

## 異種移植の臨床応用に向けての課題整理 —臓器ドナーブタの生産に焦点を当てて—

明治大学バイオリソース研究国際インスティテュート

長嶋 比呂志

Hiroshi NAGASHIMA



### 1. 臓器ドナーとしての遺伝子改変ブタの開発の現状

2022年に米国のメリーランド大学のグループが、10種の遺伝子を改変したブタ (10-GM pig) の心臓を世界で初めてヒトに移植した<sup>1)</sup>。10種の遺伝子改変 (GM) の内容は、4種のブタ遺伝子のノックアウト (KO) と6種のヒト遺伝子の導入である。KOの対象となったのは、異種抗原性に関わる3種の遺伝子 (*GGTA1*, *CMAH*, *B4GALNT2*) と、ブタの臓器のサイズ (体格) の制御に関わる成長ホルモン受容体 (*GHR*) 遺伝子である。一方、導入された6種のヒト遺伝子 (transgene) は、補体制御 (CD46, CD55), 血液凝固制御 (THBD, PROCN), マクロファージ活性抑制 (CD47), アポトーシス・炎症制御 (HMOX1) などに関わる因子を発現する (詳細については今号の本特集で広瀬による「臨床応用可能な3種異種抗原KO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」を参照)。

同グループは、この10-GM pigの開発に先立ち、3種のGM (*GGTA1*-KOおよびヒト CD46/CD55 遺伝子導入) を施したブタ (3-GM pig) の心臓が、ヒトへの異所性移植後に945日間生着し得たことを報告していた<sup>2)</sup>。異種心移植の目的が、現段階ではヒト臓器の提供が実現するまでの橋渡しとされていることや、同種心移植の対象から除外される末期心不全患者が存在することを鑑みると、非ヒト霊長類への移植で3年弱の生着実績を残した3-GM pigをさらに改良した10-GM pigで臨床応用が開始されたことは納得できる。換言すれば、今後の異種移植の臨床応用においては、10種あるいはそれ以上の遺伝子を改変したブタの利用が

標準になるものと思われる。

メリーランド大学の心移植に用いられたのは、Revivicor社が開発したGMブタである。米国ではeGenesis社も同様のGMブタを開発し、臨床応用を進めている<sup>3)</sup>。複数のGMブタの作製には、体細胞クローニング技術が有効である。図1Aに示すように、複数の遺伝子を改変した胎仔線維芽細胞などの初代培養細胞 (核ドナー細胞) の核を、ブタ卵子の細胞質中に移植することによってクローン胚を作り、それらを借り腹雌の子宮に移植して受胎させ産仔を得るのが体細胞クローニングのプロセスである。GMに初代培養細胞を用いるのは、ブタでは実用に供し得るES細胞 (embryonic stem cell) やiPS細胞 (induced pluripotent stem cell) が樹立されていないためである。複数遺伝子のKOと導入を併せ持った個体を作る場合、体細胞クローニングの工程を繰り返すことになる (図2)。例えば、1つの遺伝子をKOした細胞を樹立した後、体細胞クローニングによって胎仔を作製し、その胎仔から新たに初代培養細胞を樹立する。初代培養細胞はGMプロセスにおける限界希釈や継代培養を経て疲弊するので、一旦クローン胎仔を作製して新たに初代培養細胞を樹立することで、細胞の若返り (rejuvenation) を図るのである。この若返り細胞を用いて、2回目以後の標的遺伝子のKOと必要な遺伝子の導入を行うことができる。3~4種の内在性遺伝子のKOと数種~10種程度の遺伝子の導入は、反復クローニング技術 (図2) を用いて実行可能である。遺伝子導入の際は、複数の導入遺伝子をパッケージ化して細胞染色体の1ヶ所に組み込む技術が必要である<sup>3)</sup>。

このように、複数の遺伝子が操作されたブタ (多重GMブタ) の作製は体細胞クローニング技術の応用によって実現可能であるが、体細胞クローニングの反復には限界があるようである。体細胞クローニングの過程で生じるエピ

#### ■ 著者連絡先

明治大学バイオリソース研究国際インスティテュート  
(〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1)  
E-mail. hnagas@meiji.ac.jp

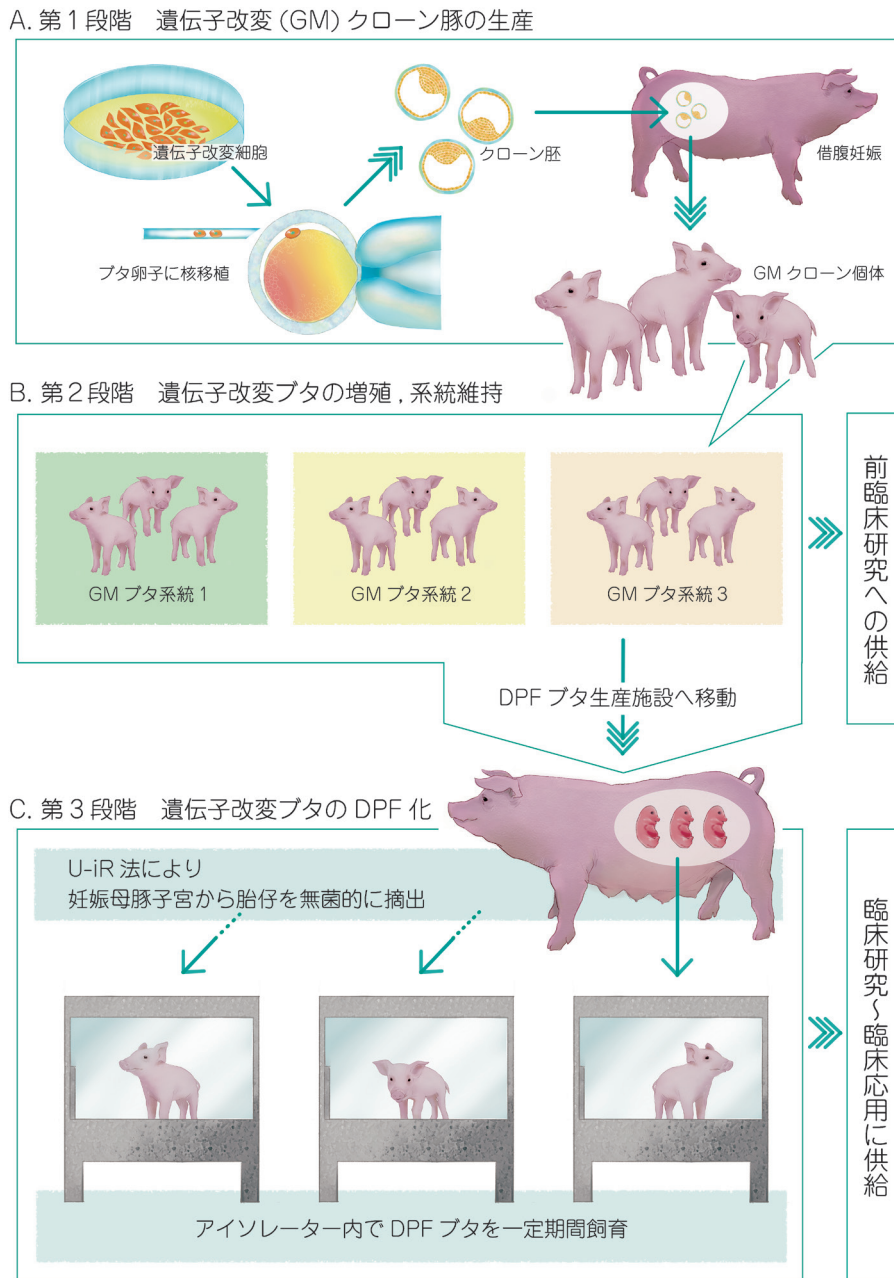


図1 体細胞クローニング技術によるGMブタの生産から指定病原体フリー (DPF) 臓器ドナー個体作製に至る過程  
 A: 体細胞クローニング技術によるGMブタの親世代個体(ファウンダー)を作製する。  
 B: 複数のGMクローンブタ系統を開発した場合、前臨床研究による性能試験を経て、臨床研究に用いる系統を決定する。  
 C: GMブタの繁殖により妊娠母豚を得て、U-iR法を用いてDPFブタを生産する。U-iR法では、必要な頭数を経済的に生産できる。  
 DPF, designated pathogen free; GM, genetically modified; U-iR, uterectomy-isolated rearing

ジェネティックな遺伝子発現変異の蓄積が、反復クローニング技術の限界の要因と思われる。

## 2. 指定病原体フリー (DPF) ブタ生産の現状と今後の課題

ヒトへの移植に用いる臓器を提供するブタは、指定病原体フリー (designated pathogen free, DPF) の条件を満たす必要がある。我が国におけるDPFブタの基準を示す厚生

労働省の「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」<sup>4)</sup>に、臓器ドナーブタから排除されるべき病原体のリストが掲載されている。これらの病原体の中から、我が国での異種移植の臨床応用に際して検査が必須と思われる38種について、我々は既にPCR (polymerase chain reaction) による検出法を確立している。その詳細については、今号の本特集で井上らによる「異種移植における感染症リスクの検査—日本における現状と課題」を参照

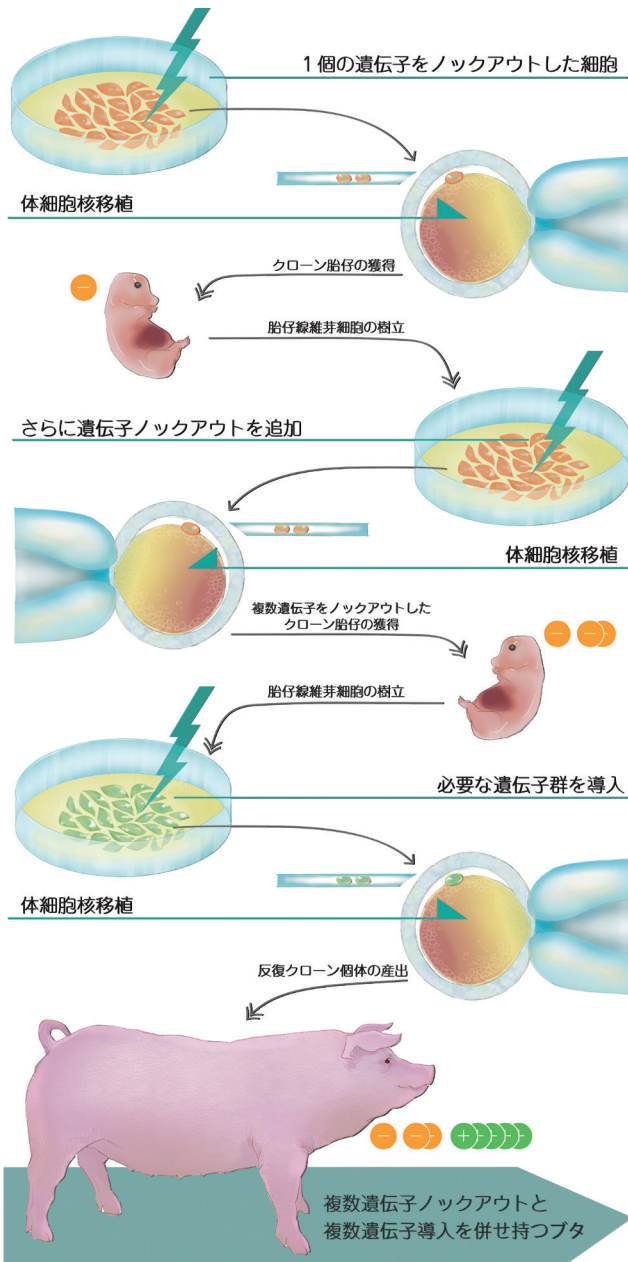


図2 反復クローニング技術による多重遺伝子改変ブタの作製  
 遺伝子 KO 細胞の核移植によってクローン胎仔を獲得し、初代培養細胞を樹立する。樹立した細胞にさらに必要な遺伝子 KO を追加し、体細胞核移植を再度行って、複数遺伝子を KO した胎仔を獲得する。得られた胎仔から再度初代培養細胞を樹立し、次は必要な遺伝子 (例えばヒト補体抑制因子) を導入する。このように GM 細胞による体細胞クローニングを反復することで、複数の GM が施されたブタを作製することができる。

されたい。

DPFブタの生産施設では、2007年に建設された米国 Spring Point Project (SPP) の施設が著名である<sup>5)</sup>。約2,000 m<sup>2</sup>の面積を有するこの施設は、現在ではDPFブタ施設の規範的な存在となっている。SPPの施設はDiabetes Resource and Wellness Foundationの寄付によって620万ドルを投じて建設されたが、今後我が国において異種移植の臨床応用を開始するに際して、巨額の費用を要する施設

の建設と運営を目指すことは現実的ではない。我が国における異種移植の臨床応用は、これから黎明期を迎えようとしている段階であるから、前臨床・臨床研究段階には小頭数のDPFブタのみを生産・供給し、臨床研究の進展に応じて生産規模を拡大するフレキシブルな体制が必要であろう。フレキシブルかつ低コストなDPFブタ生産を実現するため、我々はDPFブタを1頭ずつ個別のアイソレーションチャンバ内で飼育する、U-iR (uterectomy-isolated rearing, 子宮全摘-単離飼育)法を提唱している<sup>6)</sup>(図1)。

U-iR法の基本コンセプトは、SPF (specific pathogen free) 条件を満たす妊娠母豚から、外科的な子宮全摘術を経てDPFブタを作製することである(図1B, C)。妊娠末期の母豚から摘出した子宮から、無菌アイソレータ内で出産直前の胎仔を取り出し、その後、育成用の個別アイソレータ内でDPF産仔を必要な期間飼育する。母豚に求められるSPF要件は、経胎盤感染し得る病原体を持たないことである(図3)。実際我々は、U-iR法によって確実にSPF母豚からDPF胎仔や産仔が得られることを確認している。母豚や種豚豚をDPF環境下で飼育する必要がない場合、臓器ドナー個体の生産・維持・繁殖に要する労力やコストは大幅に削減される。

異種移植の臨床応用に用いられるのは、10種あるいはそれ以上の遺伝子を改変したブタである。3種の内在性遺伝子のKOとヒト遺伝子群の導入を合わせ持つブタの場合、KO遺伝子と導入遺伝子の遺伝子座は染色体上の4ヶ所に及ぶ。そのため、このシステムの維持のための育種・繁殖工程は複雑にならざるを得ない。また、前臨床～臨床研究の段階では、複数のGMブタ系統を比較する必要もあるだろう。

多種類のGMブタの小規模生産が求められる研究段階への対応には、体細胞クローニング技術が不可欠である。前述の通り(図1A)、体細胞クローニング技術は、いわば無性生殖的工程によって細胞から個体を直接的に作製する技術であり、この技術を用いて多種類のGMブタを実験的に生産することができる。しかし、クローンブタの臓器をヒトへの移植に用いる場合は、体細胞クローニングに用いる材料(細胞や卵子)や製造工程(培養や体細胞核移植操作)の品質保証が必要になる。現時点で我々は、①体細胞クローニング技術を駆使してGMブタの種畜(親ブタ)を生産し、②雌雄の種畜のSPF環境下での繁殖により妊娠母豚を得て、③妊娠母豚をDPF施設に移動してU-iR法によりDPF産仔(臓器ドナー)を生産するという3段階の生産体制(図1A～C)を目指すのが現実的であると考えている。この生産体制の構築により、前臨床研究および臨床研究段階から臨床応用の規模拡大までの対応が可能であろう。

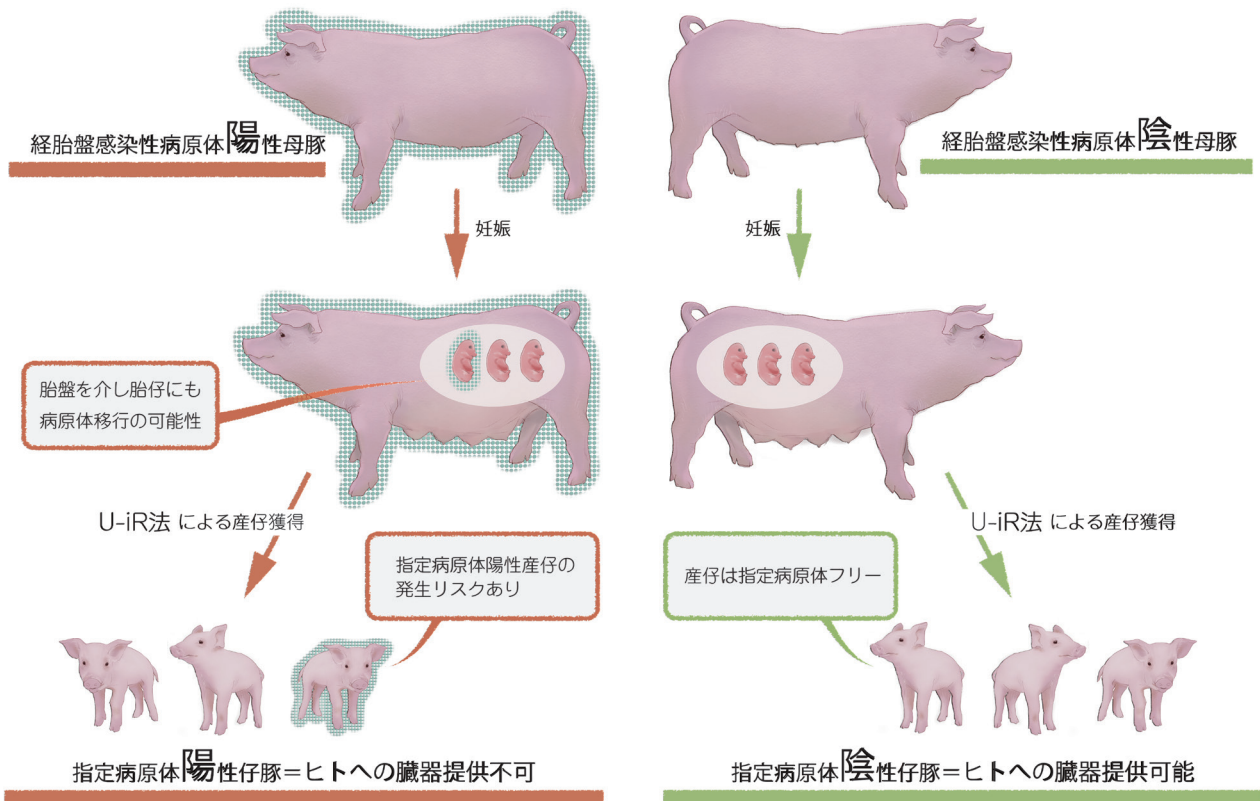


図3 妊娠母豚の経胎盤感染性病原体の有無がDPF 個体作製の鍵となる

### 3. 異種移植用ブタの生産管理の課題 — 問題提起として —

移植用ブタ臓器の製造工程に対する、いわゆる品質や安全性保証のあり方については、慎重に議論する必要がある。GMブタの臓器自体はヒトの体内に移植されるものであるから、医薬品や医療機器と同様な、あるいはそれに準じる品質・安全性管理の思想が適用されるべきと考えるのが妥当であろう。しかし、移植用の臓器に、製薬や医療機器の製造工程管理の基準や方法をそのまま当てはめることには無理がある。さらに、臓器ドナー個体から採取された臓器は、採取後直ちに移植に供されることが望ましいので、移植直前の検査に十分な時間を確保することができない。

移植用臓器を製品とすると、臓器ドナーブタは製品の原材料という位置付けになるであろう。このような異種移植用臓器生産の特殊性を踏まえると、移植用の臓器を生産するGMブタ個体の生産工程管理が重要な意味を持つことになるであろう。臍島、心臓、腎臓などの異種移植で想定される臓器ドナー個体の週・月齢は、生後2週間～12ヶ月程度であろう。したがって、出生後一定期間のドナー個体のモニタリングは可能である。ブタは多胎動物であるので、臓器ドナー個体の同腹仔をいわば抜き取り検査のように検

査することで、実際に移植に用いる臓器の品質（衛生度や機能）に関する情報を得ることができる。これに加えて、臓器ドナー個体を生産する雌雄の親個体（およびその系統の個体群）の適正な管理と検査によって、実際に移植に用いる臓器の品質・安全性を高いレベルに保つことができる。親個体から経胎盤感染し得る病原体を排除することで、U-iR法で生産する個体の衛生状態を担保するのが我々の工程管理思想であるが、これを裏付ける知見を既に得ていることは前述の通りである（図3）。

GMブタの生産工程の実例を挙げて、生産工程管理のあり方について考えてみたい（図4）。現在我々は、GMクローンブタの生産を通常の研究環境で行っている（図1）。製造工程には食肉処理場で採取された卵巣由来の卵子の使用も含まれる（図4）。この場合、GMクローンブタの作製原材料である卵子（卵巣）のトレーサビリティは担保されていないことになる。しかし、このような工程で生産されるのは臓器ドナーの親個体、あるいは親個体を生産するための種畜であるので（図1A, B）、最終産物である移植用臓器に対するものとは異なる生産管理基準が必要と考えている。

雌雄の親個体系統を樹立し、それらの衛生状態を検証したうえ、交配によって得た妊娠雌からU-iR法（前述）によりDPF産仔を生産することで、臓器ドナー個体の衛生状態

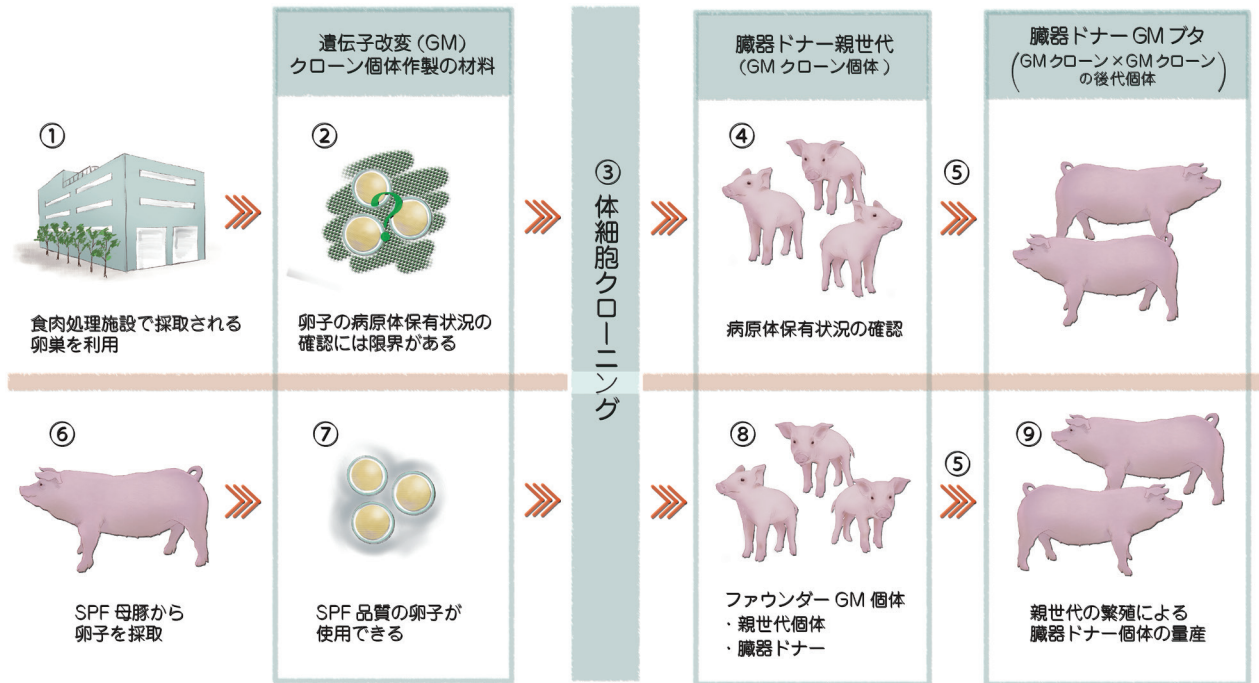


図4 GM臓器ドナーブタの生産工程管理

- ① 食肉処理場由来の卵巣から卵子を採取してクローンブタ作製を行う場合。
  - ② クローンブタ作製原材料の卵子を得た個体の由来や衛生状態の追跡には限界がある。用いた卵子集団の一部をDPF検査に供することは可能である。
  - ③ 体細胞クローニング
  - ④ 親世代GMブタ(クローン個体集団)。経胎盤感染し得る病原体の保有に特に留意して、衛生状態をモニタする。異種拒絶を回避する能力や臓器の機能について詳細に検査する。
  - ⑤ 臓器ドナーとなるGMブタを親世代GMブタの交配によって生産する。ドナー個体の同腹仔を用いて、DPF状態や臓器の機能の検証が可能。
  - ⑥ 経胎盤感染性病原体陰性のSPFブタから卵子を採取してクローンブタ作製を行う場合。
  - ⑦ クローンブタ作製原材料の卵子の衛生状態は担保される。
  - ⑧ GMクローンブタ(親世代あるいは臓器ドナーとして使用可能)。原材料となる卵子、クローニング工程ともに品質管理されることで、臓器ドナーに必要な品質・安全性を満たす可能性あり。
  - ⑨ 親世代クローン個体の繁殖によってドナー個体を量産できる。
- DPF, designated pathogen free; GM, genetically modified; SPF, specific pathogen free

を担保することができる。さらに、臓器ドナーブタの同系統個体や同腹産仔の臓器を様々な検査に供することで、移植に用いる臓器の機能についての品質保証も可能となる。

我々は以上の生産管理思想に基づき、米国で前臨床・臨床研究の実績のあるGMブタを日本に導入して再現生産し、臨床応用に供給することを目指している。本稿の発行と臓器ドナーブタ生産工程の可視化・確立を機に、GMブタによる異種移植の臨床応用についての様々な議論が、現実性・具体性をもって進められることを期待したい。

## 謝辞

図のイラスト作成を引き受けて頂いたカルピクス氏に感謝致します。

## 利益相反の開示

長嶋比呂志：【役員・顧問職】株式会社ボル・メド・テック代表取締役 / チーフ・サイエンティスト, 【株】株式会社ボル・メド・テック

## 文 献

- 1) Griffith BP, Goerlich CE, Singh AK, et al: Genetically Modified Porcine-to-Human Cardiac Xenotransplantation. *N Engl J Med* **387**: 35-44, 2022
- 2) Mohiuddin MM, Singh AK, Corcoran PC, et al: Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO.hCD46.hTBM pig-to-primate cardiac xenograft. *Nat Commun* **7**: 11138, 2016
- 3) 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
- 4) 厚生労働省：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。2001. <https://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/isyoku/sisin.html> Accessed 16 Aug 2023
- 5) Spring Point Project: Our Facility, 2013. <https://www.springpointproject.org/behind-the-science/our-facility/> Accessed 16 Aug 2023
- 6) Hasegawa K, Nakano K, Nagaya M, et al: Transplantation of human cells into Interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs under several conditions. *Regen Ther* **21**: 62-72, 2022