

FDAで承認されたPRRSウイルス 耐性ゲノム編集ブタについて

九州大学名誉教授
小野 悦郎

英Genus社が発表したCRISPR-Casを用いたPRRSウイルス耐性ゲノム編集ブタの商業規模の創始集団の作出に関する論文

Generation of a Commercial-Scale Founder Population of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Resistant Pigs Using CRISPR-Cas

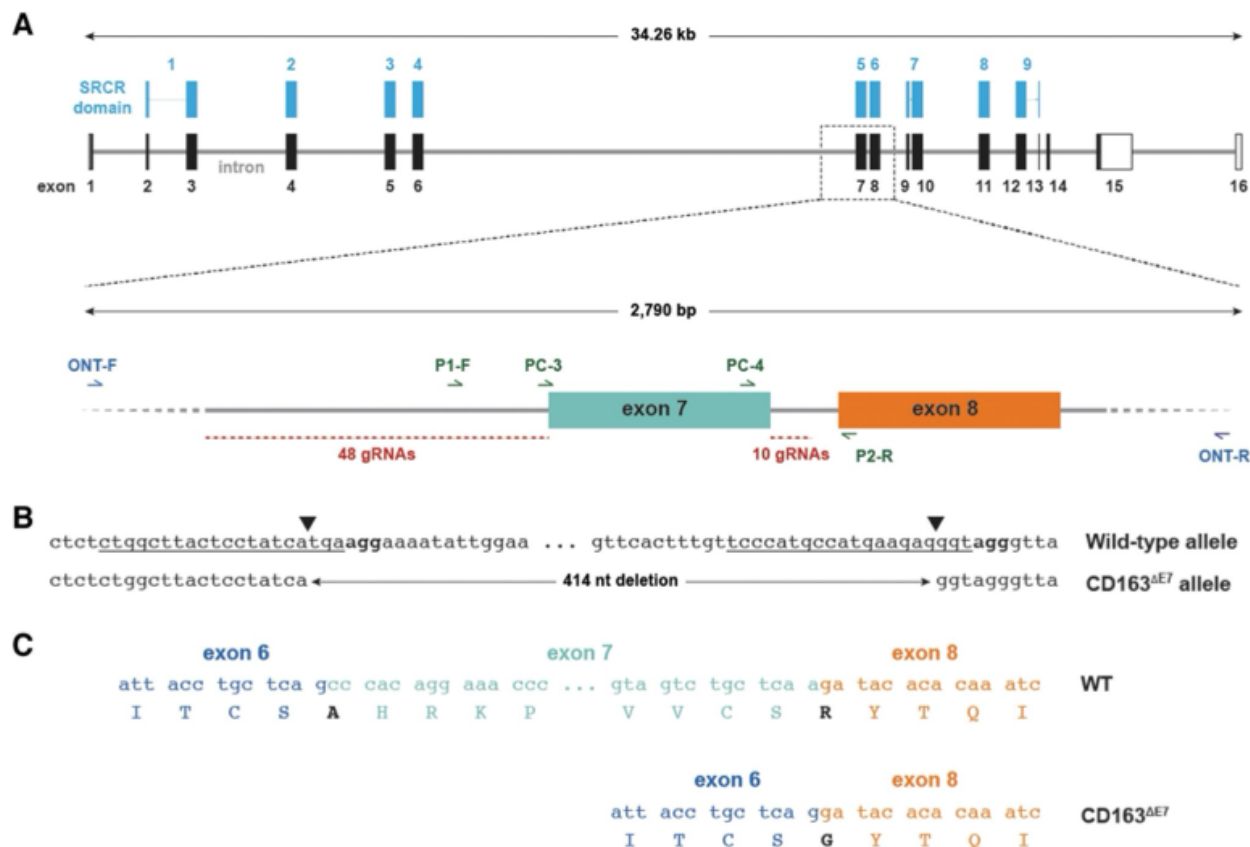


FIG. 1. Generation of a CD163 allele lacking exon 7 using CRISPR-Cas and breeding strategy for establishing a founder population.

1. 4つの異なる育種系統で作出され、十分な遺伝的多様性が確保されているため、個体群の即時的な拡大と将来の遺伝的ポテンシャルの最大化が可能。
2. 改変されたCD163対立遺伝子の3世代にわたる確認及び育種プロセス中のオフターゲットの特定と除去が行われた。

CD163の模式図と機能ドメイン

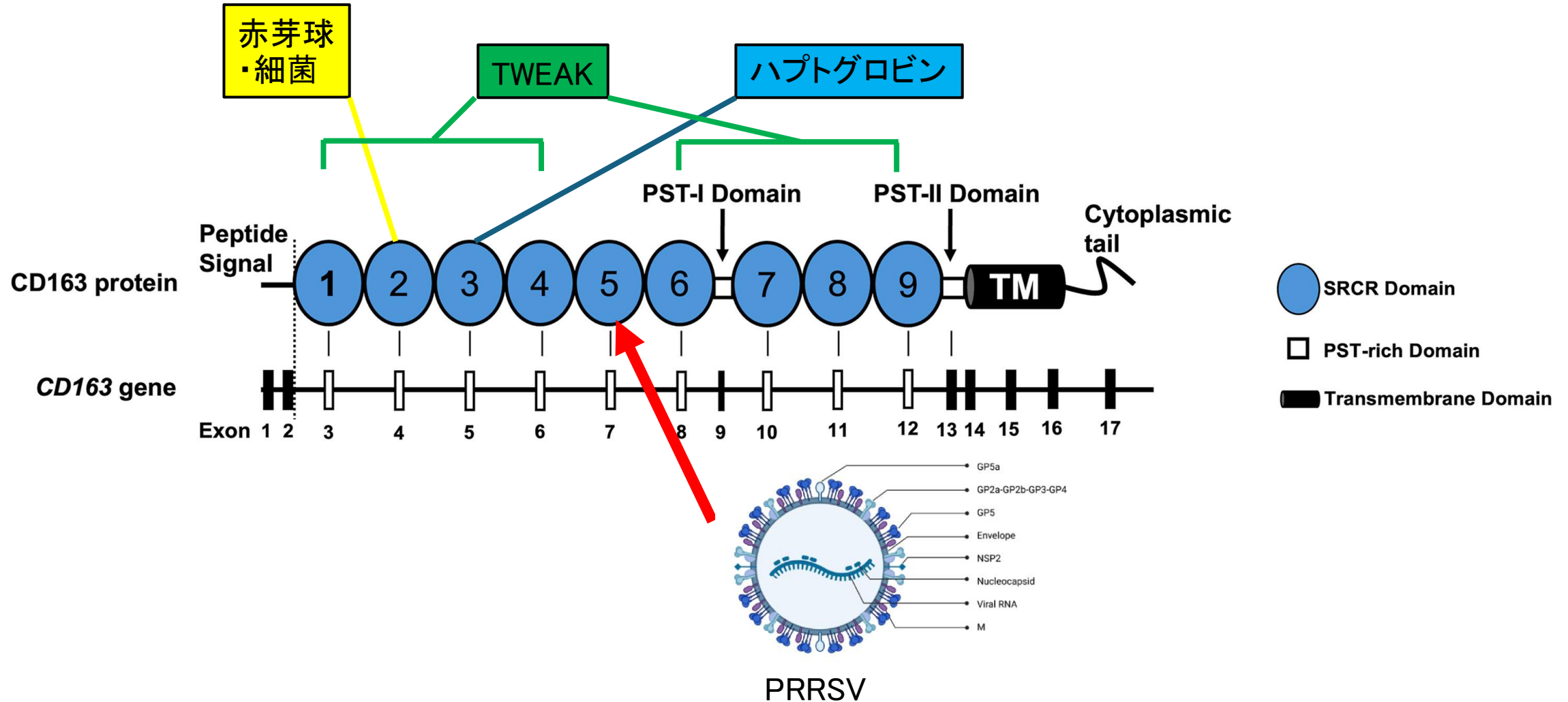


Fig. 1. Schematic representation of porcine CD163 protein and gene. (改変)

The diagram illustrates the CD163 protein structure displaying oval SRCR (Scavenger Receptor Cysteine-Rich) domains, rectangular PST (Proline-Serine-Threonine) regions, a transmembrane domain (TM), and a cytoplasmic tail. The corresponding *CD163* gene exons are shown at the bottom.

CD163のゲノム編集技術によって作成されたPRRS抵抗性ブタ

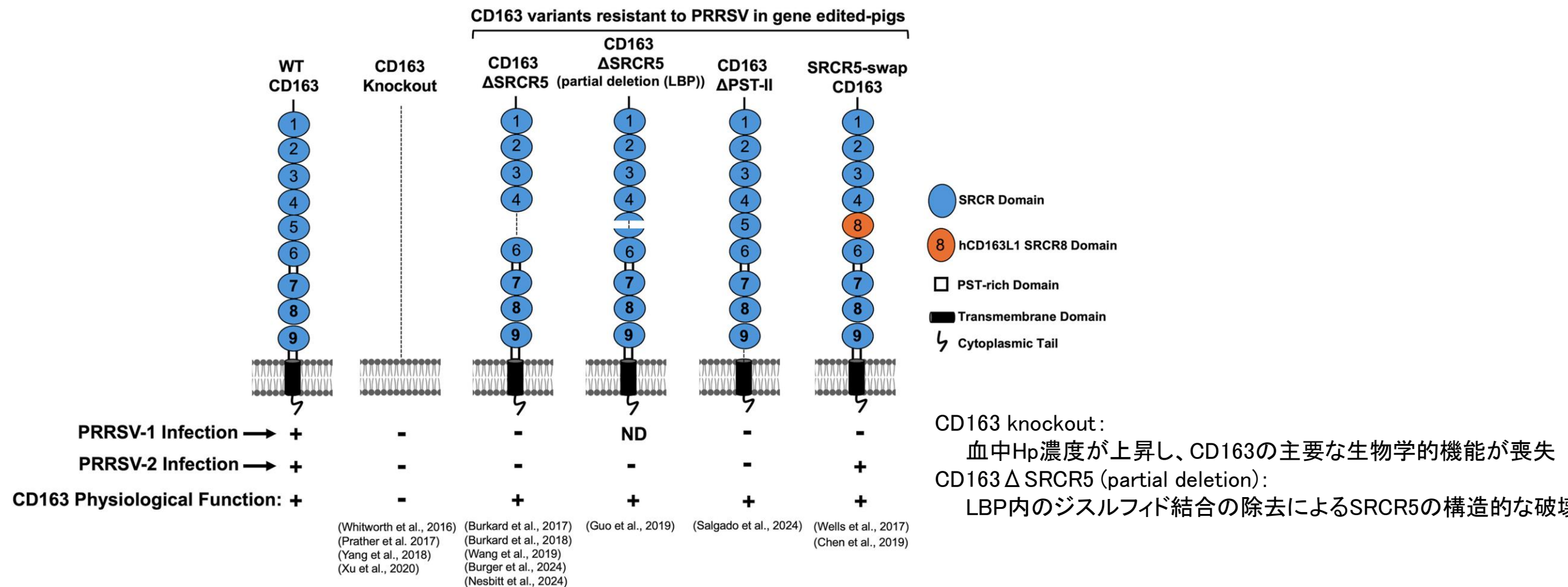
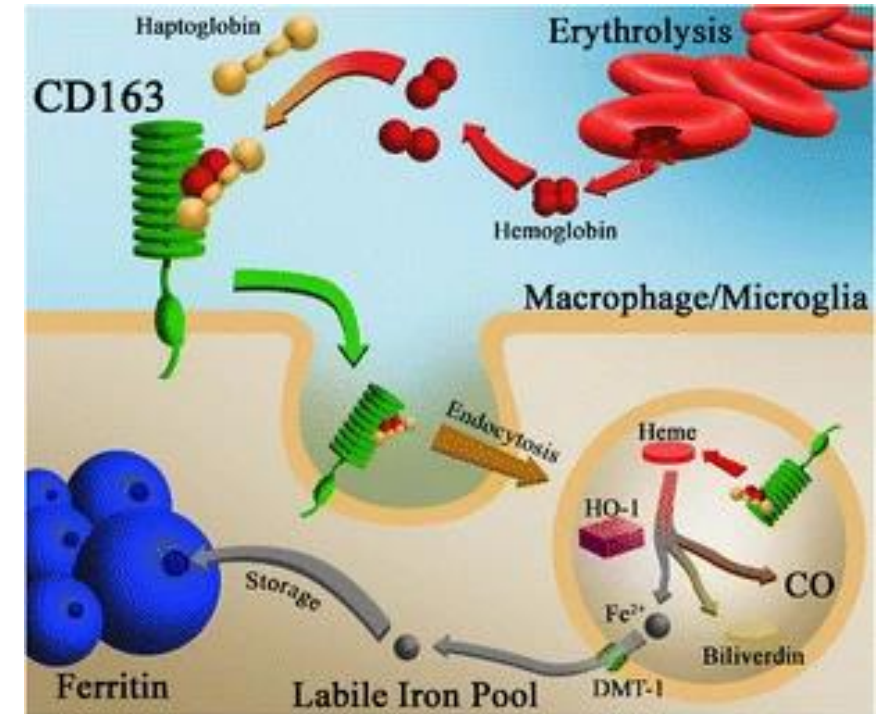


Fig. 3. Schematic representations of CD163 variants resistant to PRRSV infection in gene-modified pigs. Gene-edited swine possessing different CD163 modifications were generated and evaluated for their susceptibility to PRRSV infection.

CD163の主な生理学的機能

1. 血液中の遊離ヘモグロビン(Hb)の除去

- 溶血により遊離したHbとハプトグロビン(Hp)とのHb-Hp複合体をHpにSRCR3ドメインが結合することでHp-Hb複合体を早期エンドソームに移行させ、その後リソソームで分解することで除去する。一方、除去に関与したCD163は細胞膜へリサイクルされる。→ 遊離Hbの分解により、生成されるビリベルジン、ビリルビン、一酸化炭素などの強力な抗炎症分子によって引き起こされる酸化毒性からのダメージを防ぎ、恒常性を維持し、鉄のリサイクルを促進する。
- CD163は赤芽球結合因子であり、SRCRドメイン2との結合を介して未熟赤芽球の生存、増殖、分化を促進する。また、CD163発現マクロファージは老化赤芽球や奇形赤芽球を除去する。



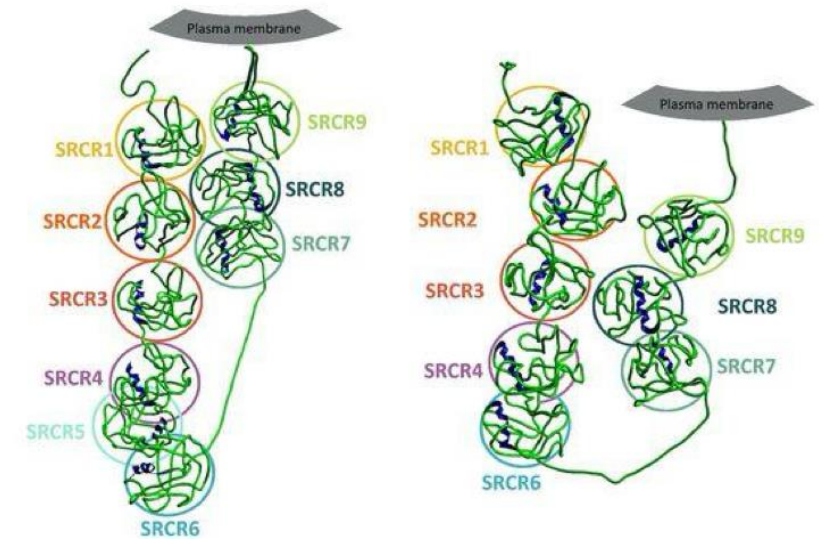
2. 炎症誘発性および抗炎症活性への関与

- CD163陽性マクロファージは、選択的活性化マクロファージM2群に分類され、高い貪食活性と抗炎症性(感染後の組織修復に重要なマクロファージ特性)を特徴とする。
- 炎症誘発能においては、抗CD163抗体または細菌によってマクロファージ表面のCD163が直接架橋され、IL-6、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、TNF- α 、(IL-1 β)などの炎症誘発性サイトカインを局所的に放出する。
- SRCRドメイン1~4および6~9には、CD163発現を負に制御する抗炎症性サイトカインであるTWEAK(TNF様弱いアポトーシス誘導因子)の結合部位が含まれており、TWEAKの除去に関与している。
- CD163はHMGB1(High Mobility Group Box 1)-Hp複合体と相互作用し、ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)依存的に炎症反応を制御する。
- Hb-Hp刺激は、インターロイキン-6(IL-6)およびIL-10のレベルの上昇、ならびにIL-1および腫瘍壊死因子 α (TNF- α)のダウンレギュレーションにつながる。
- 可溶性CD163は、肝硬変および細菌感染患者の炎症マーカー、敗血症、多発性硬化症、マラリア、自己免疫疾患など、他の臨床状態のバイオマーカーとして使用できる可能性がある。
- その炎症誘発性および抗炎症活性への関与から、CD163は感染に対する宿主反応の調節における「何でも屋(Jack-of-all-trades)」である。

SRCR5ドメインの除去は正常な生理学的機能に影響を与えていないとするデータ (Burger et al., 2024; Burkard et al., 2017, 2018; Guo et al., 2019; Nesbitt et al., 2024; Salgado et al., 2024; Wang et al., 2019a)

- 血中Hb値は基準値内であり、CD163のヘモグロビン/ハプトグロビン除去活性は正常
- Δ SRCR5動物は、野生型同等のレベルで Δ SRCR5 CD163 mRNAおよびタンパク質を発現する
- CD163および Δ SRCR5 CD163のすべてのサブドメインは球状構造は維持されており、 Δ SRCR5タンパク質が適切に折り畳まれ、発現していることを示唆
- 血球数は基準値内であり、全般的な健康状態は良好
- 赤血球数、血中ヘマトクリット値、赤血球分布幅、平均赤血球容積に有意差はない

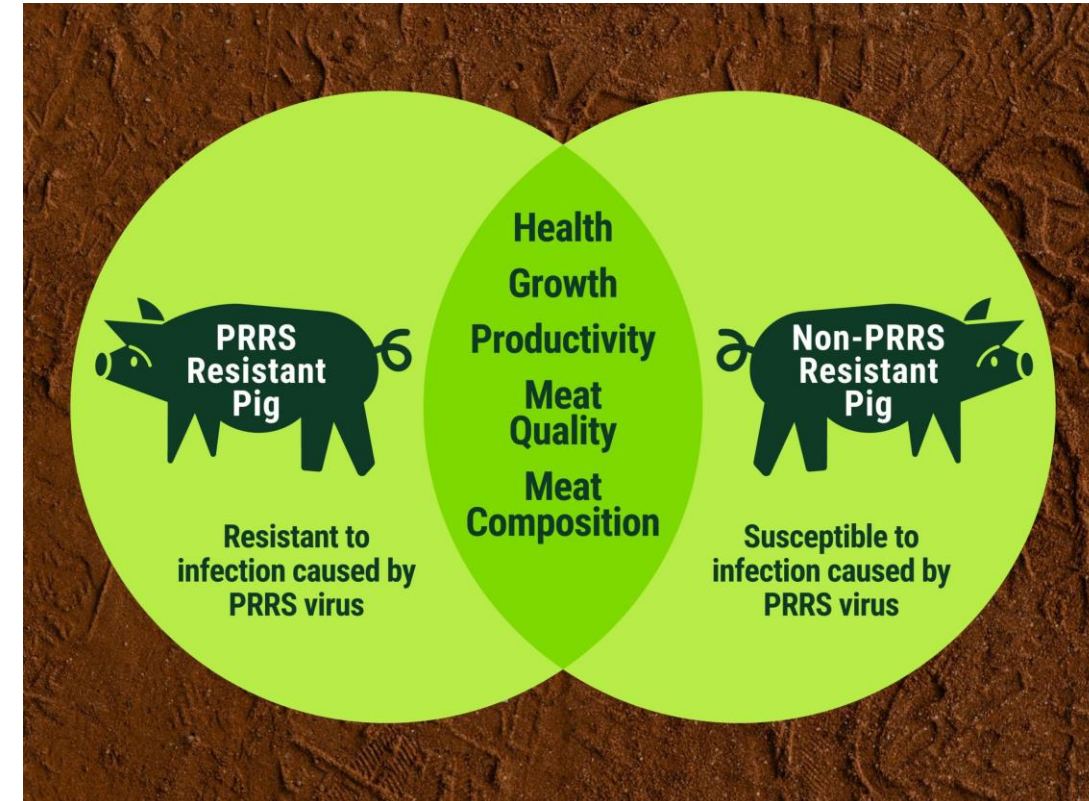
B Predicted protein structure



- 可溶性CD163(sCD163)血清レベルに有意差はない
- ベースラインサイトカインレベルは、ΔSRCR5動物と野生型動物で同様
- PRRSVに感染した野生型動物では、炎症と免疫応答シグナル伝達の協調的な連鎖が見られるが、ΔSRCR5動物ではサイトカイン応答は観察されず
- 分離されたPBMCは、CSF1誘導によりPMMに完全に分化。それらはすべて、PRRSVの侵入において推定上の機能を持つCD169、CD151、およびCD163を含むマクロファージ特異的 surface マーカーを発現
- PMMにおいて、HO-1はHb-Hpの取り込みによってアップレギュレーションされた。

SRCR5ドメインの除去が豚の誕生から成熟までのパフォーマンスに悪影響を与えないことを示唆するデータ (Burger et al., 2024; Nesbitt et al., 2024)

- 97項目の肉質、肉の組成、成長率(生後初期の出生時体重および乳頭数、肥育期の体重、体重増加、および腰肉の深さ)、健康、分娩能力(雌の生殖能力: 妊娠期間および出生数、生存数、死亡数/ミイラ数)に差異がない
- 唯一の例外は、超音波検査で予測された第10肋骨背脂肪の厚さがゲノム編集ブタで厚かったことであるが、SRCR5ドメインの除去とは関連がないものと思われる
- さらに、死後の死体物理的欠陥にも有意差は観察されず



FDA approves gene-editing tech creating PRRS-resistant pigs

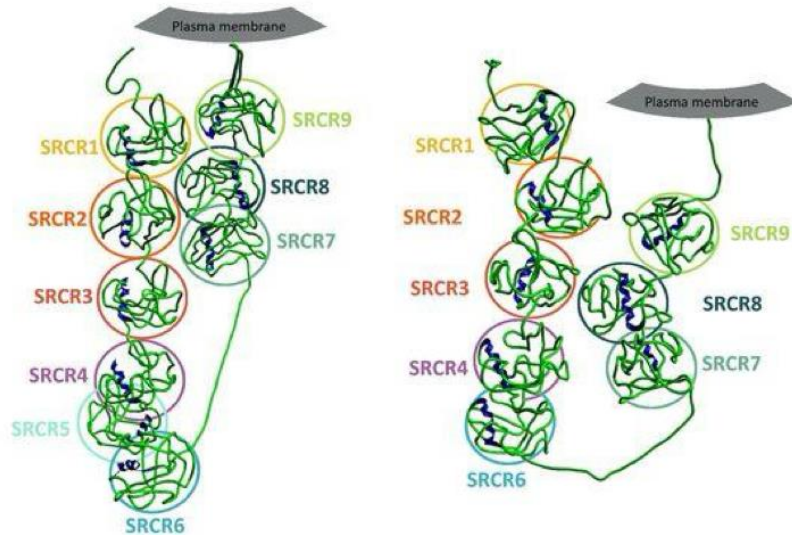
AASV says it supports the responsible use of gene editing technologies to improve the health and well-being of swine under strict safety and ethical standards

- AASVは、厳格な安全性と倫理基準の下で、豚の健康と福祉を向上させるための遺伝子編集技術の責任ある使用を支持。
- ブタの感染症の専門家であるScott Dee博士は、この技術により、PRRSの制御が改善されることを期待するが、この規制上の承認にもかかわらず、米国におけるPRRS耐性豚の商業化はすぐには実現しない。しかし、将来的な利用への道が開かれ、養豚業界を劇的に変える可能性がある。
- 大規模な豚肉生産の典型的な条件下で試験が行われていないため、生産者と獣医師は、このウイルスに対して効果が実証されているすべての管理対策を依然として適用する必要がある。

食品衛生上の検討が必要と考えられる事項

- 食品衛生上の懸念としては、 Δ SRCR5 CD163の抗原性に問題は？
→ アレルゲン？

B Predicted protein structure



C

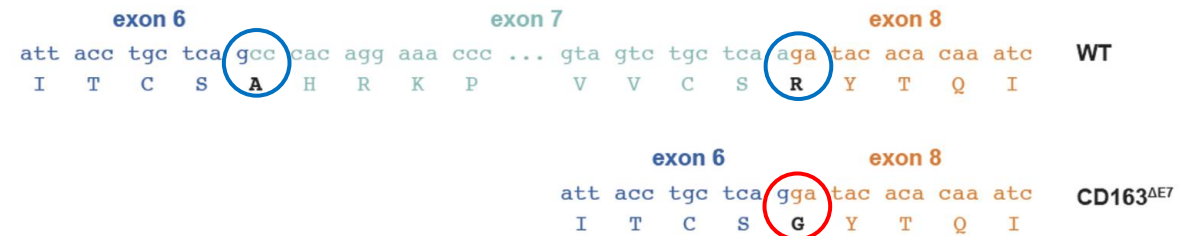


FIG 1. (C) Amino acid sequences encoded by WT CD163 exon 6/exon 7 and exon 7/exon 8 junctions (top) and fusion of exon 6/exon 8 in CD163 Δ E7 (bottom). The ellipsis represents nucleotide and amino acid sequences not shown. Amino acids encoded by codons that span exons are shown in black.

Burger, B.T. *et al.*, CRISPR J. 2024 Feb;7(1):12-28. doi: 10.1089/crispr.2023.0061.PMID: 38353617

Fig. 1 (B) Structure prediction and expression of Δ SRCR5 in pulmonary alveolar macrophages of F2 animals. Protein structure prediction using RaptorX points toward an intact protein product upon the deletion of SRCR5.