

臨床応用可能な3種異種抗原ノックアウトブタを用いた カニクイザルへの異種腎移植の長期正着例における生理学的機能

マサチューセッツ総合病院移植外科，北海道大学病院泌尿器科

広瀬 貴行

Takayuki HIROSE



1. はじめに

臓器移植のドナー不足は世界的に深刻であり，ブタを用いた異種移植の実現に期待が高まっている¹⁾。ブタの腎臓はサイズ，構造がヒトと類似しており，また，食用として長らく用いられてきたことから，倫理的にも最も適した異種移植ドナーモデルであると考えられている。これまでサルへの異種移植による実験が行われてきたが，clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR-associated protein 9 (Cas9) による遺伝子改変技術により，異種移植の成績が飛躍的に改善してきている。サルの実験モデルにおいては，最近では数百日を超える生着率が複数のグループから報告されている^{2)~4)}。特に，長期生着が得られたドナーブタはこれまで，異種移植の実現を阻む障壁である3種類の異種抗原 (α Gal, Neu5GC, Sd^a) のうち， α Gal 抗原のみを排除したものが用いられてきた。しかし，異種抗原を3種類ともノックアウトしたトリプルノックアウト (triple knockout, TKO) がヒトの自然抗体との反応が最も小さいため，TKOブタが臨床応用に最も適している^{5),6)}。

一方で，サルなどの霊長類は，TKOブタに対するIgM抗体が高値であるため，1~2種類のノックアウトブタよりも生着期間が著明に短いことが問題であった^{7)~9)}。しかし，筆者の所属していたマサチューセッツ総合病院 (MGH) のKawai研究室では，eGenesis社の作製した複数のヒト化蛋白を発現したTKOブタを用いて，世界で初めて300日を

える長期生存を得ている²⁾。ただし，長期生着が可能となったものの，分子レベルの不適合があるため，移植腎の生理学的機能が正常に作用するかについてはまだ明らかになっていない。本稿では，TKOブタを用いて長期生着が可能となった異種腎移植について，生理学的な作用に焦点を絞り，MGHのKawai研究室での成果を中心に最新の知見を紹介する。

2. 移植腎生着期間と腎機能の推移

ドナーにはeGenesis社により作製された，ヒト化補体制御蛋白およびヒト化免疫・炎症抑制蛋白，ヒト化凝固抑制蛋白をCRISPR/Cas9を用いて移入したTKOブタを用いた。レシピエントにはすべてカニクイザルを用い，腎移植時に両側自己腎を摘出した。また，導入免疫抑制薬は抗胸腺腺グロブリン (5 mg/kg) を移植前日と当日に，抗CD20モノクローナル抗体 (20 mg/kg) を前日までに1回投与し，術後は60日ごとに投与した。維持免疫抑制薬として，抗CD154抗体 (20 mg/kg) を1~2週に1回，ミコフェノール酸モフェチル (100 mg/body/day) を投与した。タクロリムスまたはラパマイシンを移植後2ヶ月まで投与し，コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウムを1ヶ月後まで投与した。実験は60日以上生存したレシピエント17匹を対象とした。腎移植後の生存期間中央値は207日 (64~648日) であり，生存期間最長例を含む5匹は評価時点で生存中であった (図1a)¹⁰⁾。移植腎機能として，Crの推移を見ると，ほとんどの症例が1.5 mg/dl以下で安定して推移していた (図1b)¹⁰⁾。異種移植腎は，サルの体内で長期にわたり正常に機能し得ることが示された。

■ 著者連絡先

北海道大学病院泌尿器科

(〒060-8638 北海道札幌市北区北15条西7丁目)

E-mail. hiroset.aka.yuki@me.com

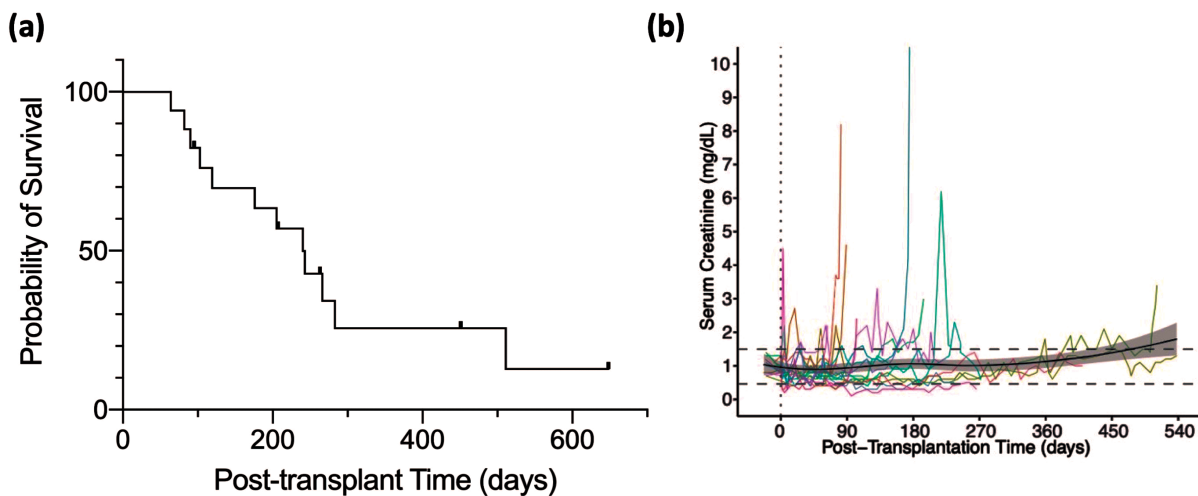


図1 レシピエント17匹の移植腎生着率と腎機能の推移(文献10より転載)

3. 電解質および骨ミネラル代謝

続いて、TKOブタによる異種移植腎が電解質に与える影響について評価を行った。ナトリウムおよびカリウム、クロールは、移植腎が正常に機能しているレシピエントにおいては、概ね正常範囲内であった(図2a~c)¹⁰⁾。一方で、移植後30日目までに82%のレシピエントが高カルシウム血症を呈しており、さらに35%に14 mg/dlを超える高度の高カルシウム血症を認めたが、尿中のカルシウム濃度は、移植前と比較して有意な低下を認めなかった(図2d, f)¹⁰⁾。また、88%のレシピエントが移植後30日目までに低リン血症を認め、尿中リン濃度は、移植後30日以内では上昇しているものの、30日以降では移植前と同等まで低下していた(図2e, g)¹⁰⁾。

さらに、副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone, PTH)、活性化型ビタミンD₃であるカルシトリオールおよび、活性化型ビタミンD₃の前駆体であるカルシフェディオールについて、同様に移植前後での比較検討を13例のレシピエントにおいて行った。その結果、カルシトリオールとカルシフェディオールは移植後も有意差を認めなかったが、PTHは移植後に全例でほぼ0 pmol/mlを示していた(図3a~c)¹⁰⁾。これは、高カルシウム血症に対する負のフィードバックの結果と考えられる。また、PTH関連蛋白は検出されなかった(図3d)¹⁰⁾。PTHまたはドナー腎から分泌される未検出のPTH様蛋白による骨吸収促進の可能性を考え、骨吸収マーカーであるI型コラーゲン架橋C-テロペプチド-β異性体を移植前後で比較したところ、むしろ移植後に同数値が低下しており、移植後の骨吸収は低下していることが示された(図3e)¹⁰⁾。さらに、移植後511日まで生

存したレシピエントのサルへの剖検にて、副甲状腺の組織学的評価を行ったところ、低形成や過形成といった組織学的な異常は認められなかった。

臨床における腎移植患者においては、移植前は末期腎不全状態であり、通常は低カルシウム血症と高リン血症を呈しており、そのため二次性の副甲状腺機能亢進症が起きやすい。一方で、この研究モデルでは、レシピエントのサルは健康であるため、骨栄養や電解質異常についての結果をどの程度、臨床に当てはめられるかは今後の課題である。

高カルシウム血症と低リン血症については、他施設からの異なる遺伝子改変ブタを用いた報告でも同様の傾向が認められているものの、その原因は明らかにはなっていない^{11),12)}。

4. レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系

また、腎臓の重要な機能の1つにレニンの分泌によるレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)を介した血圧調節機構があるが、ブタの腎臓から産生されるレニンはヒトでは作用せず、サルなどの霊長類でも反応低下が起こることが報告されている^{13)~16)}。そこで、前述と同様のレシピエントのサルにおいて、血漿レニン活性(plasma renin activity, PRA)、血漿アルドステロン濃度(plasma aldosterone concentration, PAC)を移植前後で比較した。PRAは移植前に500~1,400 pg/ml/6hrであったのが、移植後90日目では4.3%まで低下し、PACも移植後には移植前に比較して有意に低下していることが確認された(図4)¹⁰⁾。いずれのサルにおいても、臨床的に血圧低下を来した症例は認めなかった。これらの結果は臨床応用に向けて非常に重要で

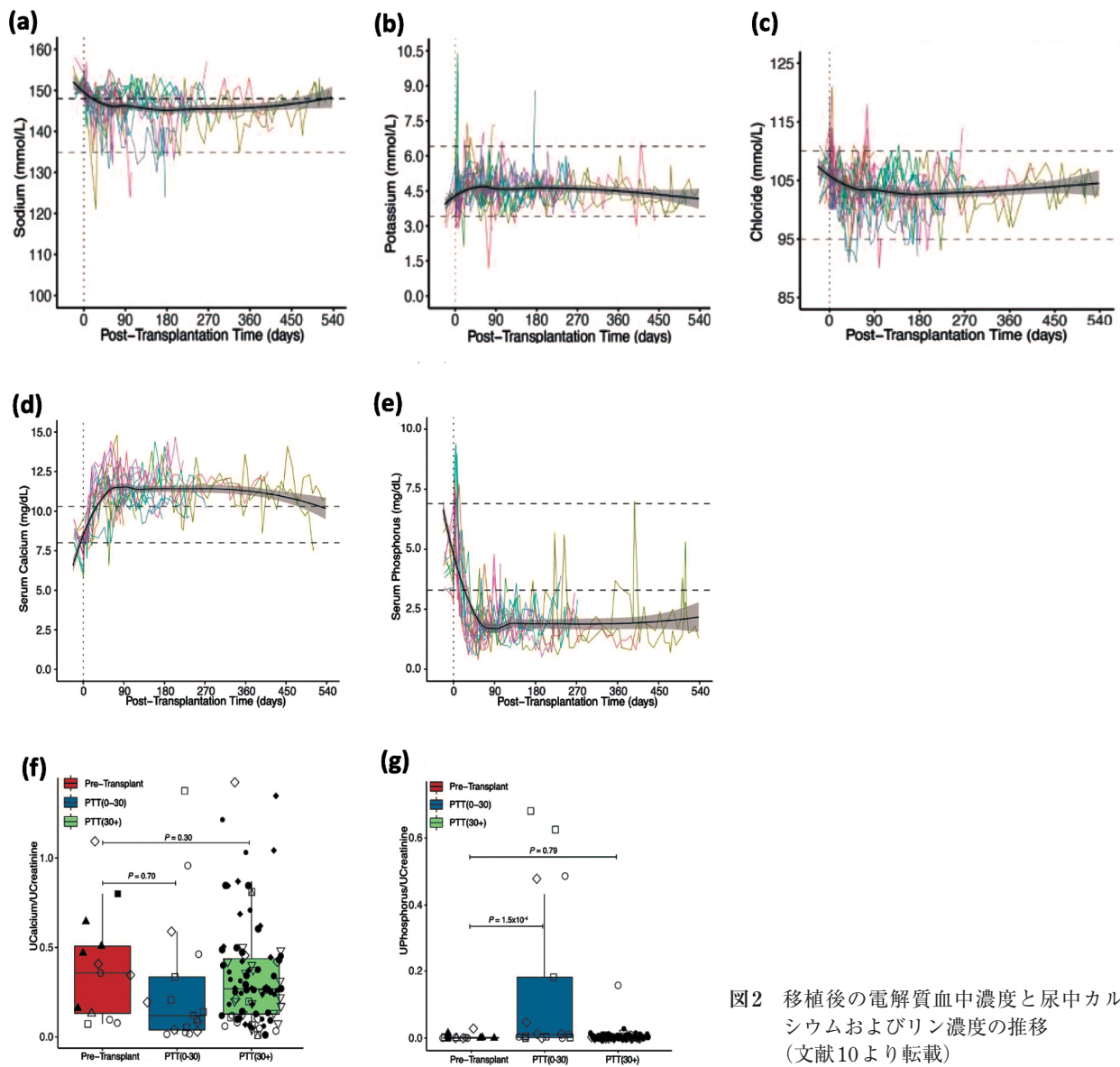


図2 移植後の電解質血中濃度と尿中カルシウムおよびリン濃度の推移 (文献10より転載)

あるものの、実際に腎移植を要する末期腎不全患者では高血圧を呈しており、TKOブタの腎臓から分泌されるレニンがヒトのRAASに作用しないことへの懸念は低いと考えられる。

5. 移植後の腎臓の増大

また、異種腎移植のもう1つの問題点として、ブタの移植腎がレシピエントの体内で増大することが挙げられる。前述と同様のレシピエントにおいて、超音波検査を用いて移植腎の長軸方向を測定したところ、実測値と変化率はともに統計学的に増加傾向を認めなかった(図5)¹⁰⁾。固定効果モデルによる解析を行ったところ、統計学的に有意な増大傾向を認めたが、1ヶ月あたり0.4 mmおよび0.7%の

みの増大であった。これは、最大で50~250%の増大を認めたというこれまでの報告に比較して、著明に低値である^{4),12),17)}。Tanabeらによると、レシピエントの体内で成長した移植腎は、限られた腹腔内スペースを超えて成長すると、圧迫されることにより、移植腎血流が低下した結果、移植腎機能低下を招くこともある⁴⁾。しかし一方で、移植後の腎臓サイズの増加を認めないという報告もある³⁾。そのため、成長ホルモン受容体をロックアウトしたブタからの異種腎移植も試みられ、その成果が待たれている¹⁸⁾。

6. まとめ

このように、臨床応用可能な遺伝子改変ブタからカンクイザルへの異種腎移植モデルの長期生着症例において、

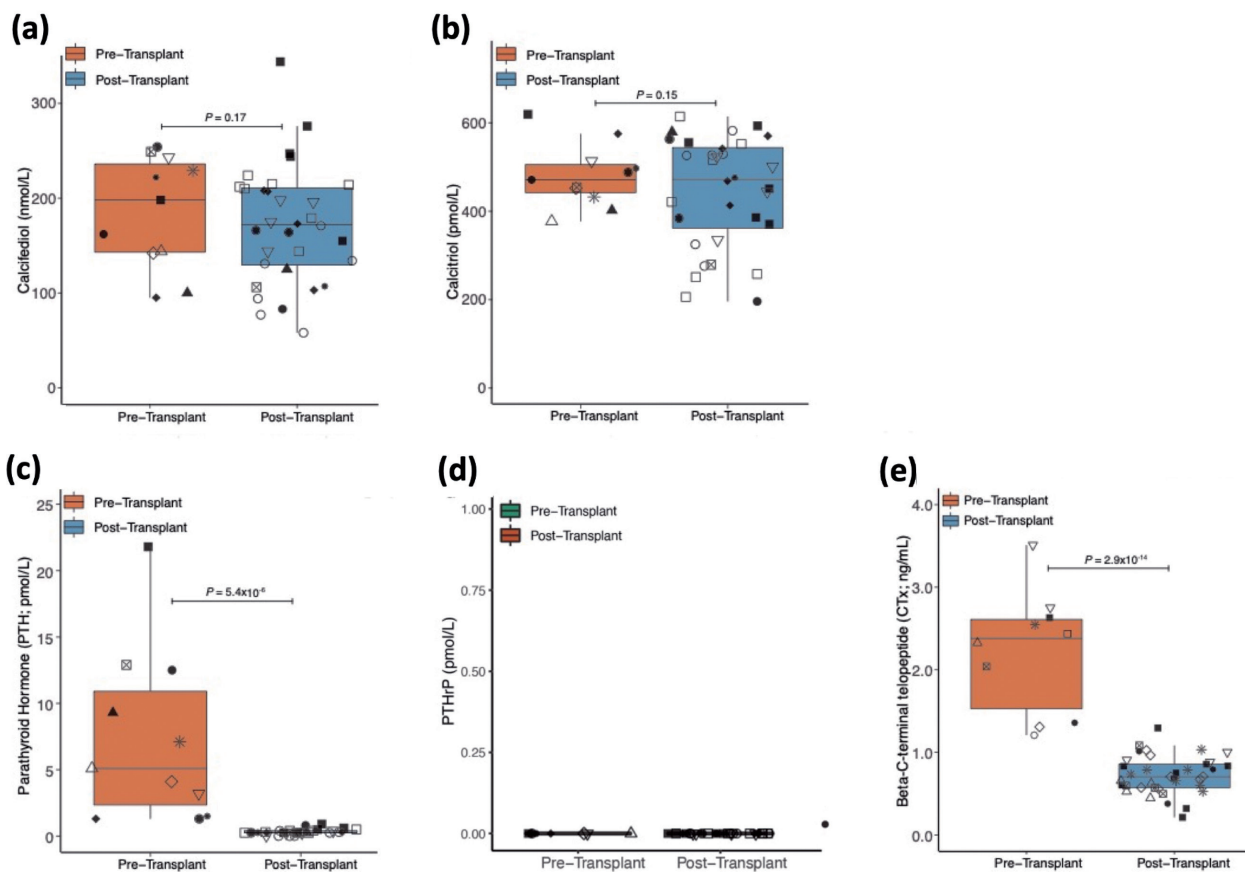


図3 移植前後の骨栄養代謝関連マーカーの比較 (文献10より転載)

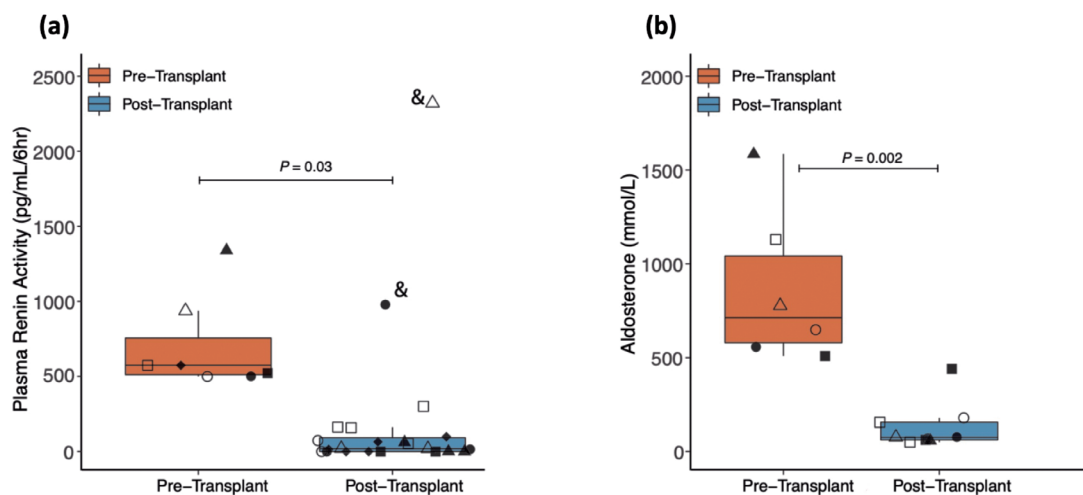


図4 移植前後の血漿レニン活性とアルドステロン濃度の比較 (文献10より転載)

①ナトリウム、カリウム、クロールは正常に推移し、②PTH非依存性に高カルシウム血症と低リン血症を認め、③ブタの移植腎はRAASにはほとんど作用せず、④移植腎の増大は最小限に留まることが示された。そもそも、サルを用いた前臨床段階で長期生着を得ることがこれまでの異種移植にお

ける大きな課題であったため、長期生着を得たサルにおける生理学的作用についての報告はこれまでほとんどなかった。これらの詳細な解析結果により、ヒトに対する遺伝子改変ブタを用いた異種腎移植の臨床応用を開始するにあたり、より適切な臨床研究デザインが可能となるであろう。

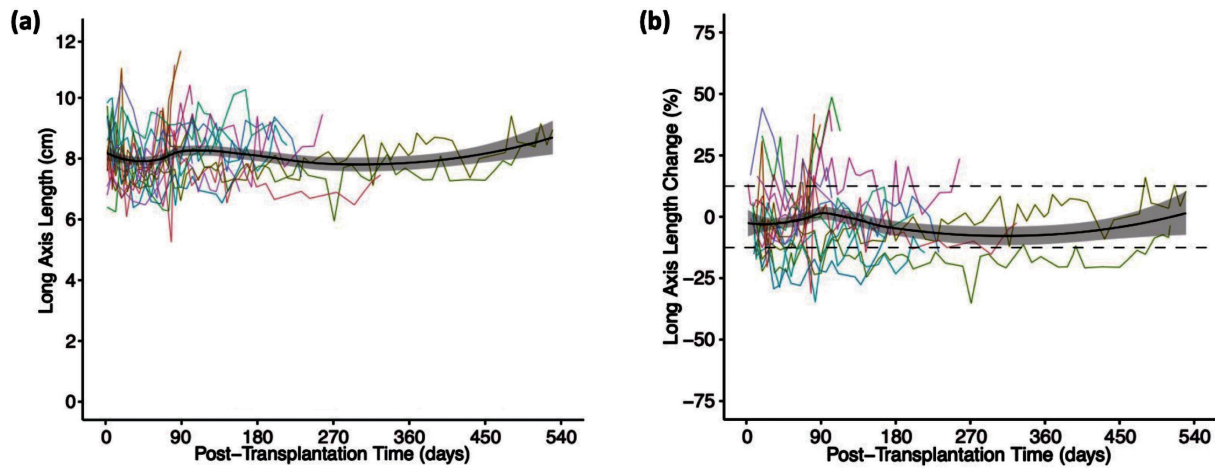


図5 移植後の腎臓の長軸長の推移 (文献10より転載)

謝辞

マサチューセッツ総合病院移植外科の河合達郎先生, Grace Lassiter先生, 同院病理部のRobert Colvin先生, Ivy Rosales先生, 同院移植センターのメンバー, eGenesis社のMike Curtis氏, および同社の皆様に心より感謝申し上げます。

利益相反の開示

広瀬貴行:【研究費・寄附金】eGenesis社。

文献

- 1) Cooper DKC, Gaston R, Eckhoff D, et al: Xenotransplantation-the current status and prospects. *Br Med Bull* **125**: 5-14, 2018
- 2) Ma D, Hirose T, Lassiter G, et al: Kidney transplantation from triple-knockout pigs expressing multiple human proteins in cynomolgus macaques. *Am J Transplant* **22**: 46-57, 2022
- 3) Kim SC, Mathews DV, Breeden CP, et al: Long-term survival of pig-to-rhesus macaque renal xenografts is dependent on CD4 T cell depletion. *Am J Transplant* **19**: 2174-85, 2019
- 4) Tanabe T, Watanabe H, Shah JA, et al: Role of Intrinsic (Graft) Versus Extrinsic (Host) Factors in the Growth of Transplanted Organs Following Allogeneic and Xenogeneic Transplantation. *Am J Transplant* **17**: 1778-90, 2017
- 5) Estrada JL, Martens G, Li P, et al: Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking GGTA1/CMAH/ β 4GalNT2 genes. *Xenotransplantation* **22**: 194-202, 2015
- 6) Martens GR, Reyes LM, Li P, et al: Humoral Reactivity of Renal Transplant-Waitlisted Patients to Cells From GGTA1/CMAH/B4GalNT2, and SLA Class I Knockout Pigs. *Transplantation* **101**: e86-92, 2017
- 7) Adams AB, Kim SC, Martens GR, et al: Xenoantigen

- Deletion and Chemical Immunosuppression Can Prolong Renal Xenograft Survival. *Ann Surg* **268**: 564-73, 2018
- 8) Yamamoto T, Iwase H, Patel D, et al: Old World Monkeys are less than ideal transplantation models for testing pig organs lacking three carbohydrate antigens (Triple-Knockout). *Sci Rep* **10**: 9771, 2020
- 9) Ariyoshi Y, Takeuchi K, Pomposelli T, et al: Antibody reactivity with new antigens revealed in multi-transgenic triple knockout pigs may cause early loss of pig kidneys in baboons. *Xenotransplantation* **28**: e12642, 2021
- 10) Firl DJ, Lassiter G, Hirose T, et al: Clinical and molecular correlation defines activity of physiological pathways in life-sustaining kidney xenotransplantation. *Nat Commun* **14**: 3022, 2023
- 11) Soin B, Smith KG, Zaidi A, et al: Physiological aspects of pig-to-primate renal xenotransplantation. *Kidney Int* **60**: 1592-7, 2021
- 12) Iwase H, Hara H, Ezzelarab M, et al: Immunological and physiological observations in baboons with life-supporting genetically engineered pig kidney grafts. *Xenotransplantation* **24**: 10.1111/xen.12293, 2017
- 13) Sen S, Hirawawa K, Smeby RR, et al: Measurement of plasma renin substrate using homologous and heterologous renin. *Am J Physiol* **221**: 1476-80, 1971
- 14) Wang W, Liang TC: Substrate specificity of porcine renin: P1', P1, and P3 residues of renin substrates are crucial for activity. *Biochemistry* **33**: 14636-41, 1994
- 15) Iwase H, Yamamoto T, Cooper DKC: Episodes of hypovolemia/dehydration in baboons with pig kidney transplants: A new syndrome of clinical importance?. *Xenotransplantation*. **26**: e12472, 2019
- 16) Hansen-Estruch C, Bikheth MH, Javed M, et al: Renin-angiotensin-aldosterone system function in the pig-to-baboon kidney xenotransplantation model. *Am J Transplant* **23**: 353-65, 2023
- 17) Cooper DKC, Hara H, Iwase H, et al: Clinical Pig Kidney Xenotransplantation: How Close Are We?. *J Am Soc Nephrol* **31**: 12-21, 2020
- 18) Iwase H, Ball S, Adams K, et al: Growth hormone receptor knockout: Relevance to xenotransplantation. *Xenotransplantation* **28**: e12652, 2021