

免疫・遺伝子エンジニアリングによる臓器移植の未来 NEJM, Dec. 23, 2021

(付けたり：播磨の国風土記)

「僻地で世界最先端」西伊豆健育会病院 早朝カンファ 2022.1 仲田和正

Immune and Genome Engineering as the Future of Transplantable Tissue

NEJM, Dec23, 2021

著者

Jennifer Elisseeff, Ph.D.

Translational Tissue Engineering Center, Johns Hopkins University

Stephen F. Badylak, M.D.

The McGowan Institute of Regenerative Medicine, University of Pittsburgh

Jef D. Boeke, Ph.D.

The Department of Biomedical Engineering, NYU Tandon School of Medicine

NEJM, Dec23, 2021 に「免疫・遺伝子エンジニアリングによる臓器移植の未来」というワクワクするような総説がありました。

その内容は誠に驚くべきものでした。なんと異種（豚、ヒツジ）臓器のヒトへの移植が視野に入ってきたのです。マジすか！！ SF じゃあるまいし、そんなことは急性拒否反応で、はな（端）から無理な話とっていました。

仰天、大興奮の NEJM 臓器移植総説の要点は次の 8 点です。

- ① 超急性拒否反応は α -1-3galactosidase (GGTG1 遺伝子) 等のノックアウトで解決可能！
- ② 組織エンジニアリングによる血管はドナー細胞を取り除いた scaffold に宿主細胞侵入。
- ③ 移植にサイズは重要。iPS による臓器作製は血管を欠き、サイズは数 mm に過ぎない。
- ④ 組織修復に好酸球、マクロファージ、Tregs 関与。Tregs 療法を免疫抑制と共に行う。
- ⑤ ヒトへの異種移植は豚や羊が理想的。臓器のサイズ、形が近く容易に調達可能。
- ⑥ バタの補体と凝固系にもヒト蛋白を発現させヒト免疫系から覆い隠す (cloak)。
- ⑦ Exogenesis：胚盤胞の脾臓発達阻害遺伝子を取り除きマウス・ラット間で異種脾臓が機能。
- ⑧ 2020 年ノーベル化学賞の CRISPR-Cas9 により遺伝子エンジニアリングは極めて容易に。

1. 超急性拒否反応は α -1-3galactosidase (GGTG1 遺伝子) 等のノックアウトで解決可能！

1900 年代初期、犬の腎がヤギの頸部に移植されたのが異種移植 (xenotransplantation) の始まりだそうです。無論、異種の細胞、組織をそのまま移植するのは MHC (major histocompatibility complex) による強い自然免疫、獲得免疫反応を起こしますから超急性拒否反応で生着しません。

ですから異種移植は従来、細胞外マトリックスの使用に留まっていた。細胞外マトリックスであれば免疫原性が低いのでサージカルメッシュ、局所粉末、ハイドロゲルに加工してヘルニアや筋骨格修復、乳房インプラント、組織修復に使用可能でした。これにより組織再建、修復が可能となります。

ところが「超急性拒否反応は動物の細胞表面の炭水化物異種抗原(carbohydrate xenoantigens)、特にGGTG1遺伝子でエンコード(暗号化)されるthe α -1,3-galactosidaseをノックアウトすれば解決できる」と言うのです。ガン！
またN-glycolylneuraminic acidをエンコードする2つの遺伝子CMAHとB4GALNT2も交差反応を減少させます。

そして現実にtriple-knockout pigsではGGTA1, CMAH, B4GALNT2の3つの遺伝子をノックアウトしてブタ細胞表面の炭水化物異種抗原(carbohydrate xenoatigens)を削除したのです。遺伝子削除にも関わらずこのブタは健康であり、またこのブタの腎微小血管表皮細胞に対する抗体をヒトの多くは持ちませんでした。またヒトにこのブタに対する交差反応があっても、同種移植(ヒトからヒト)の場合と同程度であり現在の免疫抑制剤投与で十分対応できると言うのです。

ベートーベンの喜びの歌の「Alle Menschen werden Brüder(すべての人々は兄弟となる)」じゃなくて「Alle Tiere werden Brüder(すべての動物は兄弟となる)」になったのです。隣の犬のハナが親戚に思えてきました。
どうもハナは頭が悪くてもう10年以上になるのにいまだに吠えられます。

triple-knockout pigsに対し交差反応を持つヒトの一部集団(subset)では、ヒトのHLA class1に相当するブタのSLA(swine leukocyte antigen class 1)を認識しているらしくこれを削除する研究も行われています。

Xenotransplantation(異種移植)と言えばギリシャ語でxenophilia(ξένωφιλία)という言葉があります。外国人好きと言う意味です。ギリシャ人は外国人にとっても親切なのです。学生の時、リングフォンで1年間現代ギリシャ語を勉強して夏休みに2週間ギリシャを旅行しました。ギリシャ語で道を尋ねるとひどく驚かれ喜んでくれました。
自宅の食事に招待されたこともありました。
アテネの市場で一番驚いたのは葡萄にスタフィロ(Στάφυλος)と書いてあったことでした。

「すべての動物は兄弟となる」ですが、この総説で下記の論文も注目されていました。

【損傷ドナー肺をブタの肺と全血交差循環させて回復できた】

- Xenogenic cross-circulation for extracorporeal recovery of injured human lungs
Ahmed E. Hozain et al, Nature medicine, 13, July 2020
移植のドナーは外傷患者が多く、ドナー肺は損傷が多く捨てられることが多いのです。

損傷ドナー肺を ECMO により正常体温で 6 時間以上サポートすることは難しいのです。この損傷ドナー肺を取り出して、ヨークシャー豚の肺との 24 時間全血交差循環 (cross-circulation) で回復することができたと言うのです。この方法は ECMO を補完、また臓器バイオエンジニアリングのプラットフォームになるかもしれないそうです。

2. 組織エンジニアリングによる血管はドナー細胞を取り除いた scaffold に宿主細胞侵入。

ヒト臓器の代替として人工心臓などが開発されてきましたが置き換えるまでには至らず、組織エンジニアリング (tissue engineering) による再生医療 (regenerative medicine) が研究されてきました。

しかし再生医療は生体材料 (biomaterial) による scaffold (足場組み)、ステム細胞、前駆細胞、生体シグナル分子の利用が中心でした。

例えば現在、容易に入手可能な (off the shelf: 棚からすぐ取り出せる) 「組織エンジニアリングで作る血管」はドナーの細胞から作ります。ドナー細胞を管状の生体材料 scaffold (足場組み) に移植してバイオリアクターで培養しますが最終的に生きた細胞は取り除きます。出来上がった血管はドナー細胞のない細胞外マトリックスであり、これを移植すると宿主の細胞が侵入してきます。

3. 移植にサイズは重要。iPS による臓器作製は血管を欠き、サイズは数 mm に過ぎない。

臓器移植にそのサイズ (scale) は重要です。

iPS から作る脳、網膜、消化管の organoids (幹細胞から作る試験管内のミニチュア臓器)は免疫拒絶反応を回避でき複雑な臓器に発展します。山中伸弥先生の講演を聞いたのですがなぜ iPS と最初が小文字なのかというと、iPOD をパクったのだそうです。今でも素人の人からは「先生が発見された iPOD 細胞は・・・」と聞かれるそうです。

しかし現在のところ iPS による臓器は血管を欠きそのサイズは数 mm に過ぎませんし、また分化のコントロールが難しいのです。

ただし下記のように 2019 年の Science に 3D バイオプリントによる心臓作成が報告されました。

【コラーゲンの 3D バイオプリントによるヒト心臓の作成 Science, 2. Aug. 2019】

・3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart

Lee A et al, Science, 2Aug 2019 pp482-487

<要約> コラーゲンは細胞外マトリックスであるが心臓の scaffolds (足場) を作るのは困難である。3D-bioprint collagen により hydrogel から心臓と血管を正確に再現した。

ヒト心筋細胞によるこの心室は同期する収縮を起こし、活動電位伝播があり、収縮期ピークに14%の肥厚を起こした。

心筋梗塞に対するマウスでの間葉性幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells :MSCs) 移植では注射による治癒反応がそのメカニズムで、内因性修復機能の動員が組織修復や移植に必要であり免疫系が重要であることを示しています。

移植片対宿主病 (GVH : graft versus host disease) 治療に間葉性幹細胞の使用により骨髄移植での免疫調整、寛容が注目されましたが腎、肝移植では間葉性幹細胞使用による再生医療は悲観的 (tenuous) なのです。

そこで最近の戦略は再生免疫 (regenerative immunology) により宿主の免疫の再プログラミングを行い、macrophage や T-cell に組織修復の促進をさせ、最終的には異種臓器移植 (xenotransplantation) を行うことになってきました。

4. 組織修復に好酸球、マクロファージ、Tregs 関与。Tregs 療法を免疫抑制と共に行う。

移植や組織エンジニアリングで幹細胞 (iPS) に重点が置かれるようになってから免疫系の関心が薄れていました。

しかし幹細胞などが生存、修復を開始するには再生環境を整える必要があります。免疫系は必須 (critical) です。

組織修復過程に関与する細胞は、好酸球、マクロファージ、T細胞です。

好酸球は筋修復の鍵となるサイトカイン、IL-4 を産生し、マクロファージは axolotl (アホロートル : メキシコ山椒魚、変な名前!) の四肢再生に必要であり、T細胞は組織成長やリモデリングに関連するサイトカインや成長因子を分泌します。

Tregs とは regulatory T 細胞のことです。この subset、例えば Foxp3+CD4+ Tregs は移植の免疫寛容、組織修復に関連します。Tregs から免疫を抑制する IL-10、transforming growth factor β 、IL-35 などのサイトカインを放出します。

また他の Tregs、CD4+Th2 細胞は IL-4 等のサイトカインを放出して組織修復を促進します。

Tregs は筋肉内では amphiregulin を分泌して局所で幹細胞動員、新生組織発達を促します。また神経組織では insulin-like growth factor を分泌します。

「多国間 ONE study (A Unified Approach to Evaluating Cellular Immunotherapy in Solid Organ Transplantation)」によると、腎同種移植の後、薬剤治療単独よりも、Treg 療法は標準的免疫抑制とともに行えば安全であり感染も少なくまた1型DM、SLE、炎症性腸疾患でも有望とのことです。Treg で更に抗原特異性を高め、T-cell 受容体エンジニアリング (CAR Tregs) によりその効果は更に高まると思われます。

5. ヒトへの異種移植は豚や羊が理想的。臓器のサイズ、形が近く容易に調達可能。

ヒトの異種移植には豚や羊が理想的なのだそうです。臓器の大きさ、形が似ており容易に調達できるからです。また豚は体細胞核移植技術で designer nuclease、例えば zinc-finger nucleases、transcription activator-like effector nucleases (TALENs)、CRISPR-Cas9 など容易に遺伝子を編集できます。

異種移植では人獣共通感染症 (zoonoses) の危険があります。

しかし豚はヒトより発生が遠いので類人猿より移植臓器による感染が少ないと思われるのだそうです。以前豚舎をみてゾッとしました。丸々と太った豚が少し大きめの棺桶くらいのサイズの檻に居たのです。向きを変えることもできません。拷問のようにひたすら餌を食べ同じ格好で寝ることしかできないのです。

「ブタ (A) の臓器をヒト (B) に移植するにあたりテストステップとして類人猿 (C) を追加することにより果たして移植はより容易になるのか？」という疑問があります。ヒトと類人猿の免疫系も異なるのであり類人猿 (C) の追加によりますます問題が複雑化するのではないか、と言うのです。

類人猿と言えば以前、別府の高崎山に行きました。

ここではニホンザルを餌付けしています。へーと思ったのは、日中の餌は米や麦を撒くのです。サルはこれを一粒ずつ拾って食べています。最後、夕方になると初めてサツマイモを撒き、サルは満腹になって山へ帰っていきます。昼間にサツマイモを撒くとすぐ山へ帰ってしまい観光にならないのです。サルは走りながらウンコをしていました。危うく小生も靴の上にされるところでした。

ヒトも大古の時代はこんなだったのかなあと情けなく思いました。

「なんだこりゃ？」と思ったのは「播磨 (はりま) 国風土記」です。

風土記は 713 年 (和銅 6 年) に朝廷が全国に編纂を命じました。ただし完全に残っているのは出雲国風土記のみで、播磨国、肥前国、常陸国、豊後国は一部が欠損しています。地名、産物、土地の肥沃さ、地名の起源、その地の伝説の 5 つの記載を命じました。地名を付ける時はできるだけ良い地名を付けよと命じています。西伊豆にも安良里 (あらし) という古代からの地名があります。

姫路市の北方、塙 (はに) 岡の地名の由来を説明しているのですが昔、大汝命

(おおなむちのみこと) と小比古尼命 (すくなひこねのみこと) が争って、

「粘土 (塙 : はに) の荷をかついで遠く行くのと、排便を我慢して遠く行くのと、どちらがよくできるだろうか」と妙なことで争いました。

そこで大汝命は排便を我慢して歩き、小比古尼命は粘土の荷を持って競争しました。

そしたら大汝命はついに我慢ができなくなり排便しその後、小比古尼命は実は自分も辛かったと粘土を捨てました。そこでその地を壟（はに）岡と言うのだそうです。また大汝命は排便したとき笹がその便を弾き上げて衣に付きました。そこでそこを波自賀（はじか）の村と名付けたと言うのです。たぶん剽軽（ひょうきん）な父親が子供に語ってそれが大真面目に伝わったのでしょう。

昔、学生の時、拓殖大学空手部が高尾山徹夜行脚をやるというので、我々自治医大空手部も筑波山徹夜行脚（学生寮から 50 km くらい）をやってみようと言う事になりました。最近、学生に聞いて驚いたのは 40 年以上経った今でもまだやっていると言うのです。今は、空手部、剣道部、柔道部合同の行事だそうです。いったい何でまたこんなことをするのかとても疑問だったそうです。うっかり始めるととんでもないことになりますなあ。

小生の父親が神宮皇學館という神主を養成する大学の出身だったのですが、昭和 12 年（1937）に第 1 回東海学生連盟駅伝競走（熱田神宮-伊勢神宮間）が開催されその第 1 回から 4 回まで選手として参加しました。第 4 回（1940）では優勝しています。父が生きていたころテレビで東海駅伝をやっていると言ったところ、まだ続けていることを知らなくてひどく驚き懐かしそうに見入っていました。

どこを走ったのか尋ねたところ伊勢大橋-名古屋昭和橋、津市市役所-白子郵便局、白子-四日市などだったとのことでした。東海学生駅伝対校選手権大会は昨年 2021 年で第 83 回です。昔は伊勢スタートで名古屋ゴールでしたが、今は逆向きです。

6. ブタの補体と凝固系にもヒト蛋白を発現させヒト免疫系から覆い隠す (cloak)。

ブタ臓器に対する免疫反応を少なくするもう一つ的手段は補体や凝固系のエンジニアリングです。これにはブタの補体や凝固系の表面抗原に、補体反応の下流を制御する (down-regulate) ヒト蛋白を発現させヒト免疫系から覆い隠す (cloak) のだそうです。ヒト補体を制御する蛋白はヒト補体系と共に進化したものですから、ヒト補体蛋白はブタ補体蛋白よりより効果的に補体反応を制御できると期待されます。

これらの蛋白には CD55 (complement decay-accelerating factor)、CD59 (membrane attack complex-inhibitory protein)、CD46 (complement regulatory protein) があります。TNF (tumor necrosis factor) α もブタ異種移植の急性血管拒否反応に関与します。CD47 signal protein も「私を食べないで (don't eat me)」のメッセージを送ります。

過去 10 年、ヒトで特に膜蛋白の CD (cluster of differentiation) family のヒト遺伝子の分析が行われています。

【形質転換蛋白 (transgenic protein) の候補】

- i) Immune cloaking (覆い隠す) : 形質転換蛋白により natural killer (NK) や T 細胞の殺能力を阻害する。
- ii) Complement humanization: ブタの補体系をヒト化する
- iii) Coagulation humanization ; ブタの凝固系をヒト化する。

7. Exogenesis: 胚盤胞の膵臓発達阻害遺伝子を取り除きマウス・ラット間で異種膵臓が機能。

この総説で非常に注目されていたのが東大医科研からの Cell (小林俊寛氏 2010) と Nature (山口智之氏 2017) の二つの論文です。ラット内でマウスの膵臓を作り、また糖尿病マウス内でラット膵島が 1 年以上機能したのです。これを「exogenesis」と言います。

小生、ラットもマウスも鼠 (ネズミ) だと思っていたのですが、ラットはドブネズミを品種改良して作られた大型のネズミ、マウスはハツカネズミを改良して作られた小型のネズミで異種なのだそうです。英語圏では大きいネズミは汚らしいイメージ、小さいネズミは可愛らしいイメージとのことです。ミッキーマウスは小さなハツカネズミだったのですね。

CT で中脳はミッキーマウスに見えます (耳が大腦脚) が小生「ミッキーマウスはチュウチュウ鳴くから中脳だ」と覚えております。そう言えば昔、「三木さん (三木武夫首相 1907-1988) が亡くなったんだって」と朝、食卓で家内に言ったところ横にいた娘に「えっ、ミッキーさんが亡くなったの?」と聞かれました。

【ラットの膵臓がマウス内で作製できた】

- Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells, Kobayashi T, et al, Cell 2010;142:787-99
ラットの膵臓をマウス内で作ることができた。ラットの幹細胞をマウスの胚盤胞 (blastocysts) に注入。マウスの胚盤胞 (blastocysts) では膵臓発達を阻止する遺伝子 Pdx1^{-/-}を変異させておいた。

【糖尿病ラット内でマウスの膵島が 1 年以上機能した】

- Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. Yamaguchi T, Nature 2017;542:191-6
マウスの iPSCs を Pdx1^{-/-}の糖尿病ラットに移植、移植後 5 日間免疫抑制はなく、膵島を作り血糖は正常化し膵島は 1 年間機能した。

胚盤胞 (blastocysts) は卵子に精子が受精して5日目、着床前に形成される70-100個の細胞を有する構造で身体のあらゆる細胞に分化する能力を持ちます。
この細胞を取り出し培養したのがES細胞です。

従来の Xenotransplantation は例えばブタの腎で遺伝子の免疫エンジニアリングによりブタの抗原を削除、ヒトの遺伝子を導入 (transgene) 、発現させます。
できた腎の殆どはブタ遺伝子由来ですが一部ヒト遺伝子で置き換わります。

一方 Exogenesis は前もってブタの胚盤胞 (blastocyst) でヒト遺伝子導入を行って抗原を削除しておきます。
そして患者細胞からヒト幹細胞 (iPSCs : induced pluripotent stem cells) を作成しこれをブタの blastocyst (胚盤胞) 内に注入しキメラの腎臓を作らせてこれを患者に移植します。
ですから実際はほとんどブタでなくヒト臓器です。
exogenesis は安全、実用的、安価です。

8. 2020年ノーベル化学賞のCRISPR-Cas9により遺伝子エンジニアリングは極めて容易に。

異種移植に革新的なステップアップとなったのが、2013年発表、2020年ノーベル化学賞を受賞したCRISPR-Cas9の技術です。
この技術によりいかなる遺伝子も簡単迅速安価、高い確率でノックアウト、またはノックインが可能となったのです。
DNA二本鎖を切断してゲノム配列の任意の場所を削除、置換、挿入できるのです。

下記が2020年ノーベル化学賞のプレスリリースです。

<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>

(Press release: The Nobel Prize in Chemistry 2020)

Emmanuelle Charpentier と Jennifer A. Doudna

「Genetic scissors である CRISPR/Cas9 の発見による業績」

受賞者の Emmanuelle Charpentier はベルリンの Max Planck 研究所の研究者です。
以前、ベルリンに行った時、市街を歩いていたらこの研究所がありました。
最先端の研究所だと思っていたのにごく普通の古ぼけたビルだったのは意外でした。

CRISPR とは「Clustered regularly interspaced short palindromic repeats」の略です。
Palindrome とは回文 (山本山みたいに前後どちらから読んでも同じ文) のことです。
Cas とは CRISPR associated のことです。

これは化膿性連鎖球菌 (streptococcus pyogenes) で発見された免疫システムで、連鎖球菌に侵入したウイルスやプラスミドを標的として排除、獲得免疫を得ます。
ガイド RNA (gRNA) と蛋白分解酵素である Cas9 から構成されます。

gRNA は標的とする DNA 配列を探して認識して結合、Cas9 が DNA の二本鎖を切断し自分の CRISPR 座位に取り込みます。新たに同一の DNA が侵入すると CRISPR 座位に取り込まれたスペーサーDNA が cr (crisper) DNA 形態をとって発現しこの二つの DNA が複合体を形成し DNA 崩壊を誘導します。

ただし Cas9 が DNA 切断を行うには標的 DNA 配列の近くに PAM と呼ばれる特定配列が必要です。Cas9 の場合の PAM 配列は NGG の 3 塩基 (N は A, T, G, C のどの塩基でもよい) です。切断したあとはそのままにすると細胞は自分で DNA を修復しますがたいていその機能は失われます (knock out)。

新たに DNA 配列をここに挿入 (knock in) することもできます。

ブタ臓器のヒトへの移植で、豚のレトロウイルス (PERVs : porcine endogenous retrovirus sequences) がヒト組織培養細胞に侵入する危険があります。

このリスク回避に CRISPR-Cas9 技術が導入されブタ腎細胞 PK15 遺伝子の 62 個の PERV copies の消去が行われました。

それでは NEJM 臓器移植総説、重要点 8 の怒涛の反復です。

- ① 超急性拒否反応は α -1-3galactosidase (GGT1 遺伝子) 等のノックアウトで解決可能!
- ② 組織エンジニアリングによる血管はドナー細胞を取り除いた scaffold に宿主細胞侵入。
- ③ 移植にサイズは重要。iPS による臓器作製は血管を欠き、サイズは数 mm に過ぎない。
- ④ 組織修復に好酸球、マクロファージ、Tregs 関与。Tregs 療法を免疫抑制と共に行う。
- ⑤ ヒトへの異種移植は豚や羊が理想的。臓器のサイズ、形が近く容易に調達可能。
- ⑥ ブタの補体と凝固系にもヒト蛋白を発現させヒト免疫系から覆い隠す (cloak)。
- ⑦ Exogenesis : 胚盤胞の膵臓発達阻害遺伝子を取り除きマウス・ラット間で異種膵臓が機能。
- ⑧ 2020 年ノーベル化学賞の CRISPR-Cas9 により遺伝子エンジニアリングは極めて容易に。