

論 文 要 旨

Enrichment of xenograft-competent genetically modified pig cells using a targeted toxin, isolectin BS-I-B4 conjugate

標的細胞を特異的に破壊する毒素結合イソレクチン「BS-I-B4 複合体」を用いた異種移植対応遺伝子改変ミニブタ細胞の濃縮

赤 坂 恵 理

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

序論 ブタ細胞あるいは臓器をヒトへ移植する、いわゆる異種移植には、最大の関門である超急性移植拒絶 (HAR) を先ず無くすることが必須である。HAR はブタ細胞表面に発現される特定の糖鎖 (α gal epitope ; 異種移植抗原とも呼ばれる) がヒトに存在する α gal epitope に対する自然抗体と反応することで起こる。故に、異種移植を行う前に α gal epitope をブタ細胞から完全に無くす必要がある。そのためには、 α gal epitope を合成する糖鎖合成酵素の発現を gene targeting (KO) 法で抑えるか、 α gal epitope を消化・除去する細菌由来の消化酵素 (endo β -galactosidase C; 略して、EndoGalC と呼ぶ) をブタ細胞膜上で人為的に発現させるという2つの方法が考えられる。この場合、いずれも特定遺伝子の導入による遺伝子改変ブタ細胞の構築が必要となる。具体的には、外来性遺伝子の導入、薬剤による遺伝子導入細胞の選別、遺伝子改変ブタ細胞コロニーの単離という段階を経る。この場合、遺伝子改変ブタ細胞コロニーの単離が重要となる。このコロニーから体細胞核移植により異種移植用遺伝子改変ブタ個体が作製出来るからである。そのためには、ピュアな細胞集団が必要で、そうでない場合、核移植効率は極端に低下する。往々にして、単離したコロニーには非遺伝子導入細胞や KO とは関係のない細胞が混在する可能性が残り、完全に α gal epitope を発現しないピュアな細胞集団を得るには、細胞 (コロニー) の re-cloning 等を行う必要があり、それにはある程度の労力と時間を要する。

歴史的には、このような煩雑な re-cloning を避け、完全に α gal epitope を発現しないピュアな細胞集団を簡便に得るための幾つかの方策が採られて来た。例えば、 α gal epitope を特異的に識別するモノクローナル抗体と補体をを用いた免疫毒性を応用した方法、 α gal epitope を特異的に識別するレクチン (イソレクチン BS-I-B4) と反応させた細胞を磁気ビーズカラムに通し、レクチン非反応性細胞をカラムから回収する方法 (MACS 法)、 α gal epitope 発現細胞と反応しえる細菌由来の toxin A を用いた方法がある。いずれの方法も試薬の入手が困難、回収した細胞にダメージが残る、細胞への特異性が低く、回収効率が落ちる等の難点がある。

目的 我々は試薬が入手可能でより、従来法よりも簡便で迅速な新しい細胞選別方法を模索していた。今回、EndoGalC 遺伝子を導入された鹿児島県産クラウン系ミニブタ由来の胎仔性繊維芽細胞 (PEF) を用い、植物性毒素サポリン (saporin) を結合した BS-I-B4 レクチン (IB4-SAP と呼ぶ) が α gal epitope 発現細胞を死滅に至らしめ、その結果、完全に α gal epitope を発現しないピュアな細胞集団のみを残すかどうかを検討した。

【材料および方法】

EndoGalC 遺伝子を導入された PEF 由来の transfectant (α gal epitope を発現しない細胞と発現する細胞とが混在) をモデルケースとして用いた。この細胞に IB4-SAP を反応させ、その後、その mixture をそのまま培養することにより、 α gal epitope (+) 細胞が除去され、 α gal epitope (-) 細胞のみが残るかどうかを蛍光標識 BS-I-B4 による細胞化学染色、FACS 解析等で解析した。

【結果】

IB4-SAP を作用させた結果、作用後 1 週間内に EndoGalC 遺伝子発現細胞集団から多くの死細胞が生じた。一方、培養皿底面に僅かながら生存する細胞集団も存在した。これら細胞は徐々に増え、その後、この細胞について蛍光標識 BS-I-B4 による細胞化学染色、FACS 解析を行った。その結果、生存細胞のほぼ 100% がレクチン陰性であった。更に、レクチン陰性細胞のイメージ解析から、 α gal epitope レベルは対照となる野生型 PEF 細胞表面におけるそれと比べ、わずか 1-2% 以下であった。この程度の α gal epitope レベルは、異種移植にも耐え得るレベルとされる。

【結論及び考察】

saporin (SAP) という毒素を用いた特定の標的細胞の破壊は、通常 targeted toxin 法と呼ばれ、主に生体内の特定細胞の破壊に用いられて来た。標的細胞表面に発現されるタンパク分子と結合した saporin は、標的細胞膜経由で細胞質内に取り込まれ、タンパク合成系を阻害することで、当該細胞を死滅に導くとされる。今回の研究では、 α gal epitope と特異的に結合する BS-I-B4 イソレクチンと SAP とが結合した conjugate (IB4-SAP) が in vitro で α gal epitope (+)細胞を駆逐し、 α gal epitope (-)細胞のみを残すことが出来るのではないかという発想に基づく。モデルケースとして、EndoGalC 遺伝子を導入された遺伝子改変ブタ細胞を用いて上記可能性を検討した。その結果、最終的に細胞表面から α gal epitope がほぼ完全に消失した細胞を得ることができた。これにより、異種移植時に起こり得る HAR は回避することが出来ると考えられる。しかしながら、 α gal epitope 以外の異種移植拒絶を誘発する別の抗原の存在、HAR 後の抗体の反応、残存補体などによる遅延型拒絶反応の問題は未だ未着手の課題として残る。

今回の方法は、 α gal epitope を本来的に発現するブタ細胞を除去し、遺伝子改変された α gal epitope を発現しない細胞のみを選別するという、いわゆる negative selection に関するものである。序論でも述べたが、 α gal epitope をブタ細胞表面から無くすために遺伝子改変された細胞の集団 (コロニー) を単離しなければならないという操作が常につきまとう。そして、このステップでは、目的の細胞以外の α gal epitope 陽性細胞が混在する可能性が大いにある。本方法は、そのような不必要な細胞の混在を効果的に除く手段として実験現場では今後大いに重宝されるのではないかと思われる。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 95 号		学位申請者	赤坂 恵理
審査委員	主査	小澤 政之	学位	博士 (医学)
	副査	宮田 篤郎	副査	秋山 伸一
	副査	原口 みさ子	副査	古川 龍彦

Enrichment of xenograft-competent genetically modified pig cells using a targeted toxin, isolectin BS-I-B4 conjugate

標的細胞を特異的に破壊する毒素結合イソレクチン「BS-I-B4 複合体」を用いた異種移植対応遺伝子改変ミニブタ細胞の濃縮

ブタからヒトへの移植、いわゆる異種移植には、超急性移植拒絶 (HAR) の発生が大きな障害となる。HAR はブタ細胞表面に発現される特定の糖鎖 (α gal epitope) がヒトに存在する自然抗体と反応することで起こる。故に、異種移植を行うためには α gal epitope をブタ細胞から完全に欠損させる必要があり、そのためには、 α gal epitope を合成する酵素の発現を gene targeting (KO) 法で抑制するか、 α gal epitope を消化するクロストリジウム由来の消化酵素 (endo β -galactosidase C; EndoGalC) をブタ細胞膜上で過剰発現させる処置が必要である。これらの場合、遺伝子導入による遺伝子改変ブタ細胞の構築が必要となる。具体的には、外来性遺伝子の導入、薬剤による遺伝子導入細胞の選別、遺伝子改変ブタ細胞コロニーの単離という段階を経るが、コロニーの単離という最後の段階が特に重要となる。このコロニーから核移植により遺伝子改変ブタ個体が作製出来るからである。そのためには、均一な細胞集団が必要である。そうでない場合、核移植の結果得られる目的のクローンブタの率は極端に低下するからである。均一な細胞集団を得るため、細胞の re-cloning、 α gal epitope に特異的なモノクローナル抗体と補体とを用いた免疫毒性ベースの選別、FACS/MACS による選別、 α gal epitope を結合する細菌性毒素 toxin A による選別等の様々な方法が用いられて来た。しかし、re-cloning 後の細胞増殖が低いこと、抗体、試薬の入手が困難であること、回収した細胞にダメージが残ること、細胞への特異性が甘い等、問題点を幾つか内包している。

今回、申請者らは、新たな選別法を開拓すべく、市販の IB4-SAP に注目した。IB4-SAP は、植物性毒素サポリン (saporin; SAP) を結合させた BS-I-B₄ イソレクチン (IB4) で、IB4 は α gal epitope への結合特異性が高く、一旦結合すると、その複合体は endocytosis により細胞内に取り込まれ、サポリンの作用によりリボソームでのタンパク合成が阻害され、細胞が死に至る。IB4-SAP の効果を検討するため、EndoGalC 遺伝子を導入したクラウン系ミニブタ由来胎仔性繊維芽細胞の transfectant (α gal epitope を発現しない細胞と発現する細胞とが混在) をモデルケースとして用いた。

この transfectant と IB4-SAP とを 2 時間程反応させた後、細胞をそのまま培地に投じ、一ヶ月程培養した。これにより、 α gal epitope (+) 細胞が自然に死滅し、 α gal epitope (-) 細胞のみが残ると予想される。この点を蛍光標識 IB4 による細胞化学染色、FACS、分子生物学的解析等により確認し、以下の知見を得た。

- 1) IB4-SAP を作用させた結果、1 週間内に EndoGalC 遺伝子発現細胞集団から多くの死細胞が生じた。
- 2) 一方、培養皿底面に僅かながら生存する細胞集団も存在した。これら細胞は徐々に増え、生存細胞のほぼ 100% では、その α gal epitope のレベルは対照となる野生型細胞表面におけるそれと較べ、わずかに 1-2% 以下であった。因みに、このレベルは異種移植に耐え得るレベルとされる。

以上の結果より、IB4-SAP を用いた選別法は、異種移植用の α gal epitope 陰性細胞を濃縮するのに効果的であると判明した。

本研究は、 α gal epitope を本来的に発現するブタ細胞を除去し、遺伝子改変された異種移植用の α gal epitope 陰性細胞のみを選別するという、いわゆる negative selection に関するものである。IB4-SAP を用いた本方法は、遺伝子改変された目的のブタ細胞を簡便な方法で純粋に濃縮する有効な方法として、今後、異種移植現場で大いに活用されるものと期待される。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 95 号		学位申請者	赤坂 恵理
審査委員	主査	小澤 政之	学位	博士 (医学)
	副査	宮田 篤郎	副査	秋山 伸一
	副査	原口 みさ子	副査	古川 龍彦

主査および副査の5名は、平成22年1月29日、学位申請者 赤坂 恵理 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) サポリンの構造は知られているのか？リシン (ricin) の場合、A,B鎖に分かれているが。
 (回答) サポリンやリシンは、リボゾーム不活性化タンパクとして分類されているが、リシンはダイマーであるが、サポリンはモノマーである。

質問2) サポリンを介した細胞死誘導の機構は知られているのか？また、サポリンが細胞膜を通過するメカニズムは知られているのか？

(回答) サポリンは本来細胞に結合し得ないため、単独では細胞に害作用はない。しかし、IB4のようなレクチンに結合した、いわゆる IB4-SAP (サポリン結合 BS-I-B4 イソレクチン) は、IB4 自体がブタ細胞膜の α Gal epitope に結合するため、その結果、その複合体は endocytosis により細胞質内に取り込まれ、ゴルジ体を経て、ER (endoplasmic reticulum) に達し、リボゾームの 60S サブユニットを覆う。その結果、そのサブユニットは elongation factor II に結合出来なくなり、タンパク合成が阻害されると考えられている。

質問3) IB4-SAP は α Gal epitope 陽性細胞に細胞死を誘発するが、その機構は判明しているか？例えば、apoptosis は関係しているか？

(回答) そのメカニズムは良く判っていないと思われる。

質問4) 図1で細胞膜を蛍光で標識しており、その蛍光強度に対しイメージ解析を行っているが、これはどのようにやったのか？また、蛍光強度の分類はどのような基準で行ったのか？

(回答) 細胞膜での一番強い蛍光部分と細胞膜外での蛍光強度を割出し、その差を個々の細胞の蛍光強度と位置付けた。この値と対照となる細胞との蛍光強度とを比較し、相対的な強度を割り出した。蛍光強度の分類は、大まかに4つに分けた。分類基準は特にない。異種移植に適する α Gal epitope の発現量は、野生型細胞で発現されるレベルの1-2%以下とされるので、そのレベルを持つ細胞を異種移植に適した細胞として、Extra Low として分類した。

質問5) 遺伝子改変細胞のみを選別するあるいは単離する場合、通常、細胞の re-cloning 法が取られ、例えば、steelリングでコロニーを採取した後、限界希釈法で一個一個の細胞を96-well plateのwell内で培養するが、このような方法はブタ細胞を扱う場合、やられていないのか？

(回答) ブタ細胞の場合、理由は不明だが、一個単独では増殖出来ないことが知られている。また、トリプシン処理にも弱いので、素早くコロニーを採取する必要がある。従来法としてのリング法は時間がかかり、また、多くのコロニーを短時間で採取するのが困難である。そこで、我々は独自に開発した約3-mm角の濾紙をトリプシン液に浸した、いわゆるペーパー法を用いている。これにより、コロニーを細胞へのダメージを極力抑えながら、採取することが出来た。

質問6) EndoGalC 遺伝子を導入したブタ細胞は、長期間その発現は安定しているか？通常は遺伝子の脱落、あるいは epigenetic な修飾を受けて、発現量が変わる場合があるが。

(回答) transfectants を取り、半年以上経た細胞における α Gal epitope の発現を調べたが、そのよう

な発現量の低下は見られなかった。おそらく、マウス細胞に比べ、ブタ細胞の場合、ゲノムに組み込まれた外来性遺伝子の発現が安定しているためと思われる。

質問7) α -1,3-GalT KO ヘテロ細胞から LOH (loss of heterozygosity) 現象で外来性遺伝子がホスト染色体の中に組み込まれた場合、ある細胞では組み込まれた allele の対を成す片方の allele が欠落し、その結果、まれに癌が誘発されるが、ブタではそのような現象はみられないか？

(回答) 全く経験していない。

質問8) 今回、EndoGalC 遺伝子の発現が強い安定株を拾い、 α Gal epitope の消失が確認されているが、 α Gal epitope を作る糖鎖合成酵素 α -1,3-GalT の発現の変化はないのか？

(回答) この株では、EndoGalC により一旦作られた α Gal epitope は直ぐに消化されてしまうので、 α Gal epitope が減少したという状態になっている。しかし、 α Gal epitope を作る α -1,3-GalT の発現は温存されていることを RT-PCR 法で既に確認している。よって、 α -1,3-GalT の発現が低下することはないと思われる。

質問9) 今回、ブタ細胞への遺伝子導入法として Amaxa 社の nucleofection システムを用いているが、これを用いた理由は？

(回答) ブタ細胞への効率的な遺伝子導入はこれまで余り有効な方法が知られていなかったが、nucleofection システムを我々のグループで検討して来た。その結果、80%前後という高い割合で遺伝子導入が可能なのが判明しており、同様の方法を今回の実験で用いた。

質問10) IB4-SAP 処理してから生存細胞が回復するのに一ヶ月もかかっているが、これは細胞の増殖が遅いためか。また、一回の IB4-SAP 処理で α Gal epitope 陰性細胞を得るには十分か？

(回答) ブタ細胞の増殖はマウスのそれに比べ、2-3 倍遅いので、少数の細胞が増えるには一ヶ月ほどかかる。また、先述のように、一旦得られた α Gal epitope 陰性細胞は長期間維持してもその形質は変わらないので、安定していると考えられる。もし、 α Gal epitope 陽性の細胞が出てきたら、再度 IB4-SAP 処理すればピュアな α Gal epitope 陰性細胞集団を得ることが出来ると考える。

質問11) 実際、 α Gal epitope 陰性細胞を核移植したのか？その場合、クローン個体での α Gal epitope の発現は確認しているか？

(回答) 論文には未公表データと記載しているが、実際、農学部家畜繁殖学教室の吉田教授グループの下で核移植を行い、少なくとも胚盤胞期までのクローン胚を得た。個体出産までには至っていない。クローン胚盤胞は、期待通り、 α Gal epitope 陰性であった。従って、数を増やして核移植実験を更に遂行すれば、 α Gal epitope 陰性の出産個体が生まれる可能性がある。

質問12) α Gal epitope の機能はあるか？それが消失したことにより、生体に機能異常などは生じないのか？

(回答) α Gal epitope の先端にある α Gal 残基は無くても異常は生じないとされる。因みに、ヒトや旧世界猿ではそれが無い。また、 α Gal epitope の α Gal 残基を合成する α -1,3-GalT KO マウスでも何ら異常は見られない。しかし、EndoGalC により α Gal epitope を構成する先端から2番目の Gal 残基を消化すると、若干の異常(出生直後の一過的皮膚異常)が生じることが、EndoGalC を過剰発現する transgenic mice の実験から報告されている。

質問13) 実験に用いた EndoGalC 発現細胞は EndoGalC の発現がバラバラないいわゆるモザイククローンを使っているが、そもそも何故、そのようなクローンが取れて来たのか？

(回答) 遺伝子導入後、薬剤耐性コロニーを拾う際、他のコロニーが近接して生えていたため、目的以外の細胞がコンタミしてきたからと思われる。ただ、これが実際、実験には使えるものであったため、返って良かったと思われる。

質問14) EndoGalC の発現量と α Gal epitope の発現量には相関性があるか？

(回答) もし、 α Gal epitope が一旦合成されて、その後、補充されなければ、少量の EndoGalC の発現でも α Gal epitope は直ぐ消失すると考えられる。しかし、 α Gal epitope は常時 α -1,3-GalT により合成されているので、少量の EndoGalC の発現では、 α Gal epitope の減退を誘導することは出来ないだろうと考えられる。従って、 α Gal epitope が消失している transfectants では、同時に EndoGalC の発現が高いと考えられ、EndoGalC の発現量と α Gal epitope の発現量には逆相関性があると考えられる。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。