

200500161A

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針の実効性の向上に関する研究

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 吉 倉 廣

平成 18 (2006) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針の実効性の向上 に関する研究	----- 1
吉倉 巖	
II. 分担研究報告	
1. 海外の異種移植の動向に関する調査、ブタレトロウイルスに関する研究	----- 4
神田 忠仁	
2. 豚から人への異種間臓器移植における PERV のリスク評価法確立への基礎研究	----- 6
宮沢 孝幸	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 10
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 11

異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針の実効性の向上に関する研究
主任研究者 吉倉 廣 国立感染症研究所 名誉所員

移植医療は実用的な治療技術として定着しているが、移植臓器は著しく不足している。この不足を補うために、動物由来の臓器や細胞を治療に使う異種移植医療が考案されている。しかし、ドナー動物由来の病原微生物による未知の感染症の発生・伝搬の可能性は否定できない。いったん未知の感染症が発症すれば公衆衛生上の問題となることから、厚生労働省では、平成14年に「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」を作り、異種移植の慎重な実施を求めている。この公衆衛生上の懸念は国際的に共有されるべきものであり、本研究では異種移植に該当する内外の技術開発の状況と、米国FDAやEC、OECD、WHOの異種移植ガイドラインの改訂状況の把握に努めた。

異種移植医療技術の開発現場では、ブタがドナーとして最適とされ、我が国にもブタの臓器移植をめざす研究グループがある。ブタ肝、腎細胞を利用した体外灌流や、膵臓細胞の移植、ブタ心臓をヒト心臓の移植を行うまでの一定期間利用する方法等が開発されている。ブタには内在性レトロウイルスが存在し、ヒトへの感染の可能性を排除できない。そこで、海外で分離されたミニブタ由来ブタレトロウイルス標準株の性質を詳しく調べる研究を進めた。また、我が国で移植用に開発されている遺伝子改変ブタを調べ、ヒト培養細胞やヒト末梢血単核球に感染・増殖する内在性レトロウイルスの存在を示唆する成績を得たので、その性質を調べた。

分担研究者

神田 忠仁（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター）

宮沢 孝幸（京都大学ウイルス研究所）

A. 研究目的

異種移植の臨床応用において生じる公衆衛生上の懸念や生命倫理の問題等に対応するために必要な情報を、厚生行政に提供するのが本研究の目的である。

異種移植の臨床応用では、ドナー動物由来感染症の発生が懸念される。感染症が発生すると、患者の近親者や医療従事者からはじまり、国境を超えた伝搬の可能性があることから、患者の積極的な協力のもとに、感染症の有無を追跡調査する国際的な枠組みが必要である。近年異種移植の研究が急速に進展しており、成功例がいったん報告されると、急速に世界中で臨床試験が開始される可能性がある状況から、WHOやOECDのような国際機関の主導のもとに、異種移植を受けた患者の追跡を可能にするための適切なインフォーム

ドコンセント、感染症の報告の義務等の国際的枠組みの構築が進められることになる。本研究では海外における異種移植臨床試験の規制や臨床試験の実施実状、生命倫理への配慮等を調査する。得られる情報は、国際的な動向に沿った我が国のガイドラインの運用や、追跡調査の国際ネットワークへの参加等に必要である。

ドナー動物種として利用される可能性が最も高い動物はブタである。ブタは何世紀ものあいだヒトと濃厚な接触をしてきた動物であるため、人獣共通感染症の原因となる未知の微生物が潜む可能性が低いと予想され、しかもヒトと臓器の大きさが同程度である利点もある。移植臓器の定着を可能にする遺伝子改変ブタが開発されている。しかし、ブタには無菌環境での飼育や帝王切開による出産等では排除できない内在性のレトロウイルスが存在する。本研究では、ブタレトロウイルスに関する基礎的情報の収集とブタレトロウイルスの感染を特異的に高感度で検出する技術を開発する。研究成果は、ブタ細胞を利用した

体外灌流装置等の臨床応用の安全性を評価する基盤となる。

B. 研究方法

1) WHO の Xenotransplantation Advisory

Committee 会議に参加し、我が国の規制状況を報告するとともに、諸外国の状況に関する資料を入手した。

2) ブタレトロウイルスサブタイプ A (PERV-A) のヒト細胞での増殖について詳細に調べた。我が国で移植用に開発されている遺伝子改変ブタ（日本動物工学研究所）の卵巣と末梢血リンパ球を入手し、PERV の存在とヒト培養細胞への感染性を調べた。

＜倫理面への配慮＞

今年度は、培養細胞を使った研究を行ったため、倫理面への配慮が必要な作業はなかった。

C. 研究結果

1) 平成 17 年 4 月には WHO による“異種移植に関するアドバイザリー会合”に分担研究者・神田が参加し、我が国の異種移植規制状況について説明すると共に、各国の異種移植の実状に関する情報を収集し、行政当局に報告した。また、遺伝子改変動物の作製や使用に関する Ethics についての資料は OECD や国連食糧農業機関(FAO)の議事録等から収集した。

2) ミニブタから分離された PERV の感染増殖機構についての研究を続けた。PERV-A はヒト HEK293 細胞に感染増殖するが、継代を繰り返すとウイルス産生が抑制されることがわかった。しかし、新たに細胞を加えて共培養するとウイルス産生は上昇した。このウイルス産生抑制はウイルス mRNA の転写抑制ではなく、転写後制御であった。また PERV 高感受性細胞を作出するために、PERV の感染を補助するギボンザル白血病ウイルス (GALV) の Env 発現プラスミドを作出し、様々な細胞で GALV Env 蛋白を発現させた。

3) 大阪大学と日本ハムが開発しているヒト DAF 発現ブタの末梢血と卵巣を入手し、種々のヒト細胞との共培養でウイルス分離を試みた。HeLa 細胞との共培養の培養上清に継続的に Mn 要求性逆転写酵素活性が検出された。さらに、ヒト末梢血単核球の添加で活性が上昇し、ブタ細胞との共培養で得られる活性と匹敵するレベルに達した。これまでの成績は、この遺伝子改変ブタ由来の PERV がヒト細胞に感染・増殖するこ

とを強く示唆している。

4) 2004 年に出された重要な文書として、米国 FDA の Informed Consent in Clinical Research Involving Xenotransplantation があり、我が国でも同様な指針の作成を考慮する必要の可能性がある。U.S. Department of Health and Human Services Secretary's Advisory Committee on Xenotransplantation の Report on the State of the Science in Xenotransplantation は最近の異種移植を良く纏めており、我が国の今後の取り組みの良い参考資料となる。

D. 考察

異種移植の実施によって未知の動物由来感染症が生じる可能性がある。患者本人のみならず近親者へも感染のリスクがあり、さらに感染が拡大し、国境を超えることすら起こり得る。従って、異種移植が適切に行われるよう、国際的な取り決めが必要であり、今後 OECD や WHO 主導のもとに、ドナー動物の管理、インフォームドコンセント、移植材料および患者検体の保存、患者の追跡等の指針が策定されるものと思われる。国際的な規制の動向や、情報ネットワークの構築に関する情報を収集し、国際的な協調のもとに我が国も指針の運用や改正を行わなければならない。

異種移植を受けた患者の追跡を確実なものにするためには、必要に応じて隔離や検疫が強制できるよう法整備が必要になるかも知れない。また、異種移植患者には献血の禁止や国外への渡航制限など人権に関わる措置がとられるため、異種移植による動物由来感染症の問題を広く一般に説明し、理解を得ながらインフォームドコンセントを含む指針を運用し、必要な改正を行わなければならない。諸外国における議論は多いに参考となる。

ブタの細胞は alpha-Gal 抗原を大量に発現しているため、ヒトの抗 alpha-Gal 抗体と補体を介する超急性拒絶反応が起こる。これを抑えるために補体制御遺伝子や alpha-1,3 ガラクトシルトランスフェラーゼ (alpha-1,3GT) 以外の糖転移酵素遺伝子を導入したブタや、alpha-1,3GT をノックアウトしたブタ、ヒト補体調節因子 DAF を導入したブタなどが開発されている。しかし、このようなブタ由来の臓器・細胞は移植を成立させる一方で、抗 alpha-Gal 抗体を介したウイルスに対する自然抵抗性を減弱させてしまう。内在性ブタレトロウイルスのヒトへの感染性に関する研究は、異種移

植の安全性確保の観点から重要である。

E. 結論

- 1) 異種移植の実施における感染症対策を有効に進めるためには、国際的な協調が必要である。WHO や OECD 主導で作られる枠組みに沿って、我が国の指針の適切な運用と改正を行うことになる。
- 2) 我が国で臓器提供を目的に作製されている遺伝子改変ブタの内在性レトロウイルスのヒトへの感染性について、詳しく調べる必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Watanabe, R., Miyazawa, T., and Matsuura, Y. 2004. Comparison of serum sensitivity of pseudotype retroviruses produced from newly established packaging cell lines of human and feline origins. *Virus Res.* 99: 89-93.
- Shimajima, M., Miyazawa, T., Ikeda, YU., McMonagle, E.L., Haining, H., Akashi, H., Takeuchi, Y., Hosie, M. J., and Willett, B. J. 2004. Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. *Science* 303: 1192-1195.
- Hazama, K., Miyagawa, S., Yamamoto, A., Kubo, T., Miyazawa, T., Tomonaga, K., Watanabe, R., Okumura, M., Matsuda, H., and Shirakura, R. 2005. The Effect of Expression of Complement Regulatory Protein on Pig Endothelial Cells to Pig Endogenous Retrovirus (PERV) lyses by human sera. *Transplant Proc.* 37: 503-505.
- Miyagawa, S., Nakatsu, S., Nakagawa, T., Kondo, A., Matsunami, K., Hazama, K., Yamada, J., Tomonaga, K., Miyazawa, T., and Shirakura, R. 2005. Prevention of PERV infections in pig to human xenotransplantation by the RNA interference silences gene. *J. Biochem.* 137: 503-508.
- Watanabe, R., Miyazawa, T., and Matsuura, Y. 2005. Cell-binding properties of the envelope proteins of porcine endogenous retroviruses. *Microbes Infect.* 7: 658-665.
- Miyagawa, S., Nakatsu, S., Hazama, K., Nakagawa, T., Kondo, A., Matunami, K.,

Yamada, J., Miyazawa, T., and Shirakura, R. A novel strategy for preventing PERV transmission to human cells by remodeling the viral envelope glycoprotein. *Xenotranspl.* (in press)

宮沢孝幸 (2005 年) ブタ内在性レトロウイルスと異種移植 移植 40(5): 432-435.

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

海外の異種移植の動向に関する調査、ブタレトロウイルスに関する研究
分担研究者 神田忠仁 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター

異種移植においては、ドナー動物由来の病原微生物による未知の感染症が発生し、国境を越えて拡大する可能性がある。従って、異種移植医療の規制と追跡調査は国際的枠組みに沿って行われなくてはならない。WHOによる“異種移植に関するアドバイザリー会合”に参加し、我が国のガイドラインについて説明すると共に、各国の異種移植の現状に関する情報を収集した。移植臓器の提供をめざして、我が国で作られている遺伝子改変ブタの臓器と末梢血の提供を受け、ブタ内在性レトロウイルスについて調べた。このブタには欧米ブタで報告されている内在性レトロウイルス A 型 (PERV-A) が存在し、ヒト細胞で感染、増殖することを示す成績を得た。

A. 研究目的

- 1) 海外における異種移植臨床試験の規制やインフォームドコンセント、異種移植後の患者の追跡調査の実状、生命倫理への配慮等を調査して、国際的な動向に沿った我が国のガイドラインの運用や、追跡調査の国際ネットワークへの参加等に必要な情報を得る。
- 2) 我が国で、ドナー動物として開発が進められているヒト補体活性調節因子(DAF)発現遺伝子改変ブタの内在性レトロウイルスを調べ、臨床応用における安全性に関わる基盤情報を得る。

B. 研究方法

- 1) WHO などの国際機関で開かれる異種移植に関する会合に出席し、情報を収集する。
- 2) ドナー動物として開発されている遺伝子改変ブタ（日本動物工学研究所、デュロック・ランドレース・バークシャー種交雑ブタ）の末梢血リンパ球から DNA を抽出し、PCR によりブタ内在性レトロウイルスのエンベロープ SU 遺伝子断片（約 900bp）を増幅し、プラスミドにクローン化した。末梢血リンパ球および卵巣細胞を分離し、ヒト細胞を含む種々の細胞と共培養して感染性レトロウイルスの分離を試みた。経時的に培養上清を回収し、ブタ内在性レトロウイルス逆転写酵素に特異的とされる反応系で酵素活性を測定した。
<倫理面への配慮>

今年度は、培養細胞を使った研究を行ったため、特に倫理面への配慮が必要な作業はなかった。

C. 研究結果

- 1) WHO による“異種移植に関するアドバイザリー会合”に参加し、我が国のガイドラインについて説明すると共に、各国の異種移植の現状に

関する情報を収集した。米国、英国では行政当局の指導のもとで慎重に研究が行われているのに対し、中国では規制なしに研究が行われていること、韓国では国が主導し、莫大な予算を投じて異種移植研究が推進されていること、メキシコではすでに臨床試験がおこなわれていること等がわかった。また、異種移植にもとづく感染症の発生リスクに関する情報を国際的に共有する枠組を構築する必要性が議論された。これらの情報を行政当局に報告した。会合の報告書は WHO ホームページに掲載されている。

- 2) ブタ内在性レトロウイルスのエンベロープ断片をコードする cDNA 6 クローンの塩基配列の系統樹解析によって、これらの配列は欧米ブタで報告されている内在性レトロウイルス A 型 (PERV-A) に近縁であることがわかった。一方、クローン間の配列は相互に微妙に異なり (88-99% 相同)、さらには A 型と B 型の双方の特徴を持つクローンも見いだされた。

ヒト細胞 (HeLa)、ミンク細胞 (S+L-Mink)、ブタ細胞 (PK15 および ST-IOWA) の共培養上清に逆転写酵素活性を検出した。活性は、ブタ細胞上清で最も高く、次いで S+L-Mink、HeLa

の順であった。持続感染HeLa細胞の継代培養を約2ヶ月続けた結果、単位時間のウイルス産生量は、ウイルス分離初期の約4倍に増加した。さらに、ヒト末梢血単核球の添加により、一過性に7～12倍増加した。このヒト細胞でのウイルス産生量は、ブタ細胞由来持続感染細胞(ST-IOWA)での産生量に匹敵した。

無し

D. 考察

1) 異種移植の定義、インフォームドコンセント、感染症の報告の義務等において国際的に共通の基盤を構築し、患者の追跡調査を行うことが重要であり、我が国の厚生行政においても、ガイドラインの適切な運用や見直しには、各国の動向を的確に把握しておくことが不可欠である。

2) 開発中のドナーブタには PERV-A が存在し、ブタ末梢血リンパ球中には、一般に推測されているよりも多様なウイルス変異株が存在する可能性が示唆された。PERV-A はヒト細胞への感染性をもつことが知られており、変異株の存在は、異種移植に伴う新興ウイルス感染の危険性を高める。引き続き独立クローンの配列解析を行い、ブタ個体における内在性レトロウイルスの遺伝的多様性について情報を蓄積する必要がある。

E. 結論

1) 異種移植の実施においては、各国共通の感染症対策を取る必要がある。OECD や WHO 主導のもと、我が国も積極的に参加して国際的な枠組み作りに取り組まなければならない。各国における臨床試験の実施と規制の状況を把握することが重要である。

2) 我が国で開発されているドナーブタの内在性レトロウイルスのヒトへの感染性について、詳しく調べる必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sato, H., and Kanda, T.: Characterization of PERV isolated from a transgenic pig expressing human DAF gene. (論文作成中)

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

豚から人への異種間臓器移植におけるPERVのリスク評価法確立への基礎研究
分担研究者 宮沢孝幸 京都大学ウイルス研究所

豚を用いた異種移植においてはブタ内在性レトロウイルス（PERV）のリスク評価とモニター法の確立が必要不可欠の課題となっている。本研究では、異種間移植に関わるPERVの制御法ならびにリスク評価法の確立を目的とした。本研究期間においては、PERV-AおよびPERV-Bはヒトの細胞に感染するが、転写翻訳後に抑制を受けることを明らかにした。今後、翻訳後抑制のメカニズムを追究することで、人におけるPERV感染のリスクがより明確になると思われる。

A. 研究目的

現在、臓器移植のための臓器不足の解消や、新しい細胞移植治療法の開発に向けて、豚の臓器や細胞を異種間移植する方法が研究されている。豚の細胞は α -Gal 抗原を大量に発現しているため、人の抗 α -Gal 抗体と補体を介する超急性拒絶反応が起こるが、これを抑えるために補体制御遺伝子や糖転移酵素遺伝子を導入したブタ、さらには α -1,3GT そのものをノックアウトしたブタなどが開発されている。しかしそのような手法は、抗 α -Gal 抗体を介したウイルスに対する自然抵抗性を減弱させてしまう。そのため、これらの遺伝子改変ブタからのウイルスが患者に感染し、さらには人社会に広まる危険性がある。

人に感染する可能性があるブタのウイルスのうち、最大の問題は豚内在性レトロウイルス（PERV）である。内在性レトロウイルスはすべての体細胞のゲノムに存在するため、豚から取り除くことは現時点では不可能である。PERV はヒトの細胞で増殖はするが、一般にその増殖力は弱い。しかし、わずかな変異により人に馴化したウイルスが生じたり、人の内在性レトロウイルスと組換わることで、より増殖性の高いウイルスが出現する可能性もある。本研究は、異種間移植に関わる豚内在性レトロウイルス（PERV）のリスク評価法の確立を目的とした。

B. 研究方法

PERV-A はヒト細胞である HEK293 細胞へ増殖性感染をおこすが、細胞継代を続けると上清中に放出される粒子量が顕著に減少する。一般的に内在性レトロウイルスは細胞中でメチレーションなどのエピジェネティックな制御を受ける。そこで、PERV-A 持続感染 HEK293 細胞と未感染 HEK293 細胞との共培養による放出粒子量の推移を検討し、その抑制メカニズムの解析を行った。

PERV-A 持続感染 HEK293 細胞と未感染 HEK293 細胞（あらかじめレポーター遺伝子（GFP または LacZ）を導入したもの）を 1:10 で共培養した（図1）。上清中に放出された感染性のウイルスは図2で示した方法で行った。また、上清中のウイルス粒子中に含まれる逆転写酵素活性を Roche 社の RT assay キットにより測定した。

<倫理面への配慮>

本研究はすべて *in vitro* のレベルで行われており、生命倫理上の問題は生じない。

C. 研究結果

上清中の感染性 PERV の量は、共培養後すぐに上昇したが、継代を繰り返すと低下した（図3）。また、上清中に含まれるウイルス粒子中の逆転写酵素（RT）活性も低下しており、上清中の PERV 粒子の総数（感染性 PERV

粒子と非感染性 PERV 粒子の和)も低下していることが分かった(図4)。PERV の産生抑制が転写レベルによるものであるかを Real-time PCR 法により解析した(図5)。共培養前 (Pre) と共培養後1回継代した後(P1)も、PERV の mRNA の転写量はほぼ同じであった。抗 PERV カプシド蛋白抗体を用いて、Immunoblot 解析を行ったところ、細胞中では Pre も P1 もほぼ同量の Gag 蛋白が産生されていることが分かった(図6)。しかしながら、培養上清中においては、Pre では成熟カプシド蛋白が検出されないにもかかわらず、共培養直後 (P0) と P1 では成熟蛋白が検出された。以上の結果から、PERV 持続感染細胞では、mRNA の転写および蛋白への翻訳は抑制を受けていないにもかかわらず、培養上清中にウイルスが放出されていないことが分かった。

PERV共培養試験法

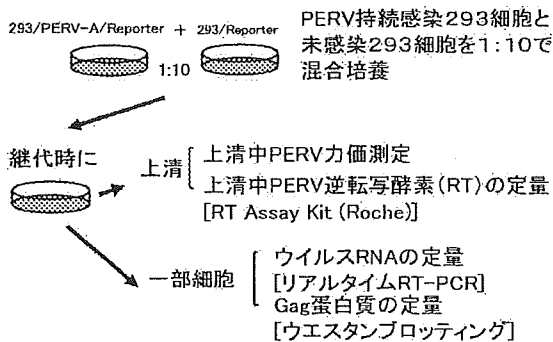


図1 PERV共培養試験法。感染性のPERVの力価測定は図2のように行った。PERV粒子中の逆転写酵素活性の測定は、Roche社のキットを用いた。

PERV力価測定法

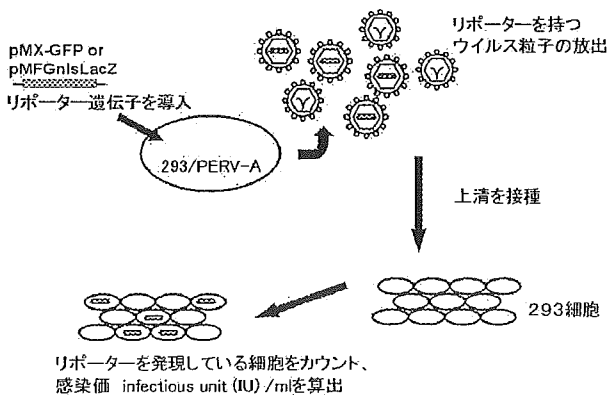


図2 PERV力価測定法。レポーター遺伝子としてGFP遺伝子またはLacZ遺伝子を用いた。

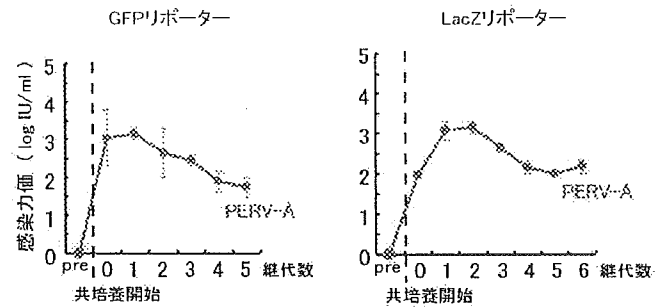


図3 共培養後の上清中の感染性PERV力価の推移。リポーター遺伝子としてGFP遺伝子を用いた場合(左図)もLacZ遺伝子を用いた場合(右図)もほぼ同様の結果が得られた。

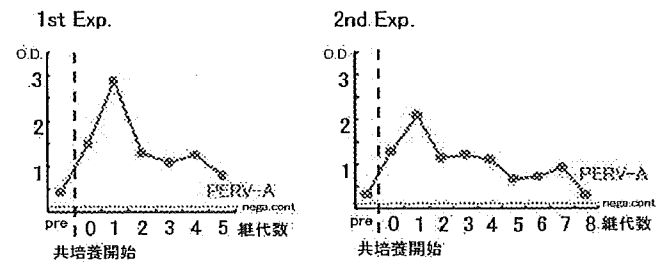


図4 共培養後の上清中の逆転写酵素 (RT) 活性の推移。実験は2回行い (1st Expおよび2nd Exp)、それぞれの結果を示す。

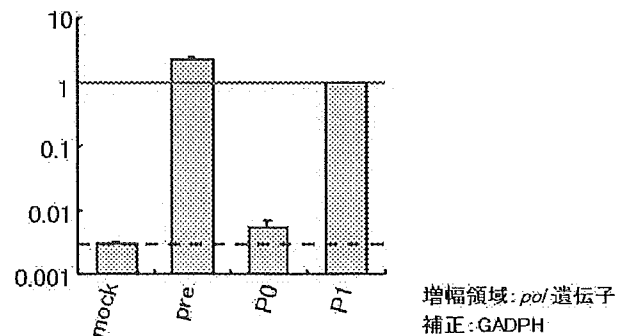


図5 細胞中のPERV由来RNA。Real-time PCRにより定量した。共培養前 (pre)、共培養直後 (P0) および共培養後1回継代した後 (P1) を測定した。

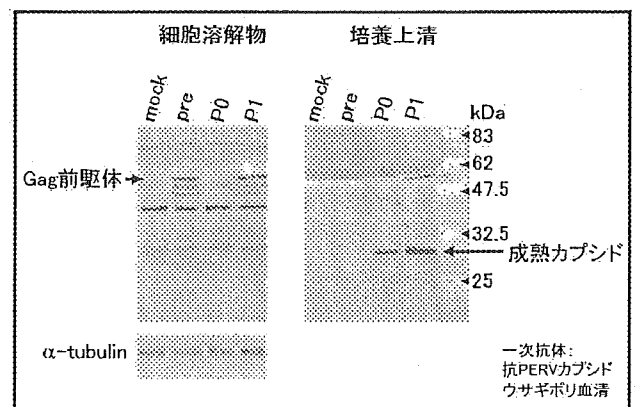


図6 PERV持続感染細胞におけるGag蛋白発現量の変化。

G. 研究発表

1. 論文発表

D. 考察

PERV 持続感染 HEK293 細胞は未感染 HEK293 細胞との共培養により、顕著なウイルス放出量の増加が観察された、しかしながら、ゲノム RNA の転写抑制は起こっておらず、また細胞中の PERV Gag 蛋白の産生も抑制されていなかった。これらの結果から、PERV 持続感染 HEK293 細胞では Gag 蛋白質の放出・成熟化が十分に行われていない可能性が示唆された。

ヒトはPERV-AおよびPERV-Bの受容体をもっており感染を許容するが、増殖を許容する細胞はごく少ない。例外的にHEK293細胞は、感染と増殖をともに許容するが、同細胞においてもPERVの増殖は継代とともに抑制される。一般的に内在性レトロウイルスの転写は、培養細胞中で抑制されることから、この抑制は転写レベルで制御されていると予想されたが、転写量とPERV蛋白産生量は抑制されていなかった。これらのことから、PERVはヒト細胞中で転写翻訳後に抑制を受けていると考えられた。転写翻訳後に抑制されるメカニズムは現段階では不明であるが、このメカニズムを明らかにすることで、PERVがヒト細胞で増殖しにくい理由が明確になると思われる。

E. 結論

PERVのレセプターをもっている動物は多いが、実験感染において体内でウイルスが増殖したという報告はない。わずかにSCIDマウスでPERVが感染し増殖したという報告はあったが、これは後に内在性のマウス白血病ウイルスとの表現系混合によるものであることが判明している。In vitroでPERVに一番感受性が高い細胞はミンクの細胞であるが、ミンクにおいても実験感染においてはPERVの増殖はみられていない。今後は、感染を許容しても増殖が起こらない機構をさらに解析し、ヒトにおいてその機構がどの程度働くことが予想されるかを検討することも重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

Watanabe, R., Miyazawa, T., and Matsuura, Y. 2004. Comparison of serum sensitivity of pseudotype retroviruses produced from newly established packaging cell lines of human and feline origins. *Virus Res.* 99: 89-93.

Shimajima, M., Miyazawa, T., Ikeda, YU., McMonagle, E.L., Haining, H., Akashi, H., Takeuchi, Y., Hosie, M. J., and Willett, B. J. 2004. Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. *Science* 303: 1192-1195.

Hazama, K., Miyagawa, S., Yamamoto, A., Kubo, T., Miyazawa, T., Tomonaga, K., Watanabe, R., Okumura, M., Matsuda, H., and Shirakura, R. 2005. The Effect of Expression of Complement Regulatory Protein on Pig Endothelial Cells to Pig Endogenous Retrovirus (PERV) lyses by human sera. *Transplant Proc.* 37: 503-505.

Miyagawa, S., Nakatsu, S., Nakagawa, T., Kondo, A., Matsunami, K., Hazama, K., Yamada, J., Tomonaga, K., Miyazawa, T., and Shirakura, R. 2005. Prevention of PERV infections in pig to human xenotransplantation by the RNA interference silences gene. *J. Biochem.* 137: 503-508.

Watanabe, R., Miyazawa, T., and Matsuura, Y. 2005. Cell-binding properties of the envelope proteins of porcine endogenous retroviruses. *Microbes Infect.* 7: 658-665.

Miyagawa, S., Nakatsu, S., Hazama, K., Nakagawa, T., Kondo, A., Matunami, K., Yamada, J., Miyazawa, T., and Shirakura, R. A novel strategy for preventing PERV transmission to human cells by remodeling the viral envelope glycoprotein. *Xenotranspl.* (in press)

宮沢孝幸 (2005年) プタ内在性レトロウイルスと異種移植 移植 40(5): 432-435.

【学会発表】

Miyagawa, S., Nakatsu, S., Hazama, K., Yamamoto, A., Fumimoto, Y., Gao, C., Miyazawa, T., and Shirakura, R. Remodeling PERV envelope N-glycans downregulate their transmission to human cells. 8th International Xenotransplantation Association Congress

2005 (Goteborg, Sweden) (10-14 September, 2005)

野田誠一郎、中村一哉、中村理加、宮沢孝幸
Gag-Rnase 融合蛋白によるブタ内在性レトロウイルスの感染制御 第 140 回日本獣医学会学術集会（鹿児島）（2005 年 9 月 30 日）

中村一哉、小泉響、中村理加、李元雨、豚内在性レトロウイルス持続感染細胞におけるウイルス再活性化 第 140 回日本獣医学会学術集会（鹿児島）（2005 年 9 月 30 日）

H. 知的財産権の出願

無し

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hazama, K., Miyagawa, S., Yamamoto, A., Kubo, T., Miyazawa, T., Tomonaga, K., Watanabe, R., Okumura, M., Matsuda, H., and Shirakura, R	The Effect of Expression of Complement Regulatory Protein on Pig Endothelial Cells to Pig Endogenous Retrovirus (PERV) lyses by human sera.	Transplant Proc.	37	503-505	2005
Miyagawa, S., Nakatsu, S., Nakagawa, T., Kondo, A., Matsunami, K., Hazama, K., Yamada, J., Tomonaga, K., Miyazawa, T., and Shirakura, R.	Prevention of PERV infections in pig to human xenotransplantation by the RNA interference silences gene.	J. Biochem.	137	503-508	2005
Watanabe, R., Miyazawa, T., and Matsuura, Y.	Cell-binding properties of the envelope proteins of porcine endogenous retroviruses.	Microbes Infect.	7	658-665	2005
Miyagawa, S., Nakatsu, S., Hazama, K., Nakagawa, T., Kondo, A., Matunami, K., Yamada, J., Miyazawa, T., and Shirakura, R.	A novel strategy for preventing PERV transmission to human cells by remodeling the viral envelope glycoprotein.	Xenotranspl.	in press		2006
宮沢孝幸	ブタ内在性レトロウイルスと異種移植	移植	40 (5)	432-435	2005



The Effect of Complement Regulatory Protein Expression on Pig Endothelial Cells to Porcine Endogenous Retrovirus Lyses by Human Sera

K. Hazama, S. Miyagawa, A. Yamamoto, T. Kubo, T. Miyazawa, K. Tomonaga, R. Watanabe, M. Okumura, H. Matsuda, and R. Shirakura

ABSTRACT

Introduction. Expression of human complement regulatory proteins (CRP) on pig endothelial cells (PEC) has been useful to avoid hyperacute rejection by human sera. On the other hand, porcine endogenous retrovirus (PERV) from PEC transfectants with CRP may acquire resistance to human sera. In this study, we investigated the effects of the transfected CRP on PERV neutralization and/or lysis by human sera.

Methods. cDNA of membrane cofactor protein (MCP: CD46), decay accelerating factor (DAF: CD55), and CD59 were transfected to PEC lines by lipofection. The expressions of these CRPs were verified by FACS analysis. The PEC lines with human CRPs were then transfected with the *LacZ* gene and PERV subtype B (PERV-B) to investigate PERV infectivity by *LacZ* pseudotype assay. Culture supernates of PEC were inoculated to HEK293 cells with or without 10% human sera. The inoculated 293 cells were then histochemically stained to count the *LacZ*-positive blue foci and calculated the rate of reduction of *LacZ*-positive cells by serum.

Results. PERV from the PEC with DAF or CD59 showed a resistance to human sera compared with those of control PEC (DAF: 59.6% \pm 5.3%, CD59: 61.1% \pm 3.9% vs control: 31.3% \pm 3.6%; $P < .01$). However, PEC with MCP did not cause such an effect (28.8% \pm 2.5%).

Conclusions. While expression of DAF and CD59 on PEC changed its PERV responsiveness to human sera, MCP did not improve it.

XENOTRANSPLANTATION OFFERS a potential solution to the shortage of available organs for transplantation. The pig represents an ideal source of organs, except for problems related to pig endogenous retroviruses (PERV). Expression of human complement regulatory proteins (CRP) on pig endothelial cells (PEC), such as membrane cofactor protein (MCP:CD46), decay accelerating factor (DAF:CD55), and CD59, have been useful to avoid hyperacute rejection by human sera.^{1,2}

To overcome hyperacute rejection in pig-to-human xenotransplantation, transgenic pigs have been designed to express human CRP.³ In contrast, it might be possible that PERV from transgenic pigs with CRP have become resistant to human serum, as the graft achieves resistances, because viral particles produced from the transgenic pig cell wall express the human CRP. In this study, we investigated

the effect of CRP on PERV neutralization and/or lysis by human sera.

From the Division of Organ Transplantation (K.H., S.M., A.Y., T.K., R.S.), and Division of Surgery (M.O., H.M.), Department of Regenerative Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan; Laboratory of Veterinary Public Health (T.M.), Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Japan; Research Institute for Microbial Diseases (K.T., R.W.), Osaka University, Osaka, Japan.

Address reprint requests to Shuji Miyagawa, Division of Organ Transplantation (E9), Department of Regenerative Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. E-mail: miyagawa@orgtrp.med.osaka-u.ac.jp

MATERIALS AND METHODS

CRP Transfection to PEC

cDNA of transmembrane-type CRP, MCP, and glycosylphosphatidylinositol-anchored CRP, DAF, and CD59 were prepared. Stable PEC lines expressing these CRPs were produced by transfection of the cDNA. The expression of the each transfected molecule was verified by flow cytometry.

PERV and *LacZ* Gene Transfection to PEC

The PEC lines with human CRP were next transfected with the *LacZ* gene with the packaging signal of the murine leukemia virus (MuLV) under the control of the long-terminal repeat of MuLV by a pseudotype infection. The PEC lines were further infected with PERV subtype B (PERV-B).⁴ The established PEC lines, PEC(Z)/PERV-B with CRP, at approximately passage 10 from the original stable PEC lines with CRP, were used in the *LacZ* pseudotype assay. The passage number did not affect the growth of these PEC lines.

LacZ Pseudotype Assay

Culture supernates of the infected PEC cells were inoculated to HEK (human embryonic kidney) 293 cells with or without 10% human serum. The inoculated HEK293 cells were histochemically stained to count *LacZ*-positive blue foci. The rate of reduction of *LacZ*-positive cells by serum was then calculated.⁵

Statistical Analysis

Data are presented as the mean value \pm standard error (SEM). Student *t*-test was used to ascertain the significance of differences, which were considered statistically significant when $P < .05$.

RESULTS

The Expression of CRPs on PEC

The expression of MCP, DAF, and CD59 on PEC (*LacZ*)/PERV-B were determined by FACS analysis. Stable transfectants effectively expressed each CRP molecule on their surface (data not shown).

The Difference in PERV Infectivity Among the PEC Lines with Human CRP and Control PEC by 10% Human Serum Treatment

A difference in PERV transmission to HEK 293 cells among the PEC (*LacZ*)/PB transfectants with each CRP was observed. The number of infected HEK 293 cells was more significantly reduced by inoculation with the supernates from MCP-transfectants (237.0 ± 37.9 vs 64.0 ± 6.0 ; $P = .003$) than those from DAF transfectants (70.0 ± 21.1 vs 41.5 ± 13.6 ; $P = .03$) or CD59 transfectants (52.5 ± 19.1 vs 31.5 ± 11.1 ; $P = .06$) transfectant (Fig 1a).

The Difference in Each PERV Resistance to Human Serum

The resistance of the PERV from each PEC with CRP to 10% human serum was assessed. PERV from the PEC with DAF or CD59 showed resistance to 10% human serum in comparison with those from control PEC (DAF: $59.6\% \pm 5.3\%$, CD59: $61.1\% \pm 3.9\%$ vs control: $31.3\% \pm 3.6\%$; $P <$

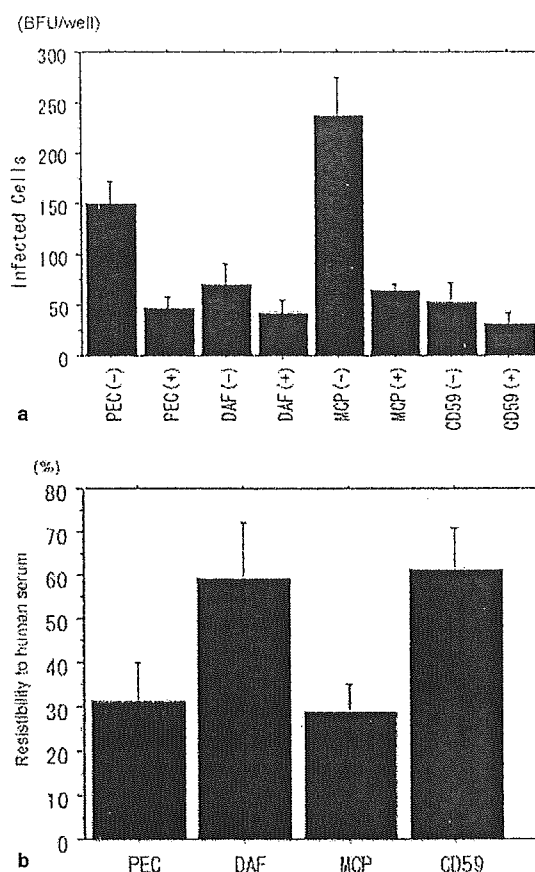


Fig 1. (a) The number of infected HEK 293 cells were more significantly reduced in the inoculation with the supernatant from the MCP-transfected PEC ($P = .003$) than those from the DAF- ($P = .03$) and CD59- ($P = .06$) transfected PECs. (b) PERV from DAF and CD59 transfectants showed resistance to 10% human serum in comparison with those from control PEC, while MCP transfectant did not cause such resistance. BFU: blue focus forming unit; +, 10% human serum added; -, 10% human serum not added.

.01). However, PEC with MCP did not produce this effect ($28.8\% \pm 2.5\%$; Fig 1b).

DISCUSSION

To perform clinical xenotransplantation safely, it is important to prevent PERV transmission to human beings. In view of overcoming hyperacute rejection, it is indispensable to produce a pig with low antigenicity and resistance to the human immunological system, by knocking out the Gal α 1-3Gal (α -Gal) epitope and by gene transduction of human CRP. However, at the same time, these genetic modifications might make the PERV particle from pig cells more resistant to human serum, which enlarges the new risk of PERV transmission to humans.

Recently, it has been reported that the PERV released

from the α -Gal-negative PEC or the PEC with DAF show low sensitivity to human sera.⁶ In this study, the PERV from the PEC with DAF or CD59 also acquire the resistance to human sera. These findings might indicate an increased risk of PERV transmission to human cells by CRP transfection. This public health problem must be solved for clinical xenotransplantation. On the other hand, PERV from the PEC with MCP did not show changes in the resistance to human sera. We will try to perform further analyses to verify this discrepancy among CRPs in modulating PERV resistance to human sera. The findings herein may be useful to make clinical xenotransplantation free from PERV infection. In conclusion, DAF and CD59 expression on PEC reduced PERV resistance to human sera, while MCP did not have such an influence.

REFERENCES

1. Miyagawa S, Shirakura R, Iwata K, et al: Effects of transfected complement regulatory proteins, MCP, DAF, and MCP/DAE hybrid, on complement-mediated swine endothelial cell lysis. *Transplantation* 58:834, 1994
2. Fukuta D, Miyagawa S, Kubo T, et al: Effect of hybrid complement regulatory proteins on xenogeneic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 306:476, 2003
3. Murakami H, Nagashima H, Takahagi Y, et al: Production of transgenic pigs expressing human DAF (CD55) regulated by the porcine MCP gene promoter. *Transplant Proc* 32:2505, 2000
4. Kurihara T, Miyazawa T, Miyagawa S, et al: Sensitivity to human serum of gammaretroviruses produced from pig endothelial cells transduced with glycosyltransferase genes. *Xenotransplantation* 10:562, 2003
5. Hazama K, Miyagawa S, Miyazawa T, et al: The significance of N-linked glycosylation in pig endogenous retrovirus (PERV) infectivity. *Biochem Biophys Res Commun* 310:327, 2003
6. Magre S, Takeuchi Y, Langford G, et al: Reduced sensitivity to human serum inactivation of enveloped viruses produced by pig cells transgenic for human CD55 or deficient for the galactosyl-alpha (1-3) galactosyl epitope. *J Virol* 78:5812, 2003

Prevention of PERV Infections in Pig to Human Xenotransplantation by the RNA Interference Silences Gene

Shuji Miyagawa^{1,*}, Shino Nakatsu^{1,2}, Takatoshi Nakagawa³, Akihiro Kondo³, Katsuyoshi Matsunami^{1,2}, Kenji Hazama¹, Junko Yamada¹, Keizo Tomonaga⁴, Takayuki Miyazawa^{5,6} and Ryota Shirakura¹

¹Division of Organ Transplantation, Department of Regenerative Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka 565-0871; ²The Animal Engineering Research Institute (AERI), 3-3 Midorigahara, Tsukuba, Ibaraki 300-2646; ³Department of Glycotherapeutics, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka 565-0871; ⁴Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871; ⁵Department of Veterinary Public Health, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555; and ⁶Host and Defense, PRESTO, Japan Science and Technology Corporation (JST), Tachikawa, Tokyo 190-0012

Received February 1, 2005; accepted February 9, 2005

The possibility of preventing the transmission of porcine endogenous retrovirus (PERV) to human cells using short interfering RNAs (siRNA) was investigated. The siRNA for the p30 of PERV gag region was cloned into pSUPER, the polymerase-III H1-RNA gene promoter. A green fluorescence protein (GFP) was also cloned into pSUPER to establish pSXGH. Pig endothelial cells (PEC) were transduced with the *LacZ* gene by pseudotype infection, and infected with PERV subtype B, resulting in the formation of PEC(*LacZ*)/PB. The PEC(*LacZ*)/PB was next transfected with pSXGH-siRNA. The expression of siRNA was provisionally checked by determining the level of expression of GFP. Culture supernatants of infected cells were then inoculated into HEK293 cells. The siRNA clearly destroyed the PERV infectivity of PEC(*LacZ*)/PB in both transient cell lines and stable clones. Moreover, the decreased levels of mRNA and gag protein were evidenced in the stable clones by real-time PCR and Western blotting, respectively. The final goal of our study was to establish a transgenic pig expressing the siRNA for PERV. The results suggest that siRNA represents a novel approach for controlling PERV infections in clinical xenotransplantation.

Key words: PERV, pig endothelial cell, pseudotype infection, siRNA, xenotransplantation.

Abbreviations: PERV, porcine endogenous retroviruses; siRNA, short interference RNA; PEC, pig endothelial cells; GFP, green fluorescence protein; PB, PERV-B; BFU, blue focus forming unit.

The pig represents an ideal source of xenogeneic organs because of their plentiful supply and their numerous anatomical and physiological similarities to their human counterparts. However, the discoveries that porcine endogenous retroviruses (PERV) can infect human cells *in vitro* and SCID mouse tissue *in vivo* have stimulated discussions concerning the degree of infectious risk in such xenotransplantations (1–4). At the present time, although PERV-related infections have not been detected in humans or non-human primates after exposure to pig xenografts (5, 6), the possibility that they could arise as a consequence of xenotransplantation cannot be excluded, especially when genetically modified pigs are used based on recent advances in nuclear transfer technology (7, 8).

In order to prevent PERV transmission, several strategies have been developed, such as the selection of animals that do not release PERVs (9), treatment of the recipient with an antiviral vaccine (10), as well as others (11, 12). However, in pigs, at least 50 proviral copies of PERV are present in the genome (13). Therefore, the pro-

duction of pigs that are completely devoid of all PERV related elements is unrealistic (14). A neutralizing antibody against the env protein of PERV would be a useful approach, but might carry the risk of activating host pig cells that express the env protein on the membrane.

A short interference RNA (siRNA) represents a mechanism of post-transcriptional gene silencing (PTGS), and has been described in plants, invertebrates and, more recently, in mammalian cells (15–17). It has been applied to inhibit the pre and/or post integration of HIV-1, and can be used as a possible therapeutic strategy to inhibit HIV-1 replication in host cells (18).

In this study, the possibility of preventing the transmission of PERV from pig cells to human cells by a stable siRNA expression system was investigated on the assumption that it is possible to establish a transgenic pig expressing siRNA.

MATERIALS AND METHODS

Cell Cultures—A PEC line, MYP30, and human embryonic kidney (HEK) 293 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) (Sigma Chemical Co., MO) supplemented with 10% heat-inacti-

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81-6-6879-3062, Fax: +81-6-6879-3069, E-mail: miyagawa@orgtrp.med.osaka-u.ac.jp

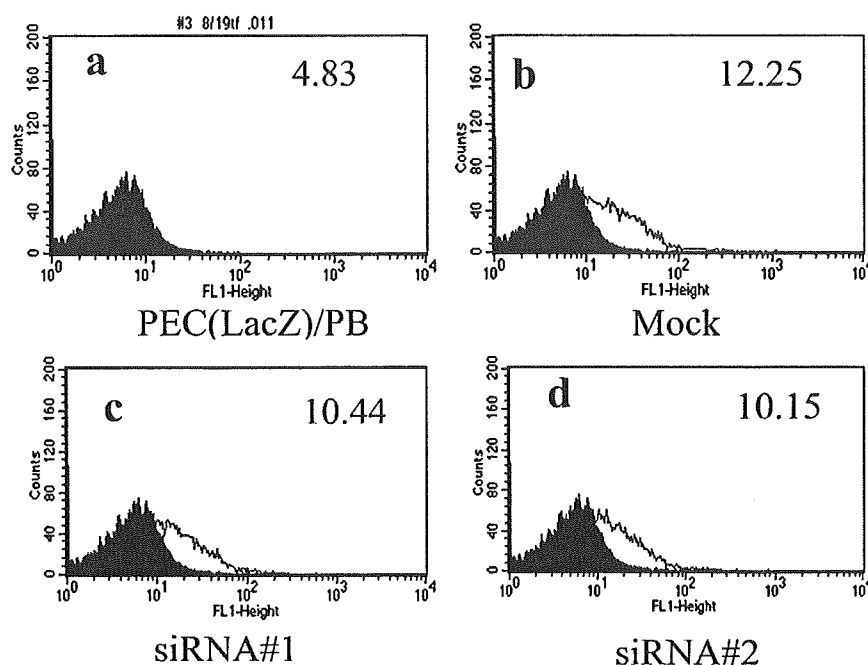


Fig. 1. FACS analysis of GFP expression in PEC(LacZ)/PB transfected with pSXGH-siRNA. An expression vector containing GFP and siRNA was transfected into PEC(LacZ)/PB cells. The level of expression of GFP on the cell surface was checked as an alternate to assessing the expression of siRNA by flow cytometry. Typical flow cytometric histograms for these transfectants after 1 week of selection with hygromycin are shown (open histogram). a, parental PEC(LacZ)/PB (closed histogram); b, PEC(LacZ)/PB with pSXGH (mock); c, PEC(LacZ)/PB with pSXGH-siRNA#1; d, PEC(LacZ)/PB with pSXGH-siRNA#2. The mean shift values for GFP expression in transfectants and naive PEC are indicated in each panel (a-d).

vated fetal bovine serum (FBS) with L-glutamine and kanamycin/amphotericin. Cultures were maintained in a 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C (19).

Construction of the Modified Genes—To clone pSUPER, the polymerase-III H1-RNA gene promoter was amplified by PCR using the recommended primers: 5'-CCATggAATTCGAACGCTgACgTC-3' (sense) and 5'-gCAAgCTTAgATCTgTggTCTCATAcAgAACTTATAAgATTCCC-3' (antisense). The PCR product was digested with *EcoRI* and *HindIII* enzymes and then cloned into the sites of pBluescript IISK(+). A green fluorescence protein (GFP) subcloned into pCX, a β -actin promoter with a CMV enhancer (21), was digested with *SalI*-*HindIII* enzymes, and cloned into the sites of pSUPER. A hygromycin resistance gene under a thymidine kinase (TK) promoter was also cloned into the *EcoRV* site of pSUPER, to establish pSXGH.

To insert the targeting sequence, DNA oligos in the p30 site of PERV were designed and cloned into the *BglII*-*HindIII* sites of pSXGH. siRNAs with the following sense and antisense sequences were used: 5'-gATCCCcgC-AATAggACCCCACTCgACTTCAAgAgAgATCgAgTggggT-CCTATTgCCTTTTTgAAA-3' (sense), 5'-AgCTTTTCCA-AAAaggCAATAgg ACCCCACTCgACTCTTgAAgTC-gAgTggggTCCTATTgCCggg-3' (antisense) (20). The siRNAs were synthesized by Nisshinbo (Chiba, Japan).

Preparation of PERV-Producing Cells—To determine PERV infectivity, we introduced a MFGnlsLacZ plasmid that encodes the LacZ gene with the packaging signal of the murine leukemia virus (MuLV) under the control of the long terminal repeat of MuLV into PEC by a pseudotype infection, and prepared PEC(LacZ), as described previously (22). To establish a PEC(LacZ) that produces PERV-B, PEC(LacZ) was infected with PERV-B produced from HEK293 cells that had been persistently infected with PERV-B; hereafter this is referred to as PEC(LacZ)/

PB. Eighteen to 32 days after infection, the viral titers of pseudotypes of PERV-B containing the LacZ gene, PERV-B(LacZ), that were released from PEC(LacZ)/PB were measured in naive HEK293 cells (23).

Flow Cytometry—The transduction of siRNA into the PEC(LacZ)/PB was provisionally checked by the expression of GFP. The expression of GFP was confirmed by FACS Calibur flow cytometry (BECTON DICKINSON) for each transient cell line and a stable clone. Parental PEC(LacZ)/PB cells were used as controls.

LacZ Assay—HEK 293 cells were seeded at 2×10^5 cells per well in 24-well plates one day prior to infection. Culture supernatants containing pseudotype viruses of PERV-B were incubated with 8 μ g/ml of polybrene for 30 min after filtration through a Millipore filter (pore size 0.80 μ m) and inoculated into the HEK 293 cells. Four hours after the inoculation, the medium was replaced with fresh D-MEM supplemented with 10% FBS, the culture was incubated for an additional 2 days, and the cells were then stained with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside. The number of LacZ-positive blue focus forming units (BFU) was counted under a microscope (24).

Quantitative Real-Time RT-PCR—Total RNA was collected from the stable clones and mock control clone, using the TRIZOL LS Reagent (Invitrogen, CA, USA). The total RNA was used in a reverse transcriptase reaction.

To evaluate the degradation of PERV gag mRNA, SYBR-Green real-time PCR was performed with Smart Cycler II System (Takara) and the SYBR premix Taq (Takara). The PERV sequence was amplified using two primer pairs specific to the target site in the gag p30 region. RT was carried at 42°C for 15 min, followed by 95°C for 2 min using random primers, followed by PCR for 45 cycles of 95°C for 5 s and 60°C for 20 s.

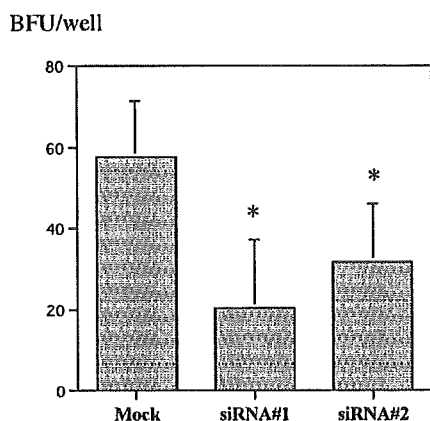


Fig. 2. siRNA directed silencing on PERV infectivity. PEC(LacZ)/PB was transfected with pSXGH-siRNA, and the culture supernatants collected from them were added to the medium of HEK293 cells. Target HEK293 cells were histochemically stained, and lacZ-positive BFU were counted, to determine viral titers. The infectivity of each culture supernatant from PEC(LacZ)/PB with pSXGH-siRNA was calculated, and the data are expressed as the mean ± SEM of eight independent experiments. An asterisk indicates a significant difference (* $p < 0.05$ vs. mock).

The amount of gag RNA in the transfectants was normalized to the level of GAPDH RNA. The amount of PERV mRNA degradation in the stable clones with siRNA was calculated with the average of the control clones with the pSXGH.

Western Blotting—The protein content of transfectant and naive cell lysates was quantified by the BCA method (Pierce), and approximately 30 μ g aliquots of the obtained proteins were subjected to 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under non-reducing conditions. The separated proteins were then electrophoretically transferred onto a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell). The membrane was blocked by treatment with 5% skim milk in Tris-buff-

ered saline/0.05% tween 20 (TBST) for 1 h at 25°C, and then incubated in 1% bovine serum albumin (BSA)/0.5% skim milk/TBST with a rabbit anti-gag p30 peptide, LRGASRRPTNLAKVC, antibody for 1 h at 25°C. After washing, the blots were incubated with horseradish peroxidase conjugated secondary antibody, porcine anti-rabbit Ig (CPL), and the signal was developed using an ECL detection system (Amersham) (25).

Statistical Analysis—Data are presented as the mean ± SEM. Student’s *t* test was used to ascertain the significance of differences within groups. Differences were considered to be statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

GFP Expression in Transient Cell Lines of PEC(LacZ)/PB with pSXGH-siRNA—Hairpin siRNA, corresponding to the targeted site, was designed in the pSXGH vector based on the polymerase III H1-RNA promoter. A closed circular plasmid, pSXGH-siRNA, was established and introduced into the PEC(LacZ)/PB by means of lipofectamine. After the selection of PEC(LacZ)/PB with hygromycin for one week, the transient expression of the GFP gene in PEC(LacZ)/PB with pSXGH was estimated by FACS analysis as a provisional index of the extent of gene transduction. After drug selection, the FACS values for GFP expression were clearly shifted in both the siRNA#1 and siRNA#2 samples (Fig. 1).

Effect of siRNA Directed Silencing on PERV Infectivity—The viral titers of PERV-B released from PEC(LacZ)/PB were next measured in HEK293 cells. HEK293 cells were inoculated by incubation with the culture supernatants of transfected cells, and a LacZ assay was carried out. While the PERV from the control PEC(LacZ)/PB and mock cells were easily transmitted to HEK293, the extent of PERV infection from PEC(LacZ)/PB with pSXGH-siRNA was limited. Virus titers for PERV-B released from PEC(LacZ)/PB with pSXGH-siRNA and control mock clones were measured using HEK293 cells (Fig. 2). The data clearly show a significant

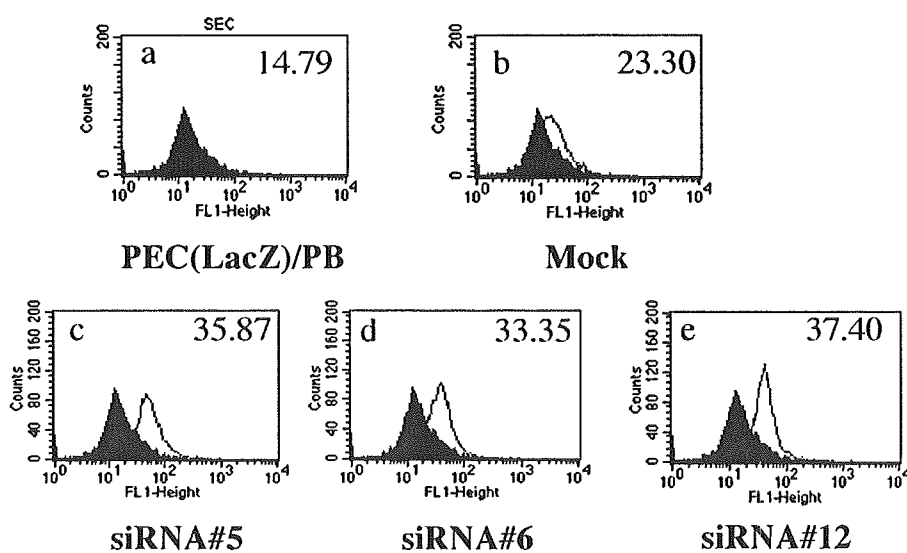


Fig. 3. FACS analysis of GFP expression in stable clones of PEC(LacZ)/PB transfected with pSXGH-siRNA. The expression levels of GFP on the cell surface of single PEC(LacZ)/PB clones were checked by flow cytometry. Typical flow cytometric histograms for each established clone are shown (open histogram). a, parental PEC(LacZ)/PB (closed histogram); b, PEC(LacZ)/PB clones with pSXGH (mock); c, PEC(LacZ)/PB clones with pSXGH-siRNA#5; d, PEC(LacZ)/PB clones with pSXGH-siRNA#6; e, PEC(LacZ)/PB clones with pSXGH-siRNA#12. The mean shift values of GFP expression in transfectants and parental PEC are indicated in each panel.

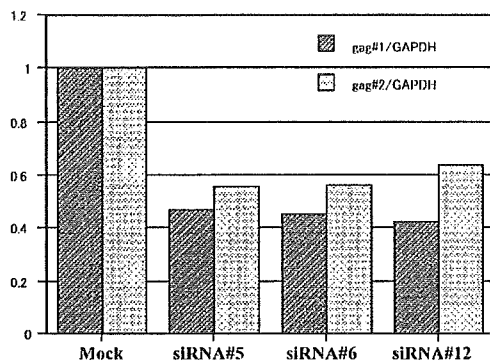


Fig. 4. Real time PCR for the mRNA of a PERV in a PEC(LacZ)/PB transfectant. To evaluate the degradation of PERV gag mRNA, SYBR-Green real-time PCR was performed with the Smart Cycler II System. The amount of gag mRNA for each of the PEC(LacZ)/PB transfectants was measured using two pairs of primers for the gag p30 region, gag#1 and gag#2, and normalised by comparison with the level of each GAPDH mRNA. The amount of PERV mRNA degradation in clones with siRNA was calculated with reference to the mock clone. Compared with the mock transfectants, PEC(LacZ)/PB with pSXGH-siRNA clones, #5, #6 and #12, showed a decreased mRNA expression for the gag region.

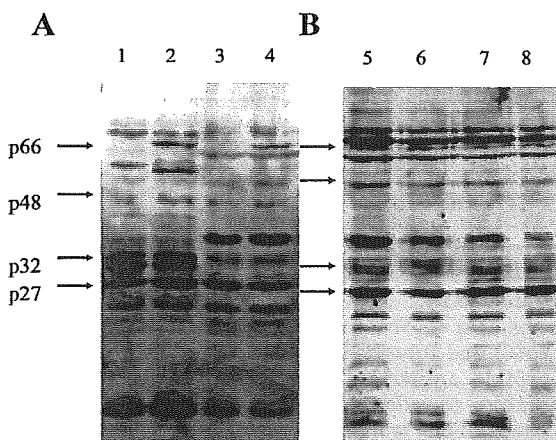


Fig. 5. Western blot analysis of PERV p27gag expression in the stable transfectants with pSXGH-siRNA. PEC, PEC(LacZ)/PB transfectants and HEK293 cells were solubilized in SDS. For each lane, 30 μ g of total cell lysate was loaded, and stained with the anti-gag peptide, LRGASRRPTNLAKVC, antibody. Specific bands for the gag polyprotein (p66), intermediate (p48), and mature capsid (p27) are indicated. 1, naive HEK293; 2, HEK293 with PERV-B; 3, naive PEC; 4, PEC(LacZ)/PB; 5, PEC(LacZ)/PB with pSXGH (mock); 6, PEC(LacZ)/PB with pSXGH-siRNA#5; 7, PEC(LacZ)/PB with pSXGH-siRNA#6; 8, PEC(LacZ)/PB with pSXGH-siRNA#12.

decrease in PERV infectivity (mock: 57.7 ± 13.6 , siRNA#1: 20.6 ± 17.0 , siRNA#2: 32.1 ± 14.0 , $n = 8$).

FACS Profiles of GFP Expression in Stable Clones of PEC(LacZ)/PB with pSXGH-siRNA—After selection with hygromycin, stable PEC(LacZ)/PB transfectants with pSXGH-siRNA and pSXGH (mock control) were next established. The expression of GFP in the stable clones was then checked by FACS. The FACS values for GFP

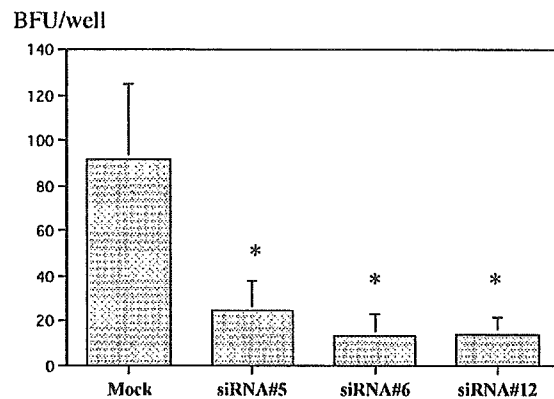


Fig. 6. The effect of siRNA directed silencing on PERV infectivity Culture supernatants collected from PEC(LacZ)/PB transfectants with pSXGH-siRNA were added to the medium of HEK293 cells. Target HEK293 cells were histochemically stained, and lacZ-positive BFU were counted to determine the viral titers. The infectivity of each culture supernatant from the PEC(LacZ)/PB clone with pSXGH-siRNA was calculated, and the data are expressed as the mean \pm SEM of eight independent experiments. Compared with the mock transfectant, PEC(LacZ)/PB with pSXGH-siRNA (#5, #6 and #12) showed a decreased PERV infectivity. An asterisk indicates a significant difference (* $p < 0.05$ vs. mock).

expression were clearly shifted in both the representative standard siRNA clones and the mock controls (Fig. 3).

Real-Time PCR for mRNA of PERV in the PEC(LacZ)/PB Transfectant—Real-time PCR was performed to detect any alterations in the mRNA of PERV-B production targeted by the siRNA in each clone. mRNA levels of the gag region were measured individually by means of a SYBR green system and normalized to GAPDH. The introduction of pSXGH-siRNA into PEC(LacZ)/PB decreased the amount of mRNA in the representative standard clones in comparison with mock clones (siRNA#5: 0.472 and 0.561, siRNA#6: 0.456 and 0.568, siRNA#12: 0.426 and 0.642) (Fig. 4).

PERV gag Protein Expression Measured by Western Blotting—To confirm the results showing the inhibition of PERV protein expression in PEC, Western blotting for the gag protein was performed in stable PEC(LacZ)/PB clones. Naive HEK293, HEK293 infected with PERV-B, PEC(LacZ) and PEC(LacZ)/PB were first checked with a peptide antibody to ascertain the gag protein bands. Each stable clone was then checked. Clones with siRNA showed a visible reduction in gag protein expression compared with mock clones without siRNA (Fig. 5).

The Effect of siRNA Directed Silencing on PERV Infectivity—The viral titers of PERV-B released from each PEC(LacZ)/PB clone were next measured in HEK293 cells. HEK293 cells were inoculated by incubation with culture supernatants of each clone, and a LacZ assay was carried out. While the PERVs from the control PEC(LacZ)/PB and mock clones were easily transmitted to HEK293, the extent of PERV infection from PEC(LacZ)/PB with pSXGH-siRNA was limited. We studied the inhibition of PERV-B infectivity of HEK293 cells by siRNA and these data are summarized in Fig. 6. The data clearly show a significant decrease in PERV

infectivity that is related to the downregulation of mRNA expression (Mock: 91.9 ± 32.8 , siRNA#5: 24.3 ± 13.6 , siRNA#6: 13.1 ± 9.7 , siRNA#12: 14.1 ± 7 , $n = 8$).

DISCUSSION

We first presented our findings on the suppressive effect on PERV infectivity by siRNA at the Xenotransplantation Association Meetings in 2003 (26). Subsequently, a similar study was reported by Karlas *et al.* (27). However, different from our present study, they investigated the effect of siRNA on PERV-infection of a human cell line, which from a clinical point of view is not related to the suppression of the primary PERV release from pig cells but, rather, is related to the secondary release from infected human cells. In addition, it is relatively easy to study the downregulation of PERV infectivity by siRNA in human cells, including the choice of the siRNA target site and the PCR primers for real-time PCR, because human cells lack naive PERVs. Moreover, the extensive human gene database is available to check the off-target effect on other genes. Therefore, the selected siRNA sites for PERV in human cells might not be a suitable site for PERV in pig cells. In the present study, we investigated the suppression of primary PERV infection by siRNA using pig endothelial cells. Since our ultimate goal is the establishment of a transgenic pig expressing the PERV siRNA, the siRNA effect must be investigated using pig cells.

In our previous study, we reported that the PEC line, MYP-30, expresses both PERV-A and -B transcripts, but not PERV-C, as evidenced by RT-PCR, and does not produce any PERV capable of infecting HEK293 cells or ST-IOWA by pseudotype infection (data not shown). Therefore, we evaluated the effects of siRNA on PERV infectivity, using PEC that had been exogenously infected with PERV-B, PEC(LacZ)/PB.

Concerning the target site of PERV by siRNA, we followed previously published procedures (20). A 21 bp oligomer initiated by gg, which has a minimal homology to other DNAs, especially pig DNA, was searched for in the GenBank data base. A site for p30 of the gag region was then selected. During the procedure, we mainly searched the gag-pol region to suppress whole PERV-A, -B, and -C by siRNA, because the env region has a less conserved sequence. We also chose another siRNA site in the gag region and attempted to construct pSXGH, but these efforts were unsuccessful. We then selected this gag region as a target site in the present study.

At the moment, several services on the internet can be used to provide information concerning a suitable RNAi site and a construct. Unfortunately, this information is currently unorganized. For example, in addition to the model presented here, an oligomer nineteen bp in length initiated by just g, or nineteen bp in length initiated by aa and terminated by tt has become popular. An oligomer 27 bp in length with a blunt end is also recommended. In addition, searching for off-target conditions in the non-redundant mRNA set of the pig was difficult because of the incomplete database relative to the pig gene.

Additionally, in this study we used an siRNA containing a cccc structure, which sometimes introduces complications in the whole structure. However, the target

site in the present study was easily prepared and a strong effect of siRNA was indicated.

In the experiment using the transient cell line, the efficiency with respect to the suppression of PERV infectivity by the siRNA for p30 was not extremely high, because not all the PEC(LacZ)/PB cells had been transfected with siRNA; that is, 20–30% of the parental PEC(LacZ)/PB may have remained intact, even after drug selection (Fig. 1). However, compared with other reports of transient suppression related to genetic therapy by siRNA for HIV, the siRNA for p30 appears to be an effective site for targeting (18, 28).

We next extended the analysis of the siRNA effect, using single PEC clones. The clones and mock clones showed some diversity in terms of PERV infectivity. The average PERV reduction of the whole PEC clones with siRNA vs. whole mock clones might be close to those of the transient lines (data not shown). However, in some representative standard clones, extremely suppressive effects on infectivity by siRNA were found.

The SYBR green system was used for real-time PCR. This procedure requires quantification of a housekeeping gene as an endogenous standard, and the detection of a suitable site in each mRNA for PCR. Several studies of the real-time PCR for pig mRNAs have been reported. However, most of the PCR primers for pig GAPDH reported in these papers do not indicate a suitable site to make using the SYBR green system possible.

Concerning the correlation between the results of infectivity and the real-time PCR, while each clone indicated a 75–80% suppression of infectivity, the suppression rate of the mRNA of p30 was relatively mild, approximately 50%. In addition, other clones also showed the same tendency (data not shown). The results of the real-time PCR for the p30 mRNA might be affected by naive competent and non-competent PERV proviruses in pig cells. However, the siRNA on p30 had a strong effect on PERV infectivity.

In the case of Western blotting, the levels of gag protein (p66) and intermediate (p48) could be analysed by the peptide antibody. Unfortunately, nonspecific (p32) and mature capsid (p27) were overlapped by non-specific bands in our system. However, the visible down regulation of the PERV gag protein could be verified, supporting the real-time PCR data.

Further examination of, for example, multiple site targeting by siRNA, will be required to attain the perfect or semi-perfect suppression of PERV infectivity. The results reported here suggest that siRNA could be useful in a new approach to addressing the issue of PERV infections in clinical xenotransplantation.

This work was supported by Grant-in-Aids for Scientific Research of Japan, Health and Labor Science Research Grants, and Host and Defense, PRESTO, Japan Science and Technology Corporation (JST). We thank Dr. Milton S. Feather for editing of the manuscript, Dr. Yasuhiro Takeuchi (The Institute of Cancer Research, London) for providing PERV-B, Dr. Hiroshi Komoda for valuable discussions, and Ms. Tomoko Kubo for excellent technical assistance.