

200607021A

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 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉 倉 廣

平成 19 (2007) 年 4 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 吉倉廣	----- 1
II. 分担研究報告	
1. ドナー用遺伝子改変ブタの内在性レトロ ウイルスに関する研究 神田忠仁	----- 4
2. ブタ内在性レトロウイルスの検出と制御 に関する基礎的研究 宮沢孝幸	----- 9
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 18

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

異種移植ではヒト細胞と動物細胞の直接接触が生じるため、ドナー動物由来感染症の発生が危惧される。いったん発生すると、患者の近親者や医療従事者を経て、他の人々へ感染が拡大する懸念がある。厚生労働省では、異種移植の適切な実施を求める指針を示している。発生した感染症は国境を超えて拡大する可能性があることから、WHO や OECD の主導のもとに、患者の追跡を可能にするために必要な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ている。本研究では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た。得られた情報は、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り、厚生行政に提供することを目的とした。

ドナー動物として利用される可能性が最も高い動物はブタである。ブタは長い間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。すでに、補体による超急性拒絶反応を抑制し、移植臓器の定着を促進するため、 $\alpha$ Gal 抗原の発現を抑制したり、ヒトの補体制御因子を導入した遺伝子改変ブタが米国、英国や我が国で作られている。しかし、ブタには品質管理では排除できない内在性のレトロウイルス(PERV)が存在し、米国、英国のミニブタから3種の PERV (PERV-A、B、C)が分離され、そのうち PERV-A、B がヒト細胞に感染すると報告されている。遺伝子改変ブタ由来 PERV は、補体による不活化を回避するため、ヒトへの感染リスクは高い。本研究では、我が国におけるドナーブタの開発状況、ブタ腎細胞を利用した体外灌流装置の開発等の進捗状況を調べると共に、ミニブタから分離された PERV-A、B に関する基礎的研究を行った。また、我が国で開発されているドナーブタの PERV について検討した。

分担研究者

神田忠仁 国立感染研・病原体ゲノム解析  
研究センター・センター長  
宮沢孝幸 京都大学ウイルス研究所  
大学院医学研究科・助教授

A. 研究目的

移植臓器の不足を補うために、動物の臓器を使う異種移植が開発されている。異種移植ではヒト細胞と動物細胞の直接接触が生じる

ため、ドナー動物由来感染症の発生が危惧される。いったん発症すると、患者の近親者や医療従事者を経て、他の人々へ感染が拡大する懸念がある。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への対応に必要な情報を集め、厚生行政に提供することを目的とした。

## B. 研究方法

1) 異種移植のリスク管理に関する米国やヨーロッパ諸国の動向を調査した。OECD や WHO の会議等に参加し情報の収集に努め、厚生労働省の担当者へ情報を提供した。

2) 我が国での異種移植関連の研究の進行状況、及び臨床試験の準備状況を調査した。

3) PERV の高感度検出系とするために、ギボンザル白血病ウイルス(GALV)のエンベロープ蛋白質(env)を細胞で発現させ、PERV の感染効率を上げた細胞株を作出するとともに、フォーカス形成、あるいは GFP 発現で PERV の感染を示す indicator 細胞樹立をめざした。併せて、ヒトで発現している内在性レトロウイルスの env が、PERV の感染を補助する可能性を検討した。

4) 我が国の遺伝子改変ブタ（デュロック・ランドレース・パークシャー種交雑ブタ）の PERV の塩基配列を明らかにした。遺伝子改変ブタの細胞をヒト細胞と共培養し、PERV のヒト細胞への感染性を調べた。

（倫理面への配慮）

動物実験やヒト由来材料を用いる研究等に該当する研究は無かった。

## C. 研究結果

1) OECD での異種移植に関する会議には主任研究者・吉倉が出席し、議論を行った。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、中国では湖南省中南大学の王維博士がすでに 22 例の豚島移植を行っていること、メキシコでもすでに臨床試験がおこなわれていること、米国のグループも 3 年以内の実現を目指していることがわかった。

2) 国内での移植用ブタの開発状況を調べた。

日本動物工学研究所では、 $\alpha 1,3$ -ガラクトース転移酵素ノックアウトブタ、ヒトN-ガラクトサミン転移酵素III発現ブタ、ヒトDAF発現ブタ、農業生物資源研究所では、ヒトDAF発現ブタの作出が完了していた。鹿児島大学フロンティアサイエンス研究推進センターでは、クラウン系ミニブタの開発を進めており、明治大学農学部生命科学科発生工学研究室ではクローンブタの作製技術そのものを研究している。京都大学医学部、藤田保健衛生大学、東京医科歯科大学ではブタ豚島移植を、大阪大学医学部と国立循環器病センターではブタ心臓移植を研究しており、岡山大学医学部ではブタ肝細胞の臨床応用を研究していることがわかった。

3) GALVenv の発現プラスミドのプロモーター、スプライシングシグナル等を最適化して、env を高発現するプラスミドを構築した。293細胞に導入し、PERV の感染効率を上げた細胞株の作出を試進めている。PERV-A のシュードタイプウイルスを用いて、人血清中に PERV-A の感染を促進する可溶性因子があるか検討したが、そのような因子は検出されなかった。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。

4) 日本動物工学研究所の遺伝子改変ブタ細胞には、欧米で報告された PERV-A, B, C にそ

れぞれ近縁の PERV プロウイルスが存在した。遺伝子改変ブタの卵巣細胞と HeLa 細胞を 5 日間共培養した後、洗浄により卵巣細胞を除去した。その後、HeLa 細胞を継代培養し、38 日目に全 DNA を抽出した。この DNA 中にブタ GAPDH 遺伝子は認められず、PERV の少なくとも pol と env 遺伝子が検出された。塩基配列から、卵巣細胞中の PERV-A に近縁なウイルスが HeLa 細胞に感染したことがわかった。

#### D. 考察

ドナー用に我が国で開発されている遺伝子改変ブタの PERV-A の一部がヒト細胞に感染することが示された。これまでの研究は、ブタの株化細胞 (PK15、ST-IOWA 等) 由来の PERV-A, B、及びミニブタ由来 PERV-A/C 組換え体がヒト株化細胞へ感染することを報告しており、ブタ臓器細胞から直接ヒト細胞に PERV が感染することを示したデータは殆ど無い。異種移植の安全性を評価する上で重要な研究成果である。

本研究は終了したが、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な枠組みのなかで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。我が国における適切なインフォームドコンセントのフォーマットを早急に作製する必要がある。

PERV がヒト細胞に感染することから、PERV の病原性に関する研究が必要であり、新たな研究組織の構築が求められる。

#### E. 結論

異種移植に伴う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、我が国も国際的な枠組みの中で異種移植に関する指針を適切に運用しなければならない。今後も、異種

移植に関する情報の収集が必要である。

我が国でドナー用に開発されているブタの PERV はヒト細胞に感染するので、臨床応用においてヒトへの感染が危惧される。PERV の病原性に関する研究が必要である

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

別紙

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## ドナー用遺伝子改変ブタの内在性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

我が国で移植用に開発が進んでいる遺伝子改変ブタに存在するブタ内在性レトロウイルス (PERV) の *pol*, *env* 遺伝子の塩基配列を解析した。遺伝子改変ブタの卵巣細胞には、少なくとも欧米の PERV-A, PERV-B, PERV-C に近縁の多様な PERV が存在することがわかった。卵巣細胞と HeLa 細胞を共培養すると、PERV-A の一部が HeLa 細胞へ感染能し、プロウイルスとして1ヶ月以上存在することが示唆された。この遺伝子改変ブタ臓器の臨床応用には、病原性を含む PERV の詳細な解析が必要である。

### A. 研究目的

日本動物工學研究所で移植用に開発されている遺伝子改変ブタにはブタ内在性レトロウイルス (PERV) が存在する。PERV は、ブタの品質管理では排除できないうえ、補体による超急性拒絶反応を抑制するために遺伝子改変されたブタで増殖した PERV は、やはり補体による不活化を回避する。従って、PERV の感染性、病原性を詳細に解析することが、異種移植の安全性に重要である。遺伝子改変ブタの PERV の検出とヒト細胞への感染性を検証した。

### B. 研究方法

- 1) 我が国で移植用に開発されている遺伝子改変ブタ (デュロック・ランドレース・パークシャー種交雑ブタ) の卵巣細胞を用いた。PERV プロウイルスを増幅する PCR に用いたプライマーは、欧米で報告された PERV-A, B, C, AC の全ゲノム塩基配列情報に基づいて設計した。
- 2) HeLa 細胞と遺伝子改変ブタ卵巣細胞を

5日間共培養した後、洗浄により卵巣細胞を除去した。その後、細胞の継代培養を約1ヶ月続け、38日目に細胞DNAを抽出した。38日目の細胞には、ブタ細胞が含まれていないことを、ブタ GAPDH 遺伝子特異的 PCR により確認した。

3) nested PCR により PERV ゲノムの *pol* および *env* SU 遺伝子領域の一部 (約 2kb および 0.7kb) を増幅した。増幅産物を直接、または一旦プラスミドにクローニングした後、自動シーケンサーを用いてシーケンシングした。得られた塩基配列の進化系統関係を、近隣接合法を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

ブタ卵巣は日本動物工學研究所から譲り受けた。動物実験やヒト由来材料を用いる研究等に該当する研究は無かった。

### C. 研究結果

- 1) PERV *pol* 領域と *env* SU 領域を増幅した PCR を図 1 に示した。共培養感染実験に用いた HeLa 細胞中に、PERV のプロウイ

ルスを検出した。共培養後 38 日目の全 DNA を PERV *pol* 遺伝子特異的プライマー 3 種を用いて nested PCR を行なったところ、いずれも予想したサイズの増幅産物 (約 2kb 前後) が得られた (lane 1-3)。同じ DNA サンプルを用いて、ブタ GAPDH 遺伝子の増幅を試みたが、増幅産物は認められなかった (lane GAPDH)。

同様に、共培養後 38 日目の HeLa 細胞 DNA から PERV *env* 領域を増幅することができた (data not shown)。

2) *pol* 領域配列 (約 2kb) の系統樹解析の結果を図 2 に示した。共培養感染実験由来 HeLa の *pol* 領域 PCR 増幅産物 (Fig1.lane 1-3) の塩基配列を、遺伝子改変ブタ卵巣細胞由来の PERV *pol* クローンの配列、および欧米のブタの PERV-A, B, C, AC の *pol* 配列 (黒字) と比較した。その結果、(i) 遺伝子改変ブタ卵巣細胞には少なくとも 3 種の PERV DNA (欧米の PERV-A に近縁のもの=青字、欧米の PERV-B に近縁のもの=黄緑字、および欧米の A と C の中間型=紫字) が存在すること、(ii) 共培養感染実験由来 HeLa の PERV (マゼンタ; HeLa-o-1, 2, 3) は、PERV-A に最も近縁であることがわかった。

3) *env* 領域配列 (約 0.7kb) の系統樹解析の結果を図 3 に示した。同様に、共培養感染実験由来 HeLa の *env* 領域 PCR 増幅産物の塩基配列を、遺伝子改変ブタ卵巣細胞由来の PERV *env* クローンの配列、および欧米のブタの PERV-A, B, C, AC の *env* 配列と比較した。その結果、(i) 遺伝子改変ブタ卵巣細胞の PERV *env* 領域も、欧米の PERV-A に近縁のもの=青字、欧米の PERV-B に近縁のもの=黄緑字、および欧米の A と C の中間型=紫字) の 3 種が存在

すること、(ii) 共培養感染実験由来 HeLa の PERV の *env* 領域の塩基配列 (マゼンタ; HeLa-o) は、*pol* 領域同様に PERV-A に最も近縁であることがわかった。

#### D. 考察

欧米ブタの PERV-A はヒト細胞への感染能力をもつことが知られている。我が国で移植用に開発が進んでいる遺伝子改変ブタ細胞の PERV に多様性があること、このうちの欧米ブタ PERV-A に近縁のウイルスの一部が、ヒト細胞への感染能力をもつことが示唆された。これらの PERV は、異種移植に伴う新興ウイルス感染症に関わる可能性があり、引き続き研究を続ける必要がある。

#### E. 結論

我が国で移植用に開発が進んでいる遺伝子改変ブタの PERV には、ヒト細胞に感染するものが含まれる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

Sato, H., and Kanda, T.:

Characterization of PERV isolated from a pig expressing human DAF gene. (準備中)

##### 2.学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

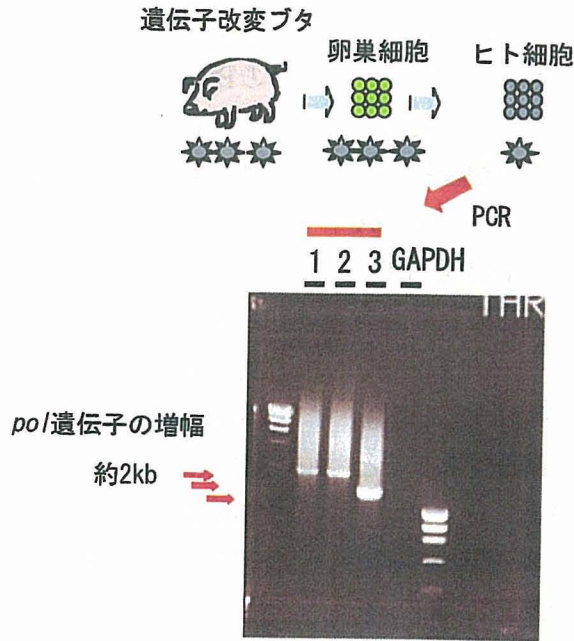


図1 PERV *pol* 領域の nested PCR

HeLa 細胞と遺伝子改変ブタ卵巣細胞を5日間共培養した後、洗浄により卵巣細胞を除去した。その後、HeLa 細胞の継代培養を約1ヶ月続け、38日目に total DNA を抽出した。PERV *pol* 遺伝子特異的プライマー3種を用いて nested PCR を行なったところ、予定されるサイズの DNA (約2000bp 前後) が検出された (lane 1-3)。一方、ブタ GAPDH 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR を行なったところ、増幅産物は認められなかった (GAPDH)。



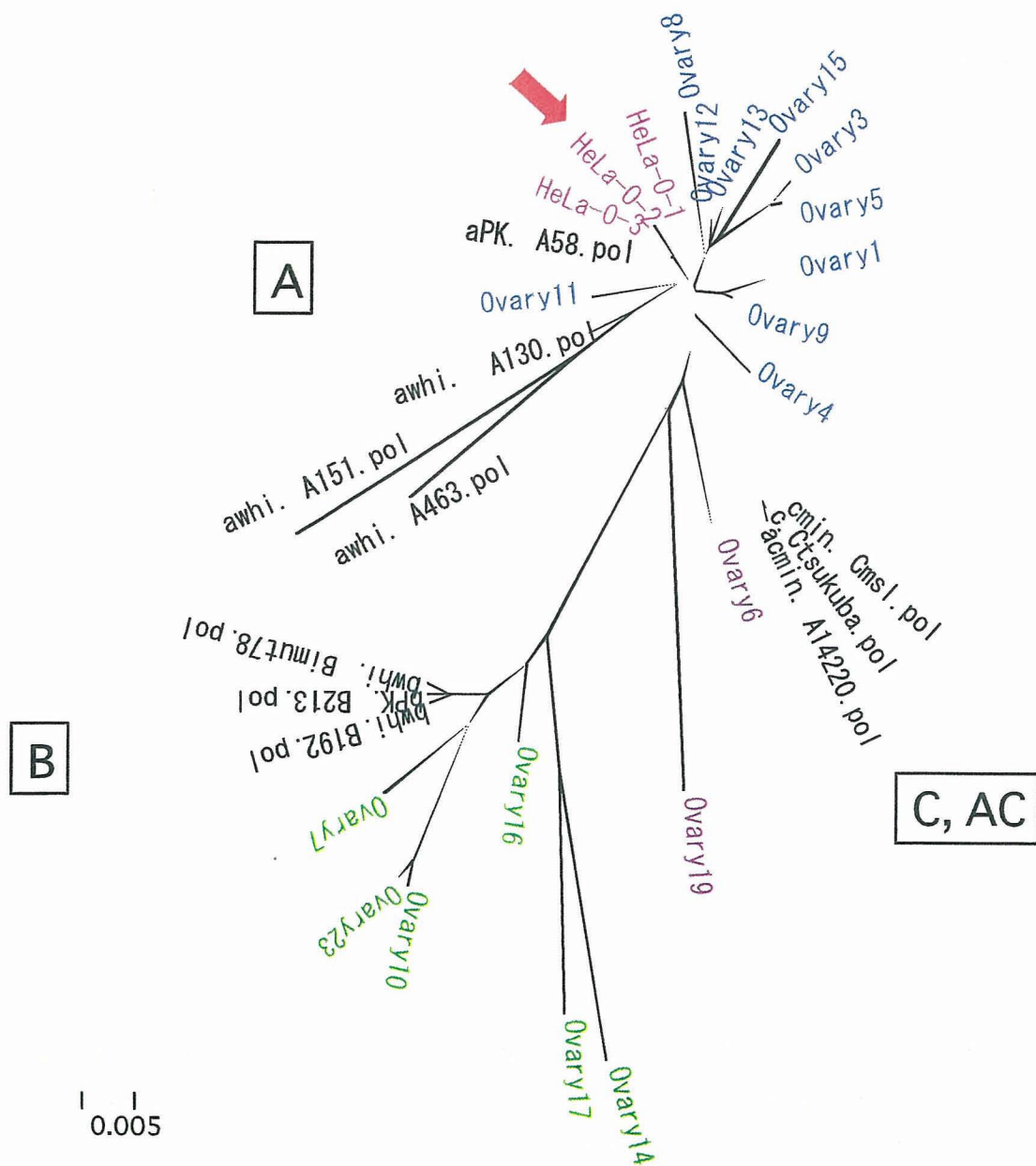


図2. *pol* 遺伝子断片塩基配列 (約 2kb) の系統樹。黒字=欧米で報告された PERV-A, B, C, AC 対照配列、青字=遺伝子改変ブタ卵巢細胞中の PERV-A クローン、黄緑字=遺伝子改変ブタ卵巢細胞中の PERV-B クローン、紫=遺伝子改変ブタ卵巢細胞中の PERV-A と C の中間型クローン、マゼンタ (赤矢印) = 共培養感染実験由来 HeLa 細胞 DNA の 3 種の PCR 産物 (Fig1.lane 1-3) の配列。

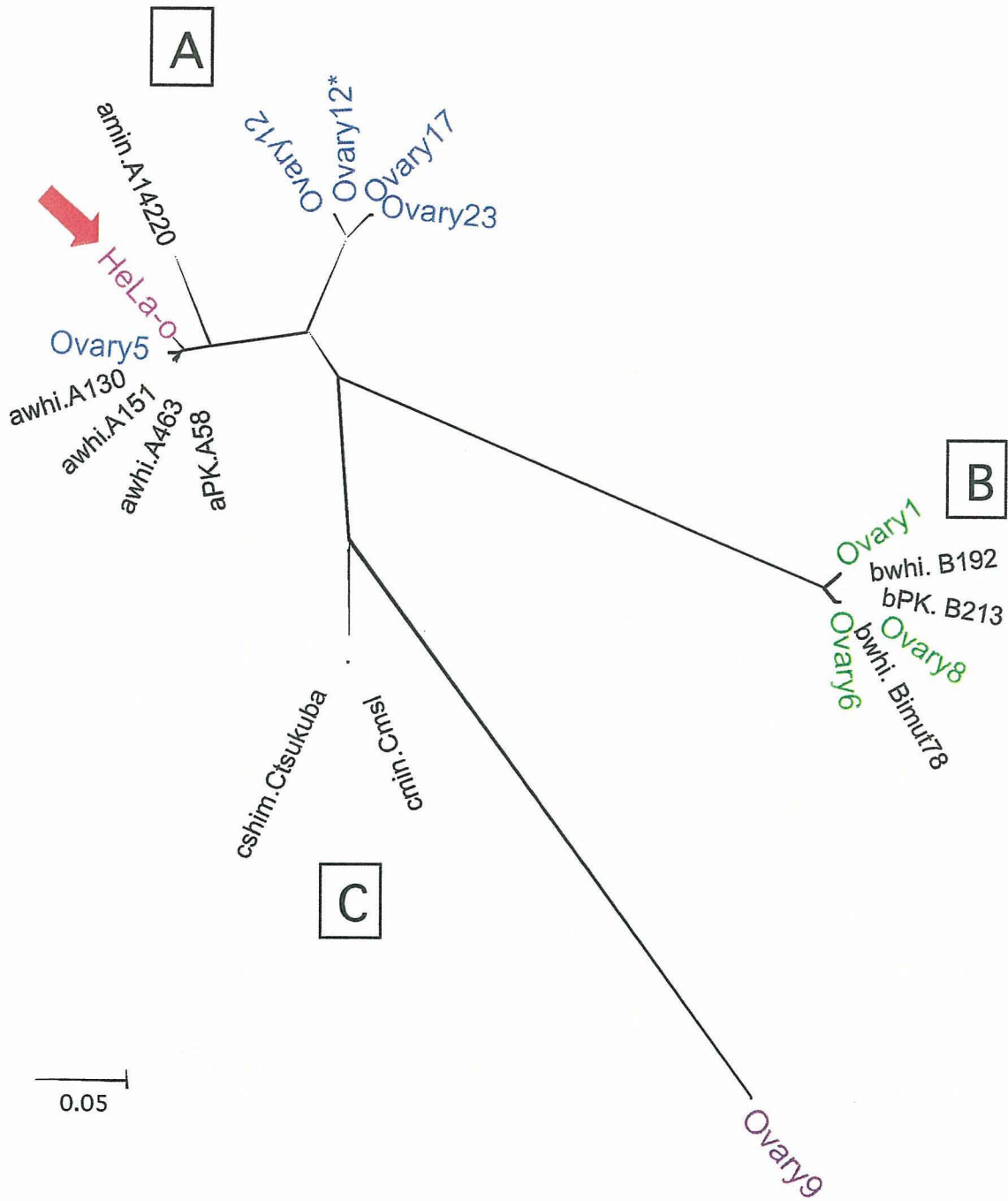


図3. *env*遺伝子断片塩基配列（約0.7kb）の系統樹。黒字＝欧米で報告されたPERV-A, B, C対照配列、青＝遺伝子改変ブタ卵巢細胞中のPERV-Aクローン、黄緑＝遺伝子改変ブタ卵巢細胞中のPERV-Bクローン、紫＝遺伝子改変ブタ卵巢細胞中のPERV-Cクローン、マゼンタ（赤矢印）＝共培養感染実験由来HeLa細胞DNAのPCR産物の配列。

## ブタ内在性レトロウイルスの検出と制御に関する基礎的研究

分担研究者 宮沢孝幸 京都大学ウイルス研究所助教授

移植における臓器不足を克服するために、ブタからヒトへの異種移植の研究が国内外で活発に進められている。異種移植の実用化には乗り越えるべくハードルがあるが、超急性拒絶反応の制御は、トランスジェニック技術やクローン技術、ノックアウト技術などの動物工学的手法で解決できる目処がたってきた。特に、超急性拒絶反応の最大の原因である $\alpha 1,3$  Gal が発現しないブタも既に国内外で作出されている。また、ブタ豚島のヒトへの移植は実用化レベルにすでに達している。しかし、ブタはヒトに感染する可能性がある内在性レトロウイルスをもっており、PERV のヒトへの感染はヒト内在性レトロウイルスとの組換えにより、未知のウイルスを生み出す危険性もある。ブタからヒトへの異種移植の実現には、PERV を産生しないブタを作出することが理想的であるが、ゲノムに複数コピー存在する PERV をノックアウト技術で取り除くことは非常に手間がかかる。本研究においては、ヒトにおける PERV のリスク評価を行うための基礎的技術の開発とともに、ヒト細胞における PERV の増殖機構の解明、PERV を産生しにくいブタの開発のための基礎研究を行った。PERV-A および PERV-B はヒトの細胞に感染しうるが、増殖を許容する細胞はほとんどない。PERV-A をヒト胎児腎由来株化細胞である HEK293 細胞に感染させると、一過性にウイルスの増殖が認められるが、徐々にウイルス産生は低下し、感染性のウイルスは検出されなくなった。HEK293 細胞でのウイルス産生抑制の機序を詳細に検討したところ、このウイルス産生抑制は mRNA の転写レベルで起こるのではなく、蛋白翻訳後に起こっていることがわかった。また、PERV のヌクレオカプシドに大腸菌由来の RNaseH を融合させた蛋白を作製し、それをウイルス産生細胞に発現させることにより、ウイルス感染を感染細胞内で抑制させることを試みた。本研究により、基本的な PERV の検出系が確立され、またヒトの細胞において PERV の産生が抑制を受けるメカニズムを明らかにした。さらに、大腸菌由来の RNaseH を利用した PERV 制御法を提示することができた。

### A. 研究目的

ヒトの臓器移植治療における慢性的な移植臓器不足に対処するために、ブタからヒトへの異種間臓器移植が注目されている。異種間臓器移植に際しては様々なリスクが指摘されているが、中でも重要なものに感染症の問題

がある。ブタ内在性レトロウイルス(porcine endogenous retrovirus (PERV))は、ブタからヒトへの伝播が危惧される感染性因子の一つである。

PERV は、ブタのゲノム内にプロウイルスの形で存在し、様々な細胞から感染性粒子と

して放出される。また、エンベロープ (*env*) 遺伝子の違いによって、PERV-A、PERV-B、PERV-C の3つのサブグループに分類される。ヒトは PERV-A および PERV-B に対する受容体をもっているが、PERV-C に対する受容体はもっていない。PERV-A および PERV-B はヒト胎児腎由来の HEK293 細胞に持続感染する。

通常のレトロウイルスの持続感染においては、持続感染細胞からは感染性粒子の放出が見られる。ところが、PERV-A 持続感染 HEK293 細胞 (293/PERV-A 細胞) を長期間培養したところ、培養上清中に感染性粒子が見られなくなった。この細胞を 293/PERV-A LTC (Long-Term Culture) 細胞と名付けた。本研究において、私は 293/PERV-A LTC 細胞におけるウイルス放出低下メカニズムの解析を行った。また、大腸菌由来の RNaseH 遺伝子を PERV のカプシド蛋白に融合させた蛋白を用いて、感染細胞内でウイルス感染を阻止する方法を確立した。

## B. 研究方法

### 1) 細胞

HEK293 細胞 (ヒト胎児腎由来株化細胞)、PK-15 細胞 (ブタ腎由来株化細胞) の培養液として、10%FCS (ウシ胎児血清) 添加の Dulbecco 変法最少必須培養液 (DMEM) を用いた。MFGnlsLacZ<sup>11</sup>( $\beta$ -galactosidase 発現ベクター)を 293/PERV-A LTC 細胞にシュードタイプウイルス法を用いて導入し、293/PERV-A LTC/LacZ 細胞と命名した。同様に、pMX-GFP(green fluorescence protein 発現ベクター)を 293/PERV-A LTC 細胞に FuGENE6 Transfection Reagent (Roche) を用いて導入し、293/PERV-A LTC/GFP 細胞と命名した。また、MFGnlsLacZ、pMX-GFP を HEK293 細胞にも同様の方法で導入し、それぞれ 293/LacZ 細胞、293/GFP 細胞と命名した。

### 2) プラスミド DNA

PAgp-IRES: PERV-A Gag-Pol 発現プラスミド。マウス白血病ウイルスの Gag-Pol 発現プラスミド gpIRES (東京大学医科学研究所の北村俊雄博士から分与) ベースである。gpIRES の gag-pol 部分を PERV-A gag-pol で置換した。

PAgag: PERV-A Gag 発現プラスミド。

PAgp-IRES の pol 部分を削除した。

PAgag-RNase: PAgag-RNase 融合蛋白発現プラスミド。PAgp-IRES の pol 部分を RNaseH で置換した。RNaseH は大腸菌 (DH5a) から RNaseH 部分を PCR で増幅したものをを用いた。

作製したプラスミドの塩基配列は SHIMADZU BIOTECH ジェノミックリサーチを利用して確認した。

### 3) PERV 検出 PCR

ゲノム DNA は QIAampBlood Kit(QIAGEN 社)を用いて各細胞から精製した。得られた DNA はフォワードプライマー(5'-CCCGATCAGGAGCCCTATATCCTTACGTG-3')、リバースプライマー (5'-CGCAGCGGTAATATCGCGATCTCGT-3') を用いて PCR (95\_5 分に続いて 95\_30 秒、58\_30 秒、72\_45 秒 (30 サイクル)、72\_10 分 (最終伸長反応)) を行い増幅した。

### 4) PERV 持続感染 293 細胞と未感染 293 細胞との共培養

293/PERV-A LTC/LacZ 細胞と 293/LacZ 細胞を 1:10 の割合で混合し、培養した。その後、継代をする毎に培養上清を回収した。上清は 0.80  $\mu$ m 径のフィルターで濾過した。

PERV の感染価を調べるために以下の方法で LacZ assay を行った。i) 1 穴当たり  $5 \times 10^4$  個の 293 細胞を 48 穴プレートにまく。ii) 12 時間後、段階希釈した培養上清に 8  $\mu$ g/ml のポリブレン (polybrane) を添加し、これを細胞に接種する。iii) 4 時間 37°C で静置した後、ウイルス液を新鮮培養液と取り替え、48 時間

培養する。iv) X-gal 溶液にて染色して、倒立顕微鏡下で観察する。GFP をリポーターに用いた時には染色せず、蛍光顕微鏡下で観察する。リポーター遺伝子を発現した 293 細胞の数 (染色コロニー数) を数えることにより、ウイルス感染価を求めた。

#### 5) Reverse transcriptase (RT)アッセイ

800 $\mu$ m 径のフィルターで濾過した培養上清 1ml を 4 $^{\circ}$ C、15,000rpm、90 分遠心にかけて、得られたペレット中の RT (逆転写酵素) 活性を Reverse Transcriptase Assay Kit (Roche) にて測定した。

#### 6) Real time RT-PCR

RNA は、Trizol reagent (Invitrogen Corp.,) を用いて、細胞から精製した。RT-PCR は、Super Script III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen Corp.,) を用い、RNA100ng に対して行った。得られた DNA は、TaqMan Universal PCR master mix および TaqMan real-time fluorescence PCR system ABI prism 7000 (Applied Biosystems) を用い、PCR (40 サイクル、denaturation, 15 秒 95 度; extension, 1 分 60 度) によって増幅した。PCR で使用したプライマーは、フォワードプライマー (5'-TAC-CGC-TGA-CTG-GAG-AAG-TG-3')、リバースプライマー (5'-CAG-CCA-TCC-TCT-TAC-CTT-CC-3') で、これは PERV-A の *pol* 部分 (GenBank accession no. AY099323) に対応している。

#### 7) イムノプロット

2 $\times$ 10<sup>4</sup> 個の細胞から SDS サンプルバッファーを用いて細胞溶解物を得た。また、4 $\times$ 10<sup>7</sup> 個の細胞から培養上清を 20ml ずつ集め、17,000 $\times$ g、90 分、4 $^{\circ}$ C で遠心した。得られたペレットは 20  $\mu$ l の SDS サンプルバッファーで溶解した。これらを、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 法にて泳動し、polyvinylidene difluoride membrane を用いて、ウエスタン

プロットした。その後、濃度 1:200 のウサギ抗 PERV カプシド (CA) ポリクローナル抗体 (CA のエピトープを含む合成ペプチドをウサギに免役して得た抗体) で、1 時間ないし一晚反応させ、次いで、濃度 1:2000 のアルカリホスファターゼ結合ヒツジ抗 rabbit IgG 抗体 (Sigma-Aldrich Inc.,) で 1 時間反応させた。膜上の蛋白質は、CDP-Star Chemiluminescence System (New England BioLabs Inc.,) と Imaging Analyzer LAS-1000 (Fuji Photo Film Co., Ltd.,) を用いて検出した。

#### 8) *env* および *gag-pol* 発現プラスミドのトランスフェクション

pCAG-VSV-G (ウシ水疱性口炎ウイルス (vesicular stomatitis virus) の G 蛋白質発現プラスミド) を、FuGENE 6 を用いてトランスフェクションした。293/PERV-A 細胞内プロウイルスの *gag-pol* 領域を、pGP-IRES<sup>11)</sup> (Moloney MLV の Gag-Pol 発現プラスミド) の *gag-pol* 領域と入れ替えて pAgpIRES を作製した。pAgpIRES および pGP-IRES は、FuGENE6 を用いて、トランスフェクションし、プラストサイジンで薬剤選択を行い、安定形質転換細胞を得た。

(倫理面への配慮)

本研究はすべて培養細胞を用いる実験である。また、市販の培養細胞以外、ヒト由来サンプルを用いる実験はない。

### C. 研究結果

293/PERV-A LTC 細胞のゲノム DNA を精製し、10 倍階段希釈を行い、それぞれの希釈サンプルについて PCR を行ったところ、PERV プロウイルス DNA が検出された (図 1)。同様に 293/PERV-B、PK-15 細胞中にも PERV プロウイルス DNA が存在することを確かめた (図 1)。ウイルスを産生していない 293/PERV-A LTC 細胞においても、ウイルスを産生している 293/PERV-B 細胞ならびに

PK-15 細胞と同等のプロウイルスが観察された。この結果より、293/PERV-A LTC 細胞はウイルス産生が見られないものの、PERV のプロウイルスが多数組み込まれていることが明らかになった。

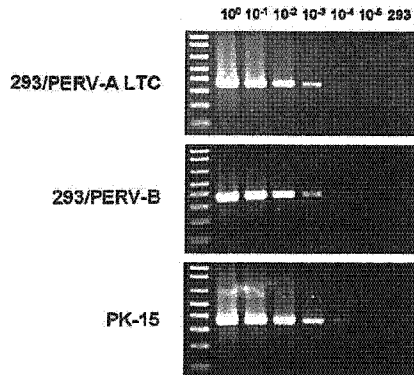


図 1. 細胞内に組み込まれた PERV プロウイルスの電気泳動

各細胞から DNA を精製し、階段希釈した後、PERV 特異的プライマーを用いて PCR を行った。増幅された PCR 産物を電気泳動した。左端：マーカー、 $10^0 \sim 10^{-5}$ ：各濃度に希釈した DNA を鋳型とした PCR 産物、293：未感染 293 細胞 DNA の PCR 産物

293/PERV-A LTC/LacZ 細胞と 293/LacZ 細胞を 1:10 の比率で共培養し、LacZ assay によって上清中のウイルス力価を調べた。力価は、共培養前 (Pre) (すなわち 293/PERV-A LTC/LacZ 単独) では確認できないものの、共培養によって大幅に上昇し、2 回目の継代をピークとして、徐々に低下した (図 2a)。リポーター遺伝子の影響を考慮するため、リポーター遺伝子を EGFP にかえて同様の実験を行った。293/PERV-A LTC/GFP 細胞と 293/GFP 細胞を 1:10 の比率で共培養し上清中のウイルス力価を測定したが、LacZ をリポーター遺伝子としたときとほぼ同様の結果が得られた (図 2b)。続いて、培養上清中のウイルス(粒子)に含まれる逆転写酵素 (RT) の活性を調べるため、RT アッセイを行った。共培養前では、わずかな活性しか見られなかったものの、共培養によって大幅な上昇が見ら

れ、次いで徐々に低下した (図 2c)。これらの結果から、293/PERV-A LTC 細胞と未感染 293 細胞を共培養することによって、ウイルスの産生が一時的に回復することが確かめられた。

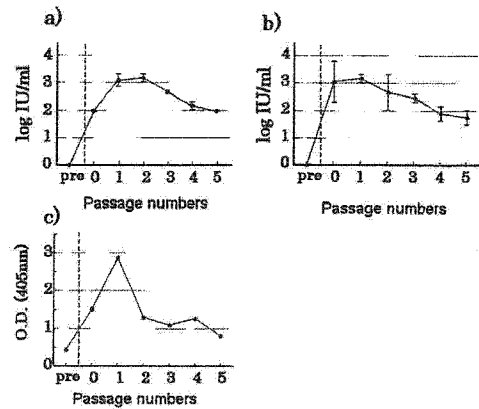


図 2. 293/PERV-A LTC 細胞と未感染 293 細胞の共培養によるウイルス産生増強  
a および b：共培養後のウイルス力価の推移  
横軸：継代数 縦軸：力価 (log IU/ml) (レポーター遺伝子：LacZ (a), GFP (b))  
c：共培養後の RT 活性の推移 横軸：継代数 縦軸：RT 活性 (OD 値)

293/PERV-A LTC 内のウイルス RNA 量を調べるため、リアルタイム RT-PCR を行った。すると、共培養前では培養上清中のウイルス力価が上がっていないにも関わらず、高いレベルでウイルス RNA が存在した (図 3a)。続いてイムノプロットを行い、細胞内 PERV Gag 蛋白質の存在を調べた。共培養の前後とともに Gag 前駆体の存在が確かめられた (図 3b)。また、共培養前の培養上清中には CA 蛋白質が見られなかったが、共培養直後には現れ、1 回目の継代後には、はっきりと検出された (図 3c)。これらの結果から、293/PERV-A LTC 細胞には、Gag 蛋白質のプロセッシング過程で何らかの障害があることが示唆された。

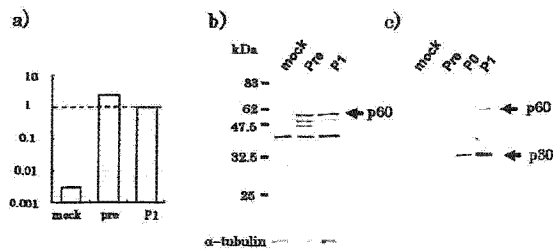


図 3. 293/PERV-A LTC 細胞内の RNA と Gag 蛋白質

a: リアルタイム RT-PCR による

293/PERV-A LTC 内の RNA 量

(P1 時を 1 とする相対値) Pre: 共培養前 P1: 継代 1 回後

b: イムノプロットによる細胞内蛋白質の検出  
Pre: 共培養前 P1: 継代 1 回後 矢印: p60 が前駆体 Gag 蛋白質

c: イムノプロットによる培養上清中蛋白質の検出

Pre: 共培養前 P0: 共培養直後 P1: 継代 1 回後 矢印: p60 が前駆体 Gag 蛋白質、P30 が成熟 CA 蛋白質

293/PERV-A LTC 細胞に pCAG-VSV-G をトランスフェクトし、その培養上清を用いて、ウイルス力価を測定したところ、力価は非常に低いものの感染性のウイルスが検出された。一方、293/PERV-B 細胞を用いて同様の実験を行うと、力価の上昇が認められた (図 4a)。また、293/PERV-A LTC 細胞に pgp-IRES をトランスフェクトして、ウイルス力価を測定すると、力価は非常に低い物の感染性のウイルスが検出された。一方、293/PERV-B 細胞では、力価の上昇はほとんど見られなかった (図 4b)。

次いで、PERV-A および MLV の gag-pol 発現プラスミド (pPAgp-IRES および pgp-IRES) および VSV-G 発現プラスミドを 293 細胞、293/PERV-A LTC 細胞、および 293/PERV-B 細胞に導入し、ウイルス力価を比較した (図 5)。293 細胞および 293/PERV-

B 細胞に pgp-IRES および pCAG-VSV-G をトランスフェクトすると、293 細胞では  $10^8$ /ml 以上の、293/PERV-B 細胞では  $10^7$ /ml 以上の非常に高いウイルス力価が認められたが、293/PERV-A LTC 細胞においては、感染性ウイルス力価は  $10^3$ /ml 程度と低かった。また、pPAgp-IRES および pCAG-VSV-G をトランスフェクトすると、293 細胞では有意な感染性ウイルス力価が観察されたが、293/PERV-A LTC 細胞では感染性のウイルスは検出されなかった。

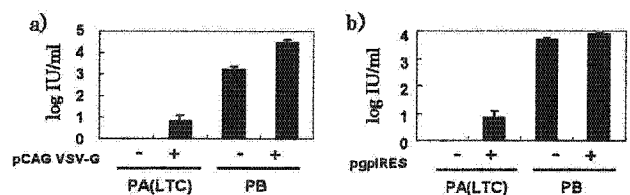


図 4. env および gag-pol の供給時のウイルス力価

a) pCAG VSV-G をトランスフェクションしたあとのウイルス力価 (log iu/ml)

PA(LTC): (-) 293/PERV-A LTC の上清、(+ ) 293/PERV-A LTC にトランスフェクションしたあとの上清; PB: (-) 293/PERV-B の上清、(+ ) 293/PERV-B にトランスフェクションしたあとの上清

b) pgpIRES をトランスフェクションしたあとのウイルス力価 (log iu/ml)

PA(LTC): (-) 293/PERV-A LTC の上清、(+ ) 293/PERV-A LTC にトランスフェクションしたあとの上清; PB: (-) 293/PERV-B の上清、(+ ) 293/PERV-B にトランスフェクションしたあとの上清



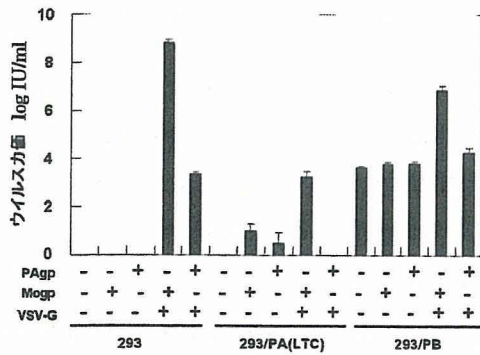


図5. env および gag-pol の供給時のウイルスカ価

PERV-A および MLV の gag-pol 発現プラスミドおよび VSV-G 発現プラスミドを 293 細胞、293/PERV-A (LTC)細胞、および 293/PERV-B 細胞に導入し、ウイルスカ価を比較した。

PERV の産生を抑制するために、PERV の gag 遺伝子の下流に RNase 遺伝子を融合させた蛋白質の発現プラスミド (pPAgag-RNase) を作製した。また、コントロールとして、PERV-A の Gag-Pol 遺伝子を発現するプラスミド

(pPAgp-IRES) および PERV-A の Gag 遺伝子を発現するプラスミド(pPAgag)を作製した (図6)。

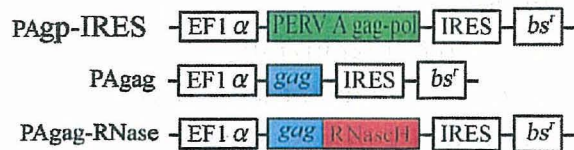


図.6. 作製したプラスミド DNA の遺伝子地図。

EF1 $\alpha$  : プロモーター

IRES: internal ribosome entry site

bsr: プラストサイジン耐性遺伝子

作製したプラスミドを 293S 細胞にトランスフェクションし、薬剤選択によりクローニングした後に、抗 PERV Gag 抗体を用いたウェスタンブロットによって蛋白質発現を確認し

た (図7)。

PAgag をトランスフェクションした 293S 細胞からは Gag 蛋白質の前駆体が 50kDa の位置にバンドが検出され、PAgag-RNase をトランスフェクションした 293S 細胞からは 60kDa の位置に特異バンドが検出された。これらの結果から作製したプラスミドからは、計算値通りの分子量の蛋白質が発現していると考えられた。

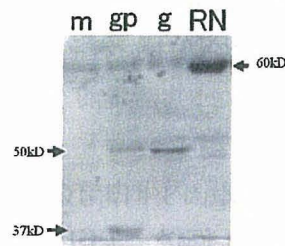


図7. プラスミドからの蛋白質発現確認のために行ったウェスタンブロット。

m: プラスミド非導入 293S 細胞

gp: PAgp-IRES を導入した 293S 細胞

g: PAgag を導入した 293S 細胞

RN: PAgag-RNase を導入した 293S 細胞

RNase 融合 Gag 蛋白質の PERV の増殖に与える影響を評価するために、LacZ assay を行った。陽性対照として 293(LacZ)/PERV-A BTI 細胞を用いた。予備実験により、293(LacZ)/PERV-A BTI 細胞からは約  $10^4$  IU/ml のウイルスカ価が得られた。

RNase 融合 Gag 蛋白質の影響を評価するために PERV 産生細胞である

293(LacZ)/PERV-A BTI 細胞に PAgag-RNase と対照として PAgag をトランスフェクションしプラストサイジンで選択をして 293(LacZ)/PERV-A BTI/PAgag-RNase 細胞と 293(LacZ)/PERV-A BTI/PAgag 細胞を樹立した。これらから得られたウイルスのカ価を LacZ assay で調べた。実験は 6 回行い、293/PERV-A BTI 細胞から産生されるウイルスカ価を 100 とした。

図3に示した通り、RNase 融合 Gag 蛋白質



発現細胞から得られたウイルスの力価はポジティブコントロールと比較して低い結果が得られた。平均すると75%の抑制がみられた。

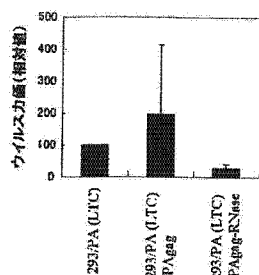


図8. RNase結合Gag蛋白質を発現させた細胞におけるPERV-Aの産生抑制  
PAgagおよびPAgag-RNaseを293/PERV-A LTC細胞に導入し、ウイルス力価を測定した。実験は6回行い、293/PERV-A LTC細胞から産生されるウイルス力価を100とした時の相対値を示した。

#### D. 考察

感染性粒子を放出していたPERV-A持続感染細胞(293/PERV-A細胞)を長期間培養することにより、粒子の放出が著しく低下した。この細胞は、分与を受けた当初、LacZ assayで $10^4$  iu/ml程度のウイルス力価が観察されており、十分にウイルス粒子が放出されていた。PERV-A感染に伴い感染細胞の増殖抑制が起こり、非感染細胞が選択された可能性があるため、PCRによって細胞ゲノムDNAを調べたところ、確かにPERVのプロウイルスDNAが組み込まれていた。

次いで、293/PERV-A LTC細胞とPERV未感染の293細胞を共培養することで、一時的にはあるが、粒子放出が再活性化することが確かめられた。293/PERV-A LTC細胞内に存在するPERVプロウイルスは、完全にその活性を失ってしまったわけではなく、何らかの刺激によって再び増殖し、細胞からの放出が行われうることを示された。

ウイルスの生活環のどの段階が阻害されているか調べるために、リアルタイムRT-PCR

およびイムノプロット解析を行ったところ、mRNAは十分に発現されており、Gag前駆体も正常に翻訳されていた。しかしながら、Gag前駆体からプロセッシングを経て完成されるべきCAタンパクが検出されないことが分かった。すなわち、293/PERV-A LTC細胞では、正常なCAタンパクが出来ないことにより、ウイルス粒子放出が低下したことが示唆された。

さらに、293/PERV-A LTC細胞にVSV-G発現プラスミド、MLVおよびPERV-Aのgag-pol発現プラスミドをそれぞれトランスフェクションしたところ、VSV-Gを供給しても、MLVのgag-pol発現プラスミドを導入しても、感染性粒子の放出はほとんど見られなかった。このことから、293/PERV-A LTC細胞では、Gag蛋白質のドミナントネガティブ変異体が発現している可能性も示唆された。

RNaseH融合ヌクレオカプシド蛋白質を用いたPERVの抑制を試みたところ、HEK293細胞においてPERV-Aの産生を抑制することに成功した。しかし、PERV産生を完全に阻害することはできなかった。その理由として融合蛋白のウイルス粒子への取り込み異常やRNase活性が充分高くなかったことが考えられる。

#### E. 結論

HEK293細胞でのPERV産生抑制は転写レベルで起こるのではなく、蛋白質翻訳後に起こっていることがわかった。また、PERVのヌクレオカプシドに大腸菌由来のRNaseHを融合させた蛋白質を用いて、感染を抑制させるに成功した。本研究により、基本的なPERVの検出系が確立され、ヒトの細胞におけるウイルス産生抑制機序を明らかにすることができた。さらに、新しいPERV制御法を提示することができた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Miyagawa, S., Nakatsu, S., Hazama, K., Nakagawa, T., Kondo, A., Matsunami, K., Yamamoto, A., Yamada, J., Miyazawa, T., and Shirakura, R. 2006. A novel strategy for preventing PERV transmission to human cells by remodeling the viral envelope glycoprotein. *Xenotransplantation* 13: 258-263.
- 2) Watanabe, R., Miyazawa, and T., Matsuura, Y. 2005. Cell-binding properties of the envelope proteins of porcine endogenous retroviruses. *Microbes Infect.* 7: 658-665.
- 3) 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.
- 4) 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 complement regulatory protein expression on pig endothelial cells to porcine endogenous retrovirus lyses by human sera. *Transplant Proc.* 37: 503-505.
- 5) 宮沢孝幸 2005. プタ内在性レトロウイルスと異種移植 移植 40 : 432-435.

### 2. 学会発表

- 1) Miyagawa, S., Nakatsu, S., Hazama, K., Yamamoto, A., Fujimoto, Y., Gao, C.,

Miyazawa, T., and Shirakura, R. Remodeling PERV envelope N-glycans downregulate their transmission to human cells. 8th International xenotransplantation 2005. 9.

- 2) 野田誠一郎、中村一哉、中村理加、宮沢孝幸 Gag-RNase 融合蛋白によるプタ内在性レトロウイルスの感染防御 第140回日本獣医学会学術集会(鹿児島) 2005. 9.
- 3) 中村一哉、小泉響、中村理加、李元雨 プタ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 2005. 9.
- 4) 中津志野、山本亜紀、徐恒傑、中川孝俊、近藤昭宏、福沢正洋、宮沢孝幸、宮川周士 N型結合糖鎖合成経路を利用したプタ内在性レトロウイルス感染制御の試み 第10回日本異種移植研究会 2007. 3.
- 5) 馬場健司、中村一哉、小泉響、庄嶋貴之、岡田雅也、中村理加、石川美恵子、宮沢孝幸 ウイルス産生が認められなくなったプタ内在性レトロウイルス持続感染ヒト由来細胞株におけるウイルス複製に関する解析 第143回日本獣医学会学術集会 2007.4. (発表予定)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

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	刊名	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.

**X**ENOTRANSPLANTATION 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.<sup>1,2</sup>

To overcome hyperacute rejection in pig-to-human xenotransplantation, transgenic pigs have been designed to express human CRP.<sup>3</sup> 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