物を同じく TOPO Cloning Kit を使い、Vector に組み込み、transformation を行った。大腸菌のコロニーを作出し、さらにその一つに Sequence で 1370bp の del を確認している。

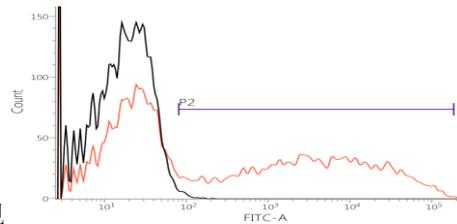


図 3. FACS での GFP 発現

- ③ 細胞のクローン化に関しては、繊維芽細胞の limiting dilution は困難を極め、既に何度も失敗している。現時点で、クローン化に成功していない状態であり、用意している感染実験での検証は今後の課題となった。

一方、コントロールとして、従来の CRISPR/Cas9 の site 部位を PERV-C の ATG に近い位置と、同じく TM 側に設定し、pX330-Cas9 を 2 カ所作った。

## (3) 糖鎖工学的アプローチ

Dol-P-mannosidase 用の Cas3-crRNA を作出するため、NIH database より各 Exon の位置を割り出し、site を設定して、DPM-crRNA を作成した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Lo PC, Maeda A, Kodama T, Takakura C, Yoneyama T, Sakai R, Noguchi Y, Matsuura R, Eguchi H, Matsunami K, Okuyama H, Miyagawa S.	4. 巻 224
2. 論文標題 The novel immunosuppressant prenylated quinolinecarboxylic acid-18 (PQA-18) suppresses macrophage differentiation and cytotoxicity in xenotransplantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunobiology	6. 最初と最後の頁 575-584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Yuki Noguchi, Akira Maeda, Pei-Chi Lo, Chihiro Takakura, Tomoko Haneda, Tasuku Kodama, Tomohisa Yoneyama, Chiyoshi Tomiyama, Yuko Tazuke, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa	4. 巻 224
2. 論文標題 Human TIGIT on porcine aortic endothelial cells suppresses xenogeneic macrophage-mediated cytotoxicity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunobiology	6. 最初と最後の頁 605-613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Akira Maeda, Hiroshi Eguchi, Kengo Nakahata, Takuji Kawamura, Kazuaki Yamanaka, Rei Matsuura, Rieko Sakai, Peichi Lo, Mayumi Asada, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa	4. 巻 104
2. 論文標題 The strategy for suppression of macrophage-mediated rejection in xenotransplantation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 675-681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/TP.0000000000003024.	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 Eguchi Hiroshi, Maeda Akira, Matsuura Rei, Shabri Afifah Mod, Lo Pei-Chi, Kodama Tasuku, Noguchi Yuki, Yoneyama Tomohisa, Toyama Chiyoshi, Tazuke Yuko, Okuyama Hiroomi, Miyagawa Shuji	4. 巻 52
2. 論文標題 Human CD200 Suppresses the HL-60 Mediated Xenocytotoxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 1910 ~ 1912
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2020.01.141	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 Noguchi Yuki, Maeda Akira, Wang Han-Tang, Takakura Chihiro, Lo Pei-Chi, Kodama Tasuku, Yoneyama Tomohisa, Toyama Chiyoshi, Eguchi Hiroshi, Okuyama Hiroomi, Miyagawa Shuji	4. 巻 52
2. 論文標題 Human CD31 on Swine Endothelial Cells Induces SHP-1 Phosphorylation in Macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 1913 ~ 1915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2020.01.140	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 Lo Pei-Chi, Eguchi Hiroshi, Sakai Rieko, Maeda Akira, Kogata Shuhei, Toyama Chiyoshi, Yoneyama Tomohisa, Ueno Takehisa, Tazuke Yuko, Watababe Masahito, Nagashima Hiroshi, Ikawa Masahiko, Okuyama Hiroomi, Miyagawa Shuji	4. 巻 52
2. 論文標題 Reactions to Porcine Cells With or Without 4GalNT2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 1916 ~ 1918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2020.01.154	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Akira Maeda, Peichi Lo, Rieko Sakai, Yuki Noguchi, Tasuku Kodama, Rei Matsuura, Tomohisa Yoneyama, Chihiro Takakura, Hiroshi Eguchi, Masahito Watanabe, Hiroshi Nagashima, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa
2. 発表標題 The strategies for preventing the macrophage-mediated rejection in xenotransplantation
3. 学会等名 Asia Pancreas and islet Transplantation Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Pei-Chi Lo, Akira Maeda, Chihiro Takakura, Yuki Noguchi, Chiyoshi Tomiyama, Tomohisa, Yoneyama, Ktsuyoshi Matsunami, Hiroshi Eguchi, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa
2. 発表標題 The novel immunosuppressant PQA-18 suppresses macrophage differentiation and cytotoxicity in Xenotransplantation
3. 学会等名 The 15th International Xenotransplantation Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Noguchi, Akira Maeda, Pei-Chi Lo, Chihiro Takakura, Tomoko Haneda, Tasuku Kodama, Tomohisa Yoneyama, Chiyoshi Tomiyama, Yuku Tazuke, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa
2. 発表標題 Human TIGIT on swine endothelial cells suppresses xenogeneic macrophage-mediated cytotoxicity
3. 学会等名 The 15th International Xenotransplantation Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Maeda, Pei-Chi Lo, Chihiro Takakura, Tasuku Kodama, Yuki Noguchi, Tomohisa Yoneyama, Chiyoshi Toyama, Tomoko Haneda, Hiroshi Eguchi, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa
2. 発表標題 The suppression of macrophage-mediated xenogeneic phagocytosis by knock-out of alpha1,3 galactosyltransferase and Hanganutziu-Deicher antigens
3. 学会等名 CAST 2019 in New Delhi (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Noguchi, Akira Maeda, Han-Tang Wang, Chihiro Takakura, Pei-Chi Lo, Tasuku Kodama, Tomohisa Yoneyama, Chiyoshi Toyama, Hiroshi Eguchi, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa
2. 発表標題 Human CD31 on swine endothelial cells induces SHP-1 phosphorylation in macrophages
3. 学会等名 CAST 2019 in New Delhi (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Peichi Lo, Akira Maeda, Rieko Sakai, Chihiro Takakura, Chiyoshi Toyama, Hiroshi Eguchi, Hiroshi Nagashima, Masahiko Ikawa, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa
2. 発表標題 The study for the reactions to the porcine cells without b4GalNT2
3. 学会等名 CAST 2019 in New Delhi (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rei Matsuura, Afifah Mod Shabri, Akira Maeda, Pei-Chi Lo, Tasuku Kodama, Yuki Noguchi, Tomohisa Yoneyama, Chiyoshi Toyama, Hiroshi Eguchi, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa
2. 発表標題 Human CD200 suppresses the HL-60 mediated xenocytotoxicity
3. 学会等名 CAST 2019 in New Delhi (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Noguchi, Akira Maeda, Pei-Chi Lo, Chihiro Takakura, Tomoko Haneda, Tasuku Kodama, Tomohisa Yoneyama, Chiyoshi Tomiyama, Yuko Tazuke, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa
2. 発表標題 Human TIGIT on swine endothelial cells suppresses xenogeneic macrophage-mediated cytotoxicity
3. 学会等名 The 15th International Xenotransplantation Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Pei-Chi Lo, Akira Maeda, Toshihisa Yoneyama, Chiyoshi Toyama, Shuhei Kogata, Chizu Okamoto, Masahito Watanabe, Hiroshi Nagashima, Hiroshi Eguchi, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa
2. 発表標題 CD177 on swine cells suppresses xenogeneic macrophage-mediated cytotoxicity
3. 学会等名 The Transplantation Society (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Shuji Miyagawa	4. 発行年 2019年
2. 出版社 INTECH	5. 総ページ数 143
3. 書名 Xenotransplantation - Comprehensive Study	

1. 著者名 Shuji Miyagawa 他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ELSEVIER Press	5. 総ページ数 3458
3. 書名 Xenotransplantation and glycomedicine Volume 4, Cell Glycobiology and Development [ 2nd .Comprehensive Glycoscience.From Chemistry to Systems BioloGy ]	

〔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
連携研究者	伊川 正人  (Ikawa Masato)  (20304066)	大阪大学・微生物病研究所・教授   (14401)	
連携研究者	長嶋 比呂志  (Nagashima Hiroshi)  (50318664)	明治大学・農学部・専任教授   (32682)	
連携研究者	前田 晃  (Maeda Akira)  (00319708)	大阪大学・医学系研究科・特任研究員   (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
---------	---------