

バイオ人工細胞・臓器の開発による糖尿病その他の疾患の治療に関する研究

研究分担者 岡部 勝 大阪大学微生物研究所 教授
伊川 正人 大阪大学微生物研究所 教授

要旨

目的は医療用バイオ人工細胞・臓器の開発である。主眼をバイオ人工膵島とし、その細胞供給用の遺伝子改変ブタの作出をめざした。超急性拒絶反応を止める主軸となる複数の補体制御因子をhybrid化した分子を作成し、Transgenic mouseで発現を確かめた。また同時に、HLA-Eを高発現する変異分子も作成し、これもTransgenic mouseで発現を確かめた。また、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) /Cas (CRISPR Associated) システムでのブタCMAH遺伝子のknockoutに一定の目途がたった。

研究協力者

蓮輪英毅(助教) 江崎陽子(研究員)

A. 研究目的

目的は、医療用バイオ人工細胞・臓器の開発である。主眼をバイオ人工膵島とし、その細胞供給用の遺伝子改変ブタの作出をめざす。現有する異種抗原-Galをknockout(KO)したブタに、他の補体制御因子、抗凝固因子、細胞性免疫制御分子やレトロウイルス制御用遺伝子を導入し、臨床応用可能な膵島細胞の供給源となるブタを作出する。将来的に糖尿病患者へのこのバイオ人工膵島を足がかりに、劇症肝炎治療へバイオ人工肝臓、透析患者にバイオ人工腎臓の供給を目指す。

B. 研究方法

1. 遺伝子の選択。現在、世界で遺伝子改変ブタ作製に関係する分子は、

- * 補体制御因子----C1-INH, MCP(CD46), DAF(CD55), CD59。
- * 糖転移酵素----GnT-III, α -1,2FT, Endo- β -galC。
- * 凝固系(抗凝固因子)---TFPI, Thrombomodulin(TM)、CD39。

- * NK細胞制御--HLA-G, HLA-E。
- * Macrophage制御--CD47。
- * T細胞制御--CTLA4-Ig, FasL, TRAIL, C11TA。
- * 保存----Hemoxygenase-1。
- * 内在性ブタレトロウイルス(PERV)のKD。
- * H-D抗原の遺伝子(cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase : CMAH)のKO、等である。

今回のprojectでは、まずは、GalをKOしたブタをbaseに下線を引いた分子を発現したブタの作出を目指す。

2. 遺伝子構築

Promoterの選定では、現在世界で使われているpromoterは一般的に、CMVやRSVのウイルスpromoter、Chick β actin(pCAGGS)、human EF-1 α 、human mouse H2k、あるいはrat insulin II or pig Insulin promoterである。加えて、導入gene本来のpromoterである。膵島での遺伝子発現は、一般的にinsulin promoterが確実と思われるが、他の臓器での発現が望めない欠点がある。一方、pCAGGSはユビキタスに発現するが、一部の報告では膵島での発現が弱いとされている。今回はより重要と思われるCTDMをinsuline promoterで、HLA-EをpCAGGSで発現させるこ

とにした。EnhancerにはCMVのenhancerを使用した。

諸外国のブタ作出方法はヒトの遺伝子=cDNAやgenomeを1つ1つ導入し、高発現の系統を樹立し、交配により重ね合わせる方法である。また、最近はIRESに換え2Aシステムを用い、2-3の分子を繋いで一度に発現させる方法も一部で始められている。

我々は高発現を得るのに、cDNAのcodonを改変しブタで至適なものとする方法を取る。Codon変換に関しては、各分子のアミノ酸配列を崩さず、ブタで最も頻度の高いt-RNAに合わせたDNA配列に組み替える方法である。これまでにDAFをcodon変換しin vitro, in vivo (マウス)での強発現を確認している。

* 各分子の機能ドメインを、同分子、別の分子間で繋いだ多重分子 (hybrid) を作製し、この人工cDNAをブタに遺伝子導入する方法をとる。<CTDM> DAFの機能ドメインに関しては、SCR2-3が補体のclassical pathwayを制御し、SCR2-4がalternative pathwayを制御する事が判明しているため、SCR2-4を使った。同じく、MCPの場合も、補体制御機能が有るSCR2-4を使った。

さらに、C1-INHに関しては、アミノ酸配列の1-99は補体制御機能とは関係がないので、この部分を取り除いた構造を作出した。

Thrombomodulinに関しては、直接抗凝固機能に関与するEGF4-6とEGF3の一部を選んだ。

また、CTDMのThrombomodulin部分に関しては、直接抗凝固機能に関与するEGF4-6とEGF3の一部を選んだが、Thrombinの結合にはEGF3の部分のさらに12個のアミノ酸の必要と判断し、あとでこれを加えた<NCTDM>。

* HLA-Ev(147)(147番目のSをCに変更する事により高発現が見込まれる)にIRESでhuman $\beta 2m$ を繋ぎ合わせた<HLA-E* >。また新たに、これらを2Aで繋ぎ合わせた<HLA-Ev >。

* CMAHのsiRNA法によるKDを試みた。

* PERVのKDも試みた。

ブタを使ったバイオ人工細胞・臓器での大きな難題はブタPERVの存在である。siRNAによるKDが効果を現す事を既にin vitroで確かめている。

H-1 promoterにpol部分のsiRNA(#1)を組み込む。又、U6 promoterも用意し、他の部分のsiRNA(#2)を組み込む。

3. Transgenicマウス作り

昨年作った2種類のコンストラクト<CTDM> <HLA-E* >を、通常のマイクロインジェクションによりBDF1xBDF 1にそれぞれ150個の胚を移植した。生後8週令のマウスの各臓器での発現をRT-PCRで検討した。

4. CMAH遺伝子の検索およびCRISPR法の適応。

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) / Cas (CRISPR Associated) システムでのブタCMAH遺伝子のKO siteを検索した。

CMAHのexon7部位に焦点をあて、そこにまず8カ所のsiteを設定し、さらに4カ所に絞り込んだ。

この4カ所を含む遺伝子を約490bpをcloningし、pCAG-EGFP vectorに組み込んだ。(pCAG-EGFP-CMAH(Ex7)作成)

これをCHO細胞に遺伝子導入し、lineを確立した。

設定したKO siteをpX330のBbsI siteに挿入し、この遺伝子を樹立したCHO細胞のlineに対して導入し、48時間後のGFPの発現量を検定した。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する動物愛護上の配慮に関しては、大阪大学の動物実験委員会を通過した上でおこなっている。

検定その他に使うマウスは麻酔時に注射の痛みを伴うが、その後覚醒する事無く安楽死させている。

C. 結果

1. 作製した遺伝子構築。

* 補体制御 + α

C1-INH - DAF - DAF <C1DD>-----
pCAGGS(chick β actin + CMV enhancer) / C1DD

C1-INH - Thrombomodulin - DAF - MCP

<CTDM> --pCAGGS/CTDM 及び pCPI(pig insulin promoter + CMV enhancer)/CTDM

* NK細胞制御 HLA-Ev(147)+humanβ2m---pCAGGS/HLA-Ev(147)-IRES-hβ2m <HLA-E*>-- pCPI/HLA-E*

* 糖鎖抗原の制御 H-D 抗原=pigCMAH の siRNA---H1/siRNA-pCMAH

* PERVの制御 PERVのKD---H1/siRNA-PERV(pol# 1)

2. 新規に作製した遺伝子構築。

* NCTDM < 補体制御 + α□ >

C1-INH – Thrombomodulin – DAF – MCP
<NCTDM> --pCAGGS/NCTDM 及び pCPI(pig insulin promoter + CMV enhancer)/NCTDM---
--昨年の CTDM を改良した

* NK細胞制御 pCAGGS/HLA-Ev(147)-2A-hβ2m <HLA-Ev>-- pCPI/HLA-Ev

* PERVの制御 PERVのKD--U6/siRNA-PERV(pol# 2)

3. マウスでの発現

pCPI/CTDMおよびpCX/HLA-E*をマウスにTGし、それぞれ4匹、2匹のlineを得た。内、2匹、1匹の発現を生後8週令でRT-PCRで解析した（臍臓での発現を1とした）

*CTDM#1：脳（5.41）心（0.19）肺（1.17）胸腺（0.30）肝（0.06）腎（0.13）腸（0.39）脾（1.61）、膵（1）<n=2>

*CTDM#2：心（2.45）肺（7.29）胸腺（9.25）肝（0.03）腎（0.71）脾（14.25）、膵（1）

*HLA-E：脳（2.75）心（70.71）肺（15.48）胸腺（0.17）肝（0.36）腎（1.28）腸（0.30）脾（2.81）、筋（12.86）膵（1）であった。<n=3>

両方のpromoterで臍臓での発現を確かめたが、pCPIの方が相対的に高発現と考えられた。

4. 新規遺伝子の検索：

.CRISPR法の確立。 設定したCMAH(ex7)のoff-

target siteとしては、検索ではN=14で全て0であった。現在、Exon7のbestのtarget siteを決定し、ブタ細胞で効果を検証した。

1). off-target siteの検定。

設定したCMAH(ex7)のoff-target siteとしては、gS01<N12: 23><N13: 2><N14: 0>、gS03<N12: 3><N13: 0><N14: 0>、gAS04<N12: 0><N13: 0><N14: 0> gSA08<N12: 20><N13: 6><N14: 0>であった。

2). Validation in vitro

GFP強度は、gS01がbestと考えられた。

D. 考察

作製したhybrid遺伝子構築に関しては、的を得た分子が、改良の上出来上がったと考えている。in vitroでの発現の確認を終え、動物個体（マウス）での発現を確かめている。

また新しいIKO方法である今回のCRISPH/CS法は、相同組み換え法に比べて、かなり容易にKOできると考えられた。CRISPH/CS法はダブル-KOクローン個体の作出に有効であると判断できた。

E. 結論

超急性拒絶反応克服において、的を得たhybrid遺伝子構築分子が、改良の上出来上がった。

また、CRISPR/CS法は、今後のブタでのKOに有効と考えられた。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. Sci Rep. 3:3355, 2013.

G. 知的所有権の取得状況

特に無し。

