

MACROSCOPIC CYNOMOLGUS SHEEP CHIMERA

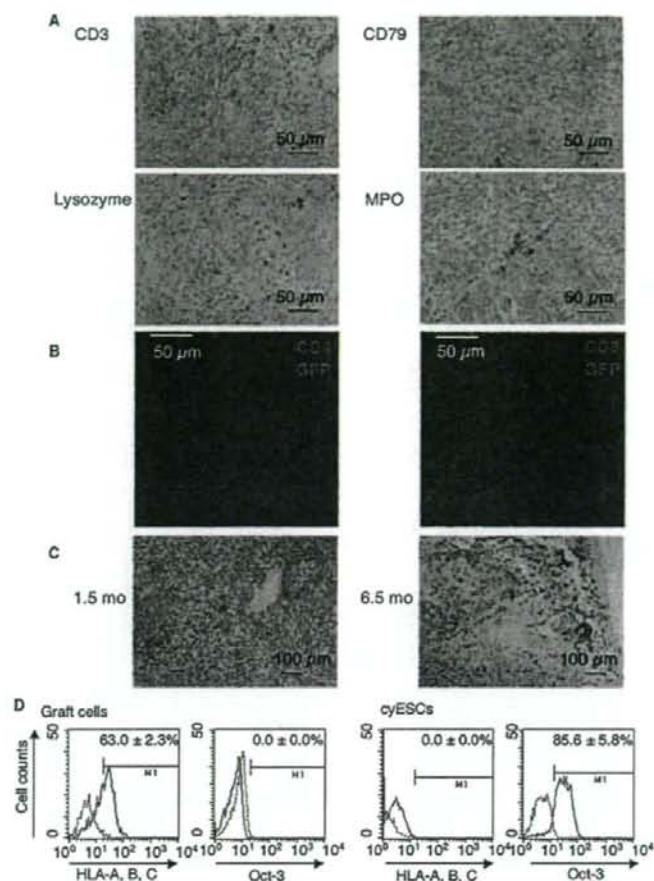


FIG. 4. Cynomolgus grafts in sheep after birth. (A) Immunostaining shows infiltration by T cells (positive for CD3), B cells (positive for CD79), macrophages (positive for lysozyme), and neutrophils (positive for MPO) in the cynomolgus-derived grafts in sheep after birth. (B) Most of the T cells in the grafts were CD4⁺ (red, left), but some were CD8⁺ (red, right). (C) In situ hybridization to detect cynomolgus cells showed that the graft in sheep no. 3 (the longest graft-surviving sheep) at 6.5 months of age (right) consisted of more granulated tissues and less cynomolgus components as compared to the graft at 1.5 months (left). (D) Cultured graft cells were all negative for Oct-3 and 63.0 ± 2.3% of the cells were positive for HLA-A, -B, and -C. On the other hand, cyES cells were all negative for HLA-A, -B, and -C and nearly 90% of the cells were positive for Oct-3. Dotted lines show the staining with the isotype-matched, fluorescence-conjugated, irrelevant control Abs.

latory T (T_{reg}) cells were distributed around islets in nonobese diabetic mice in which normoglycemia had been restored [39]. Therefore, we considered that T cells surrounding the cynomolgus tissues in Fig. 3B might be T_{reg} cells, which possibly suppressed immune rejection.

Although sheep T_{reg} cells have not been characterized, the transcription factor Foxp3 is known to be one of the most specific markers of T_{reg} cells that is highly conserved among species [40,41]. Therefore, we first cloned

and sequenced the ovine ortholog of *foxp3*. The translated amino acid sequence showed a high homology to other known orthologs of Foxp3 (Fig. 6A, left; human, 90%; mouse, 88%; cattle, 99%). We next examined the cross-reactivity of an anti-mouse Foxp3 Ab to ovine Foxp3. Cells transfected with the cloned ovine *foxp3* were stained positively with the anti-mouse Foxp3 Ab by flow cytometry (Fig. 6A, right). We then stained a fetal sheep spleen at 64 days of gestation with this anti-Foxp3 Ab,

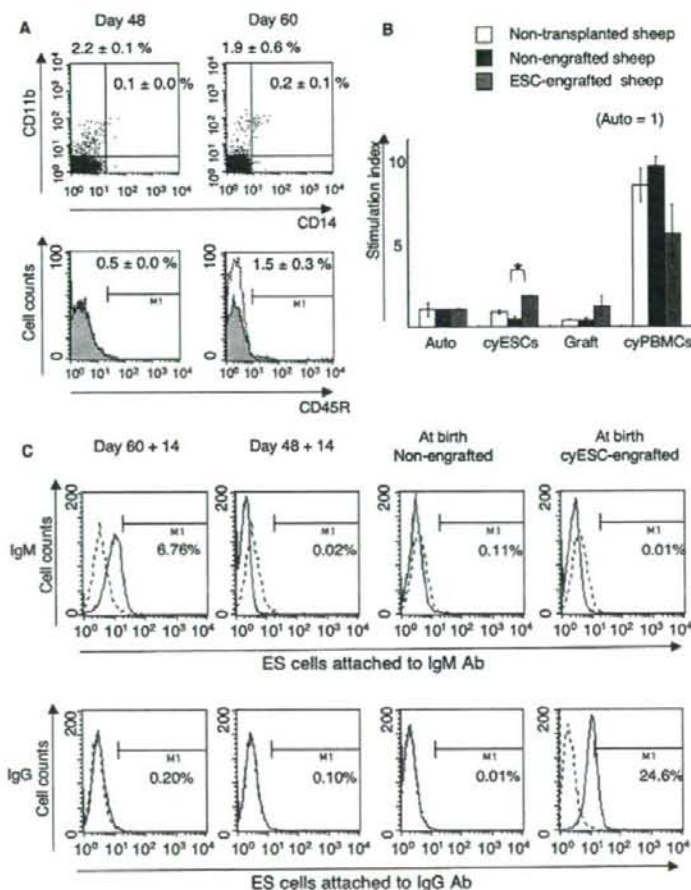


FIG. 5. Host immune responses. (A) Cell-surface antigens of fetal sheep peripheral blood leukocytes are compared between 48 days and 60 days of gestation. CD11b and CD14 double staining of the CD5⁻ cells are shown (upper). There were no statistical differences in the percentages of NK cells (CD11b⁺CD14⁻CD5⁻) between 48 days and 60 days of gestation. Monocytes (CD11b⁺CD14⁺CD5⁻) were scarcely detected at both gestational days. CD45R⁺ cells (as B cells) are slightly increased at 60 days of gestation (lower). Dotted lines show the staining with isotype-matched, fluorescence-conjugated, irrelevant control Abs. (B) The MLR against cyES cells and graft cells was higher in the cyES cell-engrafted sheep than in the nonengrafted or non-transplanted sheep. Statistical differences with the *t*-test were indicated (* *p* < 0.01). (C) IgM (upper) and IgG (lower) xenoantibodies against cyES cells were determined by flow cytometry. (Dotted lines) Negative control sera from nontransplanted adult sheep; (solid lines) sample sera. Day 60 + 14; transplanted with cyES cells at 60 days of gestation and examined at 14 days post-transplant. Day 48 + 14; transplanted with cyES cells at 48 days of gestation and examined at 14 days post-transplant.

and found that cells positive for Foxp3 were always positive for CD4 (Fig. 6B). We have also shown that CD4⁺CD25^{high} cells of adult sheep PBMCs were mostly Foxp3⁺ just like human T_{reg} cells (42) (data not shown). These results indicate that this Ab can be used to detect sheep Foxp3⁺ T cells, namely sheep T_{reg} cells. Using this Ab (Fig. 6C), more than half of the T cells around the

grafts at 2 weeks post-transplant were found to be positive for Foxp3. At birth, 10–20% of the T cells in the grafts were positive for Foxp3. These data suggest that T_{reg} cells might be involved in the sustained engraftment of cynomolgus tissues in sheep. To characterize ovine fetal T_{reg} cells further, it would be ideal to isolate T_{reg} cells from the specimen at 2 weeks post-transplant in Fig. 6C

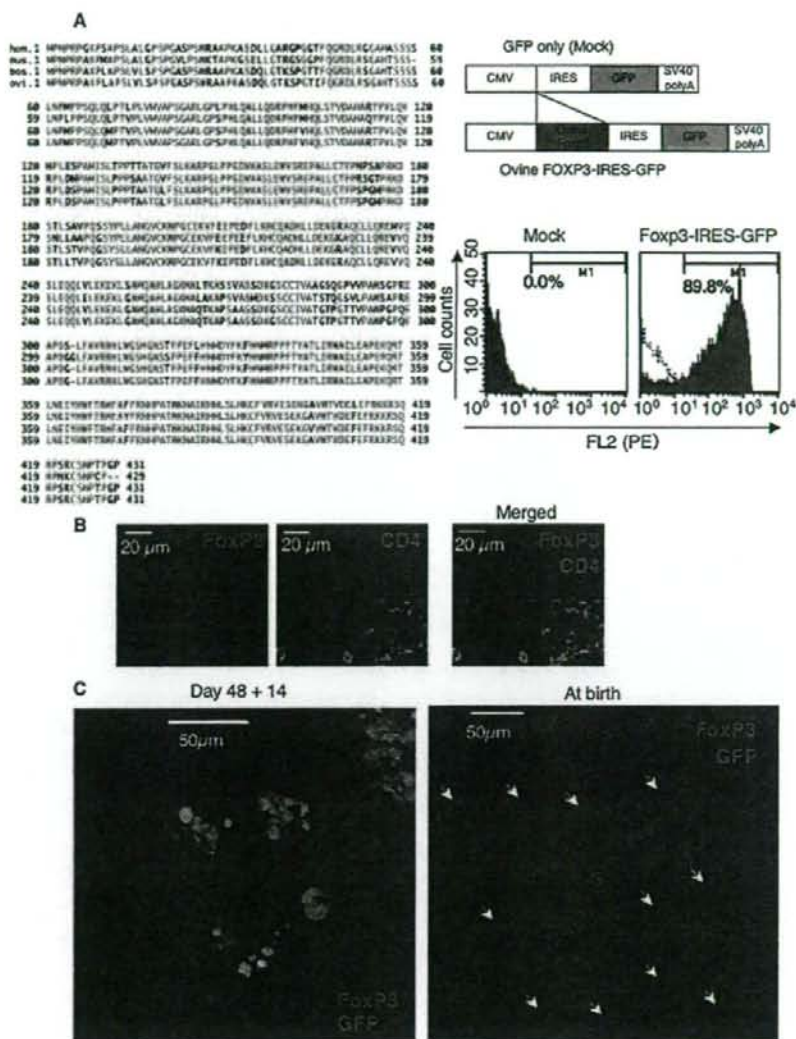


FIG. 6. Detection of Foxp3⁺ T_{reg} cells. (A) Amino acid sequences of Foxp3 in four mammals. Foxp3 of sheep (*ovi*) is compared with that of human (*hom*), mouse (*mus*), and cattle (*bos*) (GenBank accession numbers; NM014009, NM054039, and DQ322170, respectively). Conserved amino acids are indicated in red (*left*). The ovine *foxp3* cDNA was introduced into 293T cells. The plasmid inserts are shown (*upper right*). Flow cytometric analyses of 293T cells transfected with the mock plasmid and with the plasmid expressing the ovine *foxp3* are shown (*lower right*). Gray areas indicate GFP-expressing cells stained with the PE-conjugated anti-mouse Foxp3 Ab. Dotted lines show GFP-expressing cells stained with PE-conjugated isotype-matched irrelevant Ab. (B) Fetal sheep spleen at 64 days of gestation was stained positively with the anti-mouse Foxp3 Ab (red, *left*) and with anti-ovine CD4 (green, *middle*). The merged image revealed that Foxp3⁺ cells were always CD4⁺ and they were considered as T_{reg} cells (*right*). (C) As assessed with this Ab, when transplanted at 48 days of gestation, more than half of the surrounding T cells at 2 weeks post-transplant (Fig. 3B) were positive for Foxp3 (stained in red, *left*). Ten to 20% of the T cells in the grafts at birth (Fig. 4A) were positive for Foxp3 (stained in red, arrows, *right*).

and demonstrate the suppressive function. However, it was not possible to collect sufficient viable immune cells from the tiny subcutaneous tissues.

DISCUSSION

In the setting of nonprimate-to-primate xenotransplantation, very rapid and vigorous immune rejection occurs because of the interaction between the Gal α 1-3Gal epitope abundantly expressed on nonprimate cells and the primate natural anti-Gal α 1-3Gal antibody [43–46]. In contrast, primate-to-nonprimate xenotransplantation does not evoke such rejection because primate cells do not express the Gal α 1-3Gal epitope [47]. Regarding this point, our strategy to generate primate ES cell-derived grafts in sheep has cleared one hurdle of xenotransplantation. In addition, hES cells are less immunogenic even in xenotransplantation settings [34,36]. For instance, when hES cells were transplanted in the leg muscle of immunocompetent mice, no leukocytic infiltration was observed 48 h later, although human mature cells induced rapid granulocytic infiltration within 48 h [36]. Our MLR results showing much lower stimulation evoked by cyES cells or their progeny than by cynomolgus PBMCs might be explained by the less immunogenicity of cyES cells.

In the present study, we transplanted cyES cells into sheep fetuses under several different conditions. Only when transplanted with more than 1×10^6 cyES cells at <50 days of gestation did cyES cell progeny show sustained engraftment even after birth. To our knowledge, this is the first report describing the long-term macroscopic engraftment of xenogeneic ES cells after in utero transplantation.

One issue to be discussed is why cynomolgus tissues can engraft for such a long time in sheep. There are several possible explanations for this. First, we showed that the premature innate immunity before 50 days of gestation might be one of the reasons for the survival of the ES cells from early xenorejection. Second, the adaptive immune system during the early fetal period is so premature that even xenogeneic cynomolgus cells introduced in this period can be recognized as a sort of "self." However, both cellular and humoral immune responses against cyES cells were detected in the cyES cell-engrafted sheep, and additional engraftment was not successful in the animals. Therefore, despite their sustained engraftment, the cynomolgus tissues in sheep are recognized as foreign. Third, mixed hematopoietic chimerism (existence of both donor and recipient hematopoiesis) would induce donor-specific T cell tolerance even across a xenogeneic barrier [48–50]. In the mouse allogeneic setting, the transplantation of ES cells is shown to generate such mixed hematopoietic chimerism [51]. Similarly, transplanted cyES cells possibly generated mixed

hematopoietic chimerism in sheep, serving to induce cynomolgus-specific tolerance. However, no cynomolgus cells were detectable in the peripheral blood of the cyES cell-engrafted sheep ($n = 4$) as assessed by a sensitive PCR analysis; that is, there was no mixed hematopoietic chimerism in the sheep (data not shown). Thus, the sustained engraftment of cynomolgus cells in sheep was not attributable to mixed hematopoietic chimerism.

Finally, T_{reg} cells would serve to induce transplant tolerance [52]. When transplanted at <50 days of gestation, $CD4^+$ T cells were found mobilized around transplanted cyES cell progeny, many of which were $Foxp3^+$ T_{reg} cells. For allografts to survive, T_{reg} cells had to promote tolerance in mice [53,54]. In a xenogeneic setting, host T_{reg} cells were shown to suppress immune responses to donor antigens in athymic mice that were grafted with neonatal porcine thymus [55]. In the human fetus, preterm cord blood is known to contain a high proportion of T_{reg} cells that declines with gestational age to the level in adult peripheral blood [56]. Fetal $CD4^+ CD25^{high}$ T_{reg} cells were reported to play an important role in the suppression of immature fetal T cell responses during early development, which might suppress the auto-reactive T cells or alloreactivity to maternal antigens [57]. Therefore, it is possible that an adequate number of T_{reg} cells were mobilized in the early fetal period and contributed to the engraftment of cynomolgus tissues in sheep.

In this study, however, additional engraftment after birth was not successful. Although further investigation of the fetal immune system is necessary, one plausible possibility is that with the maturation of immune system, the immune responses against xenogeneic cynomolgus tissues might eventually exceed the ability of T_{reg} cells to suppress the immune responses. To provide a sufficient supply of therapeutic cells or tissues by this in vivo differentiation method, further interventions for successful additional transplantation would be necessary. One might be to somehow enhance the ability of T_{reg} cells to suppress the immune responses after birth. Another one might be the induction of immunological tolerance or unresponsiveness through mixed hematopoietic chimerism by in utero co-transplantation of congenic hematopoietic stem cells or those derived from the ES cells. Given that xenograft rejection requires T cells [34], administration of immunosuppressive drugs to the fetal and cyES cell-engrafted sheep might be of help, although it should be considered that T_{reg} cells may also be suppressed.

In conclusion, when a certain quantity of cyES cells are transplanted before 50 days of gestation, $Foxp3^+$ T_{reg} cells are mobilized and cyES cell-derived mature cells are able to survive long term in sheep, although immunological tolerance is not achieved. This finding suggests a possibility of generating sheep with human grafts after in utero transplantation of hES cells, although ma-

major challenges remain, especially with respect to the *in vivo* regulation of hES cell differentiation to functional cells. Because the differentiation of ES cells *in vivo* is influenced by the microenvironment at transplantation sites [31,58], transplantation into specific sites might be of help in regulating the differentiation. Genetic manipulation of ES cells should be of help, for instance transduction with *hoxb4* for *in vivo* hematopoiesis [59]. Differentiation of ES cells to certain precursor cells *in vitro* prior to transplant might be also helpful [60]. Because *in vivo* ES cell-derived grafts after birth were no longer at all positive for the pluripotent marker Oct-3, they are free of undifferentiated ES cells, implying their potential utility for clinical cell preparations [61,62]. In view of clinical application, however, there is concern about potential risk of horizontal infection between species [63]. Although closed housing and breeding of carefully selected specific pathogen-free sheep herd could possibly control infections, the risk of unknown pathogens cannot be eliminated [64]. Therefore, further study and constant vigilance are inevitable.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Norio Nakatsuji (Kyoto University, Kyoto, Japan) and Yasushi Kondo (Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Osaka, Japan) for providing cyES cells. We acknowledge Chieko Ohno for technical assistance. This study was supported by grants (JMS 21st Century COE Program, High-tech Research Center Program, and KAKENHI) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan as well as grants (KAKENHI) from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

REFERENCES

- Thomson JA, J Itskovitz-Eldor, SS Shapiro, MA Waknitz, JJ Swiergiel, VS Marshall and JM Jones. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- Reubinoff BE, MF Pera, CY Fong, A Trounson and A Bongso. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nature Biotechnol* 18:399-404.
- Bjorklund LM, R Sanchez-Pernaute, S Chung, T Andersson, IY Chen, KS McNaught, AL Brownell, BG Jenkins, C Wahlestedt, KS Kim and O Isacson. (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2344-2349.
- Asano T, N Agetama, K Takeuchi, M Momoeda, Y Kitano, K Sasaki, Y Ueda, Y Suzuki, Y Kondo, R Torii, M Hasegawa, S Ookawara, K Harii, K Terao, K Ozawa and Y Hanazono. (2003). Engraftment and tumor formation after allogeneic *in utero* transplantation of primate embryonic stem cells. *Transplantation* 76:1061-1067.
- Auchincloss H, Jr. and DH Sachs. (1998). Xenogeneic transplantation. *Annu Rev Immunol* 16:433-470.
- Sablinski T, DW Emery, R Monroy, RJ Hawley, Y Xu, P Gianello, T Lorf, T Kozlowski, M Bailin, DK Cooper, AB Cosimi and DH Sachs. (1999). Long-term discordant xenogeneic (porcine-to-primate) bone marrow engraftment in a monkey treated with porcine-specific growth factors. *Transplantation* 67:972-977.
- Gritsch HA, RM Glaser, DW Emery, LA Lee, CV Smith, T Sablinski, JS Am, DH Sachs and M Sykes. (1994). The importance of nonimmune factors in reconstitution by discordant xenogeneic hematopoietic cells. *Transplantation* 57:906-917.
- Kehat I, L Khimovich, O Caspi, A Gepstein, R Shofti, G Arbel, I Huber, J Satin, J Itskovitz-Eldor and L Gepstein. (2004). Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnol* 22:1282-1289.
- Silverstein AM, RA Prendergast and KL Kraner. (1964). Fetal Response to Antigenic Stimulus. IV. Rejection of Skin Homografts by the Fetal Lamb. *J Exp Med* 119:955-964.
- Flake AW, MR Harrison, NS Adzick and ED Zanjani. (1986). Transplantation of fetal hematopoietic stem cells *in utero*: the creation of hematopoietic chimeras. *Science* 233:776-778.
- Zanjani ED, MG Pallavicini, JL Ascensao, AW Flake, RG Langlois, M Reitsma, FR MacKintosh, D Stutes, MR Harrison and M Tavassoli. (1992). Engraftment and long-term expression of human fetal hemopoietic stem cells in sheep following transplantation *in utero*. *J Clin Invest* 89:1178-1188.
- Civin CI, G Almeida-Porada, MJ Lee, J Olweus, LW Terstappen and ED Zanjani. (1996). Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells *in vivo*. *Blood* 88:4102-4109.
- Flake AW and ED Zanjani. (1999). *In utero* hematopoietic stem cell transplantation: ontogenic opportunities and biologic barriers. *Blood* 94:2179-2191.
- Fujiki Y, K Fukawa, K Kameyama, O Kudo, M Onodera, Y Nakamura, K Yagami, Y Shiina, H Hamada, A Shibuya and H Nakauchi. (2003). Successful multilineage engraftment of human cord blood cells in pigs after *in utero* transplantation. *Transplantation* 75:916-922.
- Narayan AD, JL Chase, RL Lewis, X Tian, DS Kaufman, JA Thomson and ED Zanjani. (2006). Human embryonic stem cell-derived hematopoietic cells are capable of engrafting primary as well as secondary fetal sheep recipients. *Blood* 107:2180-2183.
- Sasaki K, Y Nagao, Y Kitano, H Hasegawa, H Shibata, M Takatoku, S Hayashi, K Ozawa and Y Hanazono. (2005). Hematopoietic microchimerism in sheep after *in utero* transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells. *Transplantation* 79:32-37.
- Menard C, AA Hagege, O Agbulut, M Barro, MC Morichetti, C Brasselet, A Bel, E Messas, A Bissery, P Bruneval, M Desnos, M Puceat and P Menasche. (2005). Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic

- stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet* 366:1005–1012.
18. Bonnevie L, A Bel, L Sabbah, N Al Attar, P Pradeau, B Weill, F Le Deist, V Bellamy, S Peyrard, C Menard, M Desnos, P Bruneval, P Binder, AA Hagege, M Puceat and P Menasche. (2007). Is xenotransplantation of embryonic stem cells a realistic option? *Transplantation* 83:333–335.
 19. Symonds ME, A Mostyn and T Stephenson. (2001). Cytokines and cytokine receptors in fetal growth and development. *Biochem Soc Trans* 29:33–37.
 20. Takada T, Y Suzuki, Y Kondo, N Kadota, K Kobayashi, S Nito, H Kimura and R Torii. (2002). Monkey embryonic stem cell lines expressing green fluorescent protein. *Cell Transplant* 11:631–635.
 21. Suemori H, T Tada, R Torii, Y Hosoi, K Kobayashi, H Imahie, Y Kondo, A Iritani and N Nakatsuji. (2001). Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSL. *Dev Dyn* 222:273–279.
 22. Fujimoto Y, K Hasegawa, H Suemori, J Ito and N Nakatsuji. (2006). Molecular cloning and function of Oct-3 isoforms in cynomolgus monkey embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 15:566–574.
 23. Andreoletti O, P Berthon, E Levavasseur, D Marc, F Lantier, E Monks, JM Elsen and F Schelcher. (2002). Phenotyping of protein-prion (PrP^{Sc})-accumulating cells in lymphoid and neural tissues of naturally scrapie-affected sheep by double-labeling immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 50:1357–1370.
 24. Scanlan CM, ed. (1998). *Introduction to Veterinary Bacteriology*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
 25. Kaufman DS and JA Thomson. (2002). Human ES cells—haematopoiesis and transplantation strategies. *J Anat* 200: 243–248.
 26. Hasegawa K, T Fujioka, Y Nakamura, N Nakatsuji and H Suemori. (2006). A method for the selection of human embryonic stem cell sublines with high replating efficiency after single-cell dissociation. *Stem Cells* 24:2649–2660.
 27. Okamura K, K Asahina, H Fujimori, R Ozeki, K Shimizu-Saito, Y Tanaka, K Teramoto, S Arai, K Takase, M Kataoka, Y Soeno, C Tateno, K Yoshizato and H Teraoka. (2006). Generation of hybrid hepatocytes by cell fusion from monkey embryoid body cells in the injured mouse liver. *Histochem Cell Biol* 125:247–257.
 28. Nussbaum J, E Minami, MA Lafamme, JA Virag, CB Ware, A Masino, V Muskheli, L Pabon, H Reinecke and CE Murry. (2007). Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J* 21:1345–1357.
 29. Nichols J, B Zevnik, K Anastasiadis, H Niwa, D Klewe-Nebenius, I Chambers, H Scholer and A Smith. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379–391.
 30. Niwa H, J Miyazaki and AG Smith. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genet* 24:372–376.
 31. Cooke MJ, M Stojkovic and SA Przyborski. (2006). Growth of teratomas derived from human pluripotent stem cells is influenced by the graft site. *Stem Cells Dev* 15: 254–259.
 32. Sawyer M, J Moe and BI Osburn. (1978). Ontogeny of immunity and leukocytes in the ovine fetus and elevation of immunoglobulins related to congenital infection. *Am J Vet Res* 39:643–648.
 33. Miyasaka M and B Morris. (1988). The ontogeny of the lymphoid system and immune responsiveness in sheep. *Prog Vet Microbiol Immunol* 4:21–55.
 34. Drukker M, H Katchman, G Katz, S Even-Tov Friedman, E Shezen, E Hornstein, O Mandelboim, Y Reisner and N Benvenisty. (2006). Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem Cells* 24:221–229.
 35. Fox A, J Mountford, A Braakhuis and LC Harrison. (2001). Innate and adaptive immune responses to nonvascular xenografts: evidence that macrophages are direct effectors of xenograft rejection. *J Immunol* 166:2133–2140.
 36. Li L, ML Baroja, A Majumdar, K Chadwick, A Rouleau, L Gallacher, I Ferber, J Lebkowski, T Martin, J Madrenas and M Bhatia. (2004). Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties. *Stem Cells* 22:448–456.
 37. Juretic E, A Juretic, B Uzarevic and M Petroveci. (2001). Alterations in lymphocyte phenotype of infected preterm newborns. *Biol Neonate* 80:223–227.
 38. Thornton CA, JW Upham, ME Wikstrom, BJ Holt, GP White, MJ Sharp, PD Sly and PG Holt. (2004). Functional maturation of CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺CD45RA⁺ T regulatory cells in human neonatal T cell responses to environmental antigens/allergens. *J Immunol* 173:3084–3092.
 39. Chong AS, J Shen, J Tao, D Yin, A Kuznetsov, M Hara and LH Philipson. (2006). Reversal of diabetes in non-obese diabetic mice without spleen cell-derived beta cell regeneration. *Science* 311:1774–1775.
 40. Hori S, T Nomura and S Sakaguchi. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057–1061.
 41. Yagi H, T Nomura, K Nakamura, S Yamazaki, T Kitawaki, S Hori, M Maeda, M Onodera, T Uchiyama, S Fujii and S Sakaguchi. (2004). Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol* 16:1643–1656.
 42. Condomines M, P Quittet, ZY Lu, L Nadal, P Latry, E Lopez, M Baudard, G Requirand, C Duperray, JF Schved, JF Rossi, K Tarte and B Klein. (2006). Functional regulatory T cells are collected in stem cell autografts by mobilization with high-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor. *J Immunol* 176:6631–6639.
 43. Cooper DK, B Gollackner and DH Sachs. (2002). Will the pig solve the transplantation backlog? *Annu Rev Med* 53:133–147.
 44. Sachs DH. (1994). The pig as a potential xenograft donor. *Vet Immunol Immunopathol* 43:185–191.
 45. Minanov OP, S Itescu, FA Neethling, AS Morgenthau, P Kwiatkowski, DK Cooper and RE Michler. (1997). Anti-Gal IgG antibodies in sera of newborn humans and baboons and its significance in pig xenotransplantation. *Transplantation* 63:182–186.

46. Galili U, SB Shohet, E Kobrin, CL Stults and BA Macher. (1988). Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 263:17755-17762.
47. Galili U, MR Clark, SB Shohet, J Buehler and BA Macher. (1987). Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1-3Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1369-1373.
48. Abe M, J Qi, M Sykes and YG Yang. (2002). Mixed chimerism induces donor-specific T-cell tolerance across a highly disparate xenogeneic barrier. *Blood* 99:3823-3829.
49. Lan P, L Wang, B Diouf, H Eguchi, H Su, R Bronson, DH Sachs, M Sykes and YG Yang. (2004). Induction of human T-cell tolerance to porcine xenoantigens through mixed hematopoietic chimerism. *Blood* 103:3964-3969.
50. Lan P, N Tonomura, A Shimizu, S Wang and YG Yang. (2006). Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34⁺ cell transplantation. *Blood* 108:487-492.
51. Bonde S and N Zavazava. (2006). Immunogenicity and engraftment of mouse embryonic stem cells in allogeneic recipients. *Stem Cells* 24:2192-2201.
52. Wood KJ and S Sakaguchi. (2003). Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nature Rev Immunol* 3:199-210.
53. Graca L, SP Cobbold and H Waldmann. (2002). Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med* 195:1641-1646.
54. Lee MK 4th, DJ Moore, BP Jarrett, MM Lian, S Deng, X Huang, JW Markmann, M Chiaccio, CF Barker, AJ Caton and JF Markmann. (2004). Promotion of allograft survival by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: evidence for in vivo inhibition of effector cell proliferation. *J Immunol* 172: 6539-6544.
55. Sun Z, L Zhao, H Wang, L Sun, H Yi and Y Zhao. (2006). Presence of functional mouse regulatory CD4⁺CD25⁺T cells in xenogeneic neonatal porcine thymus-grafted athymic mice. *Am J Transplant* 6:2841-2850.
56. Takahata Y, A Nomura, H Takada, S Ohga, K Furuno, S Hikino, H Nakayama, S Sakaguchi and T Hara. (2004). CD25⁺CD4⁺ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp Hematol* 32: 622-629.
57. Michaelsson J, JE Mold, JM McCune and DF Nixon. (2006). Regulation of T cell responses in the developing human fetus. *J Immunol* 176:5741-5748.
58. Gertow K, S Wolbank, B Rozell, R Sugars, M Andang, CL Parish, MP Imreh, M Wendel and L Ahrlund-Richter. (2004). Organized development from human embryonic stem cells after injection into immunodeficient mice. *Stem Cells Dev* 13:421-435.
59. Kyba M, RC Perlingeiro and GQ Daley. (2002). HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* 109:29-37.
60. Lu SJ, Q Feng, S Caballero, Y Chen, MA Moore, MB Grant and R Lanza. (2007). Generation of functional heman-gioblasts from human embryonic stem cells. *Nature Methods* 4:501-509.
61. Fujikawa T, SH Oh, L Pi, HM Hatch, T Shupe and BE Petersen. (2005). Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. *Am J Pathol* 166:1781-1791.
62. Shibata H, N Ageyama, Y Tanaka, Y Kishi, K Sasaki, S Nakamura, S Muramatsu, S Hayashi, Y Kitano, K Terao and Y Hanazono. (2006). Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey embryonic stem cells in the allogeneic setting. *Stem Cells* 24:1450-1457.
63. Wootton SK, CL Halbert and AD Miller. (2005). Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours. *Nature* 434:904-907.
64. Klymiuk N, M Muller, G Brem and B Aigner. (2003). Characterization of endogenous retroviruses in sheep. *J Virol* 77:11268-11273.

Address reprint requests to:

Dr. Yutaka Hanazono
 Professor, Division of Regenerative Medicine
 Center for Molecular Medicine
 Jichi Medical University
 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke
 Tochigi 329-0498, Japan.

E-mail: hanazono@jichi.ac.jp

Received for publication July 6, 2007; accepted after revision November 19, 2007.

サルを用いた幹細胞研究

花園 豊

臨床血液 第49巻第4号 別刷

(2008年4月)

サルを用いた幹細胞研究

花園 豊

Key words : Non-human primates, Large animals, Monkeys, Stem cells, ES cells, iPS cells

1. はじめに

1990年、アメリカでいわゆる「アニッサの事例」が起った。白血病の少女アニッサを助けるためには骨髄移植しかなかった。しかし適合ドナーが見つからない中、両親はもう一人子供を作る決心をした。その子の骨髄をアニッサに移植しようと、HLAが適合する4分の1の可能性に両親は賭けた。1990年妹マリッサが誕生した。幸いHLAが適合し、翌年妹マリッサからアニッサへの移植手術が行われ無事成功した。現在、姉妹とも健在だそうである。

さて、20XX年、アニッサはどのような治療を受けることになるか予想しよう (Fig. 1)。白血病に冒されたアニッサを助けるには組織が適合する骨髄移植しかないが、適合ドナーはやはり見つからなかった。しかし、両親はもはやもう一人子どもを作る必要はない。ES細胞治療が可能になったからである。まずアニッサの皮膚細胞を取り、その核を提供された卵子に移植する (体細胞核移植)¹⁾。そこからできる胚盤胞からES細胞を取り出す。適当な方法によってES細胞を造血幹細胞に分化させ、それを移植する。あるいは、山中教授の技術を使って、皮膚細胞から人工ES細胞 (iPS細胞) を誘導すれば、一気にES細胞までバイパスできてしまう²⁻⁴⁾。いずれの方法でも、自分の細胞から出来た造血幹細胞だから完全に適合する。アニッサは元気になって退院する。

外側の輪 (Fig. 1) を使ったマウスの治療モデル (重症複合型免疫不全症, SCID) は2002年4月Cell誌に発表された⁵⁾。バイパス路のiPS細胞を利用するマウスモデル (鎌状赤血球貧血症) は2007年12月Science誌に発表された⁶⁾。いずれも病気の遺伝子に対して、ES細胞またはiPS細胞の段階で遺伝子治療 (相同組換えによる遺伝子修復) を行なっている。この二つの報告は、アメリカのJaenischらのグループによる発表である。幹細胞

治療に関して確かに目指すべきゴールは見えてきた。臨床応用もすぐそこまで来ているように考えられがちだが、本当にそうだろうか? 本稿では、私どもの研究成果をもとに、臨床応用にあたっての問題点をみていきたい。

2. 造血幹細胞遺伝子治療の研究を振り返る

私は1995年アメリカの国立保健衛生研究所 (NIH) に留学して以来、造血幹細胞遺伝子治療の研究に従事してきた。造血幹細胞遺伝子治療とiPS細胞治療は、似たところがある。どちらも幹細胞を利用した治療であり、どちらもレトロウイルスベクターで遺伝子を導入した細胞を体内に移植する治療である。したがって、造血幹細胞遺伝子治療の研究は、将来のiPS細胞治療 (またはES細胞遺伝子治療) を考える上で参考になると思われる。

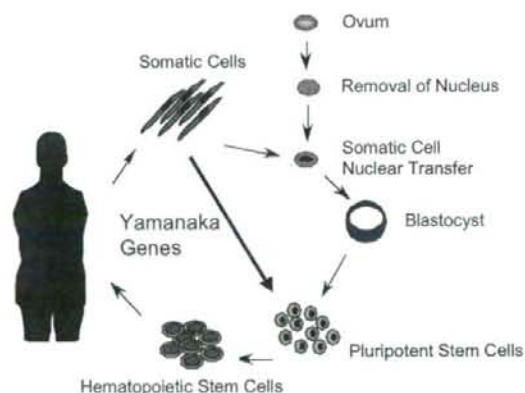


Fig. 1 Stem cell therapy in the near future.

Patient skin cells will be converted to pluripotent stem cells by somatic cell nuclear transfer¹⁾ or by four (or three) factors defined by Yamanaka^{2,3)}. The pluripotent stem cells may be induced to differentiate into hematopoietic stem cells, and the cells can be used for therapeutic transplantation back to the patient.

Table 1 Difference between mice and humans implicated from the study on hematopoietic stem cell gene therapy.

○ means good results. × means not so good results.

Disease	ADA Deficiency	Gaucher Disease	Fanconi Anemia	Chronic Granulomatous Disease	X-linked Severe Combined Immunodeficiency
Mice (1980s)	○ ⁷⁾	○ ⁸⁾	○ ⁹⁾	○ ¹⁰⁾	○ ¹¹⁾
Humans (1990s)	× ¹²⁾	× ¹³⁾	× ¹⁴⁾	× ¹⁵⁾	—
1995	Orkin-Motulsky Panel Calls for Basic Research and Large Animal Study				
Humans (2000s)	○ ¹⁶⁾ Italy			○ ¹⁷⁾ Germany	○ ¹⁸⁾ France Excellent efficacy but caused leukemia ¹⁹⁾

この研究を振り返ってみたい (Table 1)。

1980年代、造血幹細胞を使ってマウスの血液疾患を遺伝子治療するという研究が行われた⁷⁻¹¹⁾。これらは大いに成功したため、気をよくしたアメリカは90年代に入ると早速ヒトに応用した¹²⁻¹⁵⁾。ところが、その結果は芳しくなかった。業を煮やしたNIHは、1995年に「基礎研究重視・サル研究推進」を唱えるレポートを出した。

ちょうどこの時期にNIHに行った私は、この勧告に従い、サルを使った研究を始めた。そして、マウスの技術をヒト向けに改良することは、まったく別の技術を作ることだと知った。多くの研究者が地道な基礎研究を重ねた結果、2000年代になってようやく、いくつかのヒト疾患で治療成功例が出始めた¹⁶⁻¹⁸⁾。なかでもX染色体性重症複合型免疫不全症 (X-SCID) の治療成績は抜群で、骨髓移植以外、なすすべのなかった致死性の疾患から患者さんを救った。ところが、治療を受けた患者さんの半数近くに白血病という重い副作用が出た¹⁹⁾。これはマウスの実験では確認されていない副作用だったので、研究者たちは驚いた。

なぜマウスでは白血病を確認できなかったのか？ 実はマウスが一生 (2年間) かけて作る数の赤血球を、ヒトはたった1日で作っている²⁰⁾。これでは、たとえ100匹のマウスを一生追跡しても、ヒトの100日分にしかならない。これが、大型動物でない腫瘍を検出しづらい理由の1つと思われる。以上、私自身が行ってきた造血幹細胞遺伝子治療の研究から学んだことは、ヒトには

マウスと異なる大型動物独特の生物学があるので、サル等の大型動物を用いた研究が重要であるということだ。

3. ES細胞治療のサルを用いた模擬実験

私どもは、マウスで成功した、前述のES細胞またはiPS細胞による個体造血の再生実験をサルで実施することを試みた。しかし、サルのiPS細胞はまだないし、サルES細胞を普通のサルに移植したのでは免疫拒絶されてしまい、実験にならない。免疫不全マウスのような免疫不全動物は、サルでは存在しない。そこで、サル胎仔への移植実験を考えた (Fig. 2)。胎仔 (とくにfirst trimester) は、胸腺がないから免疫学的に未成熟であり、ヌードマウスに相当するといえる。たとえ異種の細胞を移植しても拒絶されることなく生着する²¹⁾。胎仔への移植は、別のメリットもある。胎仔は日に日に大きくなるため、特別な前処置をしなくても、生着のためのスペースが自然に生まれ、前処置を特段必要としないことや、子宮内は無菌環境だから移植後の無菌管理が不要と言ったメリットである^{22, 23)}。

未分化のままのサルES細胞を成体サルに移植してもそもそも生着しないし腫瘍も作らないが、サル胎仔に移植すれば期待通り奇形腫を作る^{24, 25)}。重要なのは、腫瘍形成は注射針軌跡上の腹腔および胸腔に限られ、実質臓器に腫瘍はできないことである。すなわち、漏れた細胞が腫瘍を作る可能性が高い。漏れずに移植する技術が腫瘍形成予防のために実は重要である。

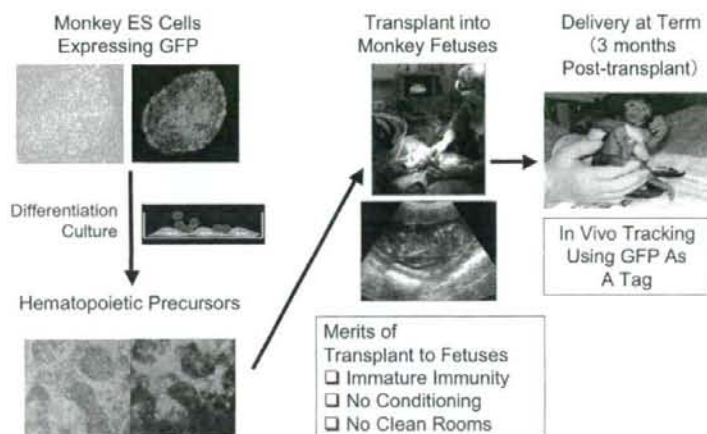


Fig. 2 Procedures for transplanting monkey ES cells into fetal monkeys.

興味深いのは、移植を受けたサル胎仔の各組織に ES 由来細胞のいわゆる「生着」が見られたことである²⁴⁾。前述の通り実質臓器には腫瘍は出来ないが、どの組織にも約 1% の移植由来細胞を認めた。しかも、周囲の細胞と同じ形態を示していたことから、移植した ES 細胞は、生着の場に応じて分化したか、または既存細胞と融合した結果、周囲と同じ表現型を得たものと考えられる。胎仔がレシピエントの場合、未分化 ES 細胞は本来、各組織へ生着しうるが、それが漏れた場合は奇形腫を作るらしい。こうしたことは、小型のマウスを使った実験からは知られていなかったことである。

次に、サル ES 細胞を試験管内で前造血細胞へ分化させてからサルの胎仔へ移植し、生まれたサルの体内で移植細胞の運命を調べた²⁵⁾。結果は、期待通り造血系を一部再構築できたものの、移植由来キメラ率は 4~5% と、マウスの成功例に比べるとそれほど高くなかった。今後は、マウスで報告された ES/iPS 細胞による造血再生技術を、霊長類向けに改良していく必要がある。

さらに問題なのは、全例で奇形腫が見られたことで、腫瘍形成リスクは高いと言わざるを得ない。分化培養後の細胞を移植したのに、なぜ腫瘍を形成したのか？ 実は、サル ES 細胞を 1 週間近く分化培養しても、40% ほどの細胞が未分化のままであることがわかった。残存した未分化細胞が腫瘍形成の原因の 1 つであると考えられた。したがって、腫瘍形成の予防のためには、未分化細胞の除去が鍵である。霊長類 ES 細胞の未分化表面マーカーである SSEA-4 の陽性細胞を除去してから移植すると、移植後の造血再生を損なうことなく、腫瘍形成は全く認められなかった。SSEA-4 は、臨床的なステムネス・マーカーといってよい。(マウス ES 細胞では SSEA-1 陽

性だが、霊長類 ES 細胞では SSEA-4 陽性である。)

さて、造血系に分化させた場合ではなく、神経系に分化させた場合の結果はどうか。サルのパーキンソン病モデルを作製して、その線条体にサル ES 由来神経幹細胞を移植すると、1~2 ヶ月後にはドーパミン産生ニューロンの生着が確認できる。しかし、移植 5 ヶ月後には、腫瘍の形成が見られた。腫瘍は、やはり注射針の軌跡上に出来た。この腫瘍形成は、SSEA-4 陽性細胞を除去してから移植することで予防できた²⁶⁾。未分化マーカー SSEA-4 を用いるネガティブ・セレクション法は、ES 細胞を用いた移植・再生医療の安全性の向上のために普遍的な応用が期待できる。

ところで、サルで全例腫瘍を形成した同じ前造血細胞を、こんどは免疫不全マウスやヒツジ胎仔に移植するとどうなるか？ Table 2 に示した通り、これらの動物を用いた場合は、腫瘍形成が少ないことから、こうした異種移植実験では腫瘍形成リスクを過少評価する可能性がある。安全性の評価には、サルの同種移植実験が必要である。

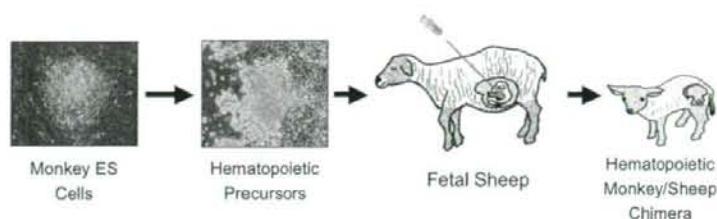
4. ヒツジの利用

サル胎仔への移植実験は費用と手間がかかる。他の動物への移植も考えてみたい。マウスを使った実験結果は、そのサイズの故か、ヒトまで外挿できないことが多い。ヒトは単にマウスを大きくしただけではないのである。大型動物を用いる実験が必要な所以である²⁷⁾。

大型動物を用いる実験として、イヌがよく用いられてきた。アメリカなどではイヌの骨髄移植がペット医療として行われている。イヌのペットとしての長い歴史から、手法や試薬の多様性はヒトのそれに通じるものがあり、

Table 2 Formation of tumors post-transplant depending on recipients.

Cells	Fetal Monkeys	Immunodeficient Mice (NOD/SCID)	Fetal Sheep
Undifferentiated Monkey ES Cells	3/3	5/5	4/15
Monkey ES Cell-Derived Hematopoietic Precursors	3/3	2/5	1/10



Sheep No. 141

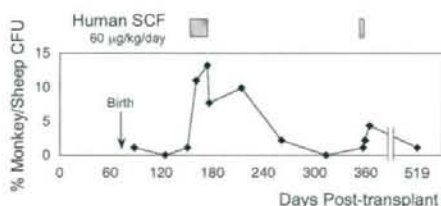


Fig. 3 In utero transplantation of monkey ES-derived cells into fetal sheep.

Monkey ES cells were induced to differentiate to hematopoietic precursors. The cells were transplanted into fetal sheep. After birth, marrow cells (colony-forming unit, CFU) were examined for monkey versus sheep hematopoiesis. Some lambs were administered with human stem cell factor (SCF) to selectively stimulate monkey hematopoiesis.

実験を行う上で有利である。ヒトの骨髄移植でノーベル賞を受賞した Thomas らのグループは、もともとイヌを用いた実験から骨髄移植の基礎を築いた。

しかし、譲渡犬の実験使用は禁止される傾向にあり、コロニー化されたビーグル犬が今後の実験使用の中心になる。血友病や筋ジストロフィーのコロニーも存在するので、特定の実験目的にはたいへん都合がよい^{28, 29)}。しかし、その場合の手間と費用はサルの場合とあまり変わらないことから、サルの代りの低コスト実験というわけにはいかない。

そういうこともあって、ES細胞を移植するという名誉に与った大型動物は、サルの他は、今のところイヌではなく、ブタとヒツジである³⁰⁻³⁴⁾。移植部位は、子宮内胎仔または虚血心筋が報告されている。私どもは、ヒツジ胎仔への子宮内移植を行なっている。ヒトとヒツジはよ

ほど相性がいいらしく、ヒツジ胎仔へのヒト細胞移植実験は比較的早くから行なわれている。

なぜヒツジか？ そもそもヒツジ胎仔への幹細胞移植実験は、アメリカの Zanjani と Flake らによって始められた。彼らは、1990年代、ヒト造血幹細胞をヒツジ胎仔に移植して、ヒトの血液をもつヒツジの作製に成功した³⁵⁾。ヒト造血幹細胞をさまざまな動物胎仔に移植して造血キメラを作ると、ヒトキメラ率には種差があって、ヒト-ヒツジ間で特に高い。しかもヒツジは流産率が低い。

私どもは、サル ES細胞をヒツジ胎仔に移植する実験を行ない、肉眼的なサル/ヒツジキメラの作出に成功している³³⁾。また、サル ES細胞を前造血細胞に分化培養後、ヒツジ胎仔に移植する実験を行ない、生後、約1%のサル/ヒツジ造血キメラの作出に成功した (Fig. 3)³⁴⁾。ヒツジ胎仔への移植実験は、大型動物を用いた、幹細胞

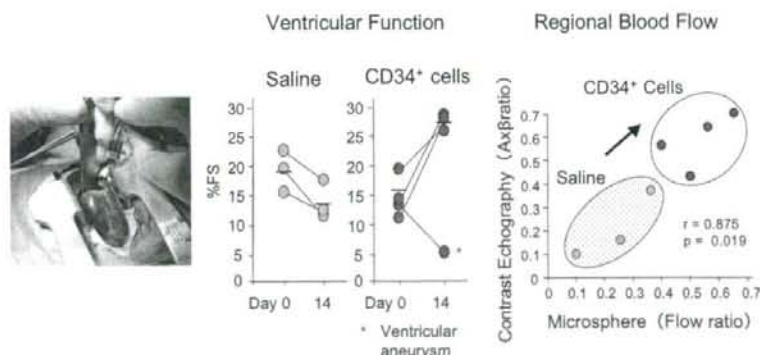


Fig. 4 Hematopoietic stem cells work well for myocardial infarction.

In a monkey myocardial infarction model, autologous CD34⁺ cells were transplanted to the infarcted heart. Significantly increased ventricular function and regional blood flow was observed. The regional blood flow was assessed by two independent methods.

の *in vivo* アッセイ系としてきわめて有用である。

5. 心筋梗塞に対する幹細胞治療

2001年、マウスの心筋梗塞に造血幹細胞を局所に移植した結果、移植細胞が内皮細胞や心筋細胞へと分化し、心機能の改善が認められたという報告があった³⁶⁾。さっそく世界各地で、患者さん自身の骨髄細胞を心筋梗塞の局所に移植する治療が行われ、大きな副作用もなく治療効果があがった^{37~42)}。

私たちは、いきなり患者さんに試す前にサルで試し、この治療がほんとうに効くことを確かめた (Fig. 4)⁴³⁾。しかし問題は、どうして効くのかである。多くの人は、それは移植した幹細胞が内皮細胞や心筋細胞に分化したからだと考えた。しかし私たちが調べてみたところ、移植細胞からこれらの細胞はできていなかった。実は移植した細胞 (CD34⁺細胞) は、さまざまなサイトカインを分泌しており、これが血管新生を促しているらしいことがわかった。心筋梗塞の幹細胞治療は確かに効くが、移植した細胞は「幹細胞」として働くのではなく「サイトカイン工場」として働いていたのである。

6. 結 語

私どもは、大型動物 (サル・ヒツジ) を用いた前臨床研究を体系的に実施できる数少ない研究チームであり、真にトランスレーショナルな研究を推進してきた。本稿で述べた、最近の成果は、以下のようにまとめられる。

1) ES細胞の移植によってサルの造血を一部 (2~5%) 再構築できたが、腫瘍形成の危険性は非常に高い。しかしそれは、未分化マーカー SSEA-4 を用いるネガティブ・セレクションによって予防可能である。

2) 免疫不全マウスやヒツジ胎仔を用いる異種移植実験では、腫瘍形成の危険性を過少評価する。安全性の評価には、サルの同種移植実験が必要である。

3) サル ES細胞を利用して、サルの血液をもつヒツジの作出に成功した。ヒツジは、幹細胞の *in vivo* アッセイ系として有用である。

4) 心筋梗塞の幹細胞治療は確かに効くことをサルで示した。しかし移植細胞は、内皮や心筋に分化する「幹細胞」として働くのではなく、「サイトカイン工場」として働いていた。

ヒトは決してマウスを大きくしただけではない。今後、サルやヒツジを用いて、マウスからヒトへの真の「橋渡し」研究を実施し、幹細胞治療の有効性と安全性をしっかりと検証しながら、臨床応用につなげるための基盤技術を提供していきたい。

文 献

- 1) Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature*. 2007; **450**: 497-502.
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; **131**: 861-872.
- 3) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008; **26**: 101-106.
- 4) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; **318**: 1917-1920.
- 5) Rideout WM 3rd, Hochedlinger K, Kyba M, Daley GQ, Jaenisch R. Correction of a genetic defect by nuclear trans-

- plantation and combined cell and gene therapy. *Cell*. 2002; **109**: 17-27.
- 6) Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007; **318**: 1920-1923.
 - 7) Lim B, Apperley JF, Orkin SH, Williams DA. Long-term expression of human adenosine deaminase in mice transplanted with retrovirus-infected hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; **86**: 8892-8896.
 - 8) Correll PH, Fink JK, Brady RO, Perry LK, Karlsson S. Production of human glucocerebrosidase in mice after retroviral gene transfer into multipotential hematopoietic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; **86**: 8912-8916.
 - 9) Liu JM, Kim S, Walsh CE. Retroviral-mediated transduction of the fanconi anemia C complementing (FACC) gene in two murine transplantation models. *Blood Cells Mol Dis*. 1995; **21**: 56-63.
 - 10) Björgvinsdóttir H, Ding C, Pech N, Gifford MA, Li LL, Dinauer MC. Retroviral-mediated gene transfer of gp91phox into bone marrow cells rescues defect in host defense against *Aspergillus fumigatus* in murine X-linked chronic granulomatous disease. *Blood*. 1997; **89**: 41-48.
 - 11) Lo M, Bloom ML, Imada K, et al. Restoration of lymphoid populations in a murine model of X-linked severe combined immunodeficiency by a gene-therapy approach. *Blood*. 1999; **94**: 3027-3036.
 - 12) Kohn DB, Hershfield MS, Carbonaro D, et al. T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med*. 1998; **4**: 775-780.
 - 13) Dunbar CE, Kohn DB, Schiffmann R, et al. Retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34+ cells from patients with Gaucher disease: *in vivo* detection of transduced cells without myeloablation. *Hum Gene Ther*. 1998; **9**: 2629-2640.
 - 14) Liu JM, Kim S, Read EJ, et al. Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (FANCC). *Hum Gene Ther*. 1999; **10**: 2337-2346.
 - 15) Malech HL, Maples PB, Whiting-Theobald N, et al. Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; **94**: 12133-12138.
 - 16) Aiuti A, Slavin S, Aker M, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*. 2002; **296**: 2410-2413.
 - 17) Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med*. 2006; **12**: 401-409.
 - 18) Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. 2000; **288**: 669-672.
 - 19) Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003; **302**: 415-419.
 - 20) Abkowitz JL, Persik MT, Shelton GH, et al. Behavior of hematopoietic stem cells in a large animal. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; **92**: 2031-2035.
 - 21) Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*. 2000; **6**: 1282-1286.
 - 22) Flake AW, Roncarolo MG, Puck JM, et al. Treatment of X-linked severe combined immunodeficiency by in utero transplantation of paternal bone marrow. *N Engl J Med*. 1996; **335**: 1806-1810.
 - 23) Wengler GS, Lanfranchi A, Frusca T, et al. In-utero transplantation of parental CD34 haematopoietic progenitor cells in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency (SCIDX1). *Lancet*. 1996; **348**: 1484-1487.
 - 24) Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, et al. Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells. *Transplantation*. 2003; **76**: 1061-1067.
 - 25) Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, et al. Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey embryonic stem cells in the allogeneic setting. *Stem Cells*. 2006; **24**: 1450-1457.
 - 26) *Nara Y, Muramatsu S, Takino N, et al. Brain tumor formation after allogeneic transplantation of monkey embryonic stem cells. *Neuropathology*. 2005; **25**: 17.
 - 27) Casal M, Haskins M. Large animal models and gene therapy. *Eur J Hum Genet*. 2006; **14**: 266-272.
 - 28) Sarkar R, Mucci M, Addya S, et al. Long-term efficacy of adeno-associated virus serotypes 8 and 9 in hemophilia A dogs and mice. *Hum Gene Ther*. 2006; **17**: 427-439.
 - 29) Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*. 2006; **444**: 574-579.
 - 30) Ménard C, Hagge AA, Agbulut O, et al. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet*. 2005; **366**: 1005-1012.
 - 31) Narayan AD, Chase JL, Lewis RL, et al. Human embryonic stem cell-derived hematopoietic cells are capable of engrafting primary as well as secondary fetal sheep recipients. *Blood*. 2006; **107**: 2180-2183.
 - 32) Kehat I, Khimovich I, Caspi O, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2004; **22**: 1282-1289.
 - 33) Tanaka Y, Nakamura S, Shibata H, et al. Sustained macroscopic engraftment of cynomolgus embryonic stem cells in xenogeneic large animals after in utero transplantation. *Stem Cells Dev*. 2007 in press.
 - 34) Sasaki K, Nagao Y, Kitano Y, et al. Hematopoietic microchimerism in sheep after in utero transplantation of cultured

- cynomolgus embryonic stem cells. Transplantation. 2005; **79**: 32-37.
- 35) Zanjani ED, Flake AW, Rice H, Hedrick M, Tavassoli M. Long-term repopulating ability of xenogenic transplanted human fetal liver hematopoietic stem cells in sheep. *J Clin Invest*. 1994; **93**: 1051-1055.
- 36) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001; **410**: 701-705.
- 37) Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002; **106**: 3009-3017.
- 38) Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; **106**: 1913-1918.
- 39) Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*. 2003; **361**: 47-49.
- 40) Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003; **107**: 2294-2302.
- 41) Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003; **361**: 45-46.
- 42) Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004; **364**: 141-148.
- 43) Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, et al. Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model. *Stem Cells*. 2005; **23**: 355-364.

ヒツジを用いたサル組織産生法

A Method for Generating Monkey Tissues Using Sheep

—花園 豊*

移植医療においてドナーが絶対的に不足し、それが移植治療普及の足かせになっている。そこで、家畜動物にヒトの組織を作らせたらどうかと考えた。すなわち、ヒトの組織をもつキメラ家畜である。それに向けて筆者らは今回、サルES細胞をヒツジ胎仔に移植する実験を行い、肉眼的なサル/ヒツジキメラの作出に成功した。

1. はじめに

移植医療においてドナーが絶対的に不足し、それが移植治療普及の足かせになっているのは周知の事実である。そこで、家畜動物にヒトの組織を作らせたらどうかと考えた。すなわち、ヒトの組織をもつキメラ家畜である。筆者らは、ヒツジの体内で、ヒトES細胞を分化させてヒトの組織を作らせることを検討することにした。しかし、ヒトES細胞使用は制約が厳しいので、まずサルES細胞を使ってみた。

なぜヒツジなのか？ そもそもマウスでは小さすぎる。ヒツジは流産率が低いので、動物胎仔を利用する研究によく利用されてきた。しかし、将来の実用化を考えると、ヒトとの解剖学的類似性、繁殖面（多産・発育の早さ）、無菌化の点で、ブタの方がヒツジより有利かもしれない。もっとも、宗教上の理由から世界人口の3分の1はブタを食べられないから、ヒツジで実用化をねらう価値は十分ありそうだと考えた。

2. キメラを作る

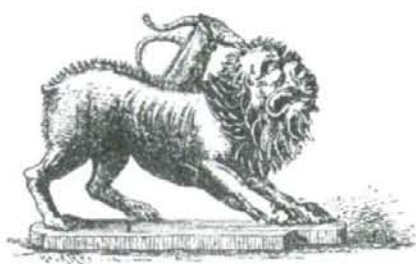
キメラはギリシャ神話に登場する動物である。それは、テュポンとエキドナの娘で、ライオンの頭、ヤギの胴体、ヘビの尻尾を持つという（図1）。リュキアに住み、カリヤ王アミソダレスに育てられたが、ペガソスに乗る英雄ペレロポンに退治された。しかし、なにも外国の神話を持ち出さなくても、日本にもこの種の伝説はある。それは、鶴（ヌエ）と言って、「平家物語」に登場し、サルの顔、タヌキの胴体、トラの手足を持ち、尾はヘビで、「ヒョーヒョー」という鳥のトラツグミの声に似た大変に気味の悪い声で鳴いた、とされる（図1）。鳴き声までキメラであるところはギリシャ神話よりリアルと言えよう。

一方、伝説ではなくて、実在するキメラ（またはヌエ）として、以下の三者が知られている。

- ①接ぎ木によるキメラ植物
- ②初期胚間移植によるウズラとニワトリのキメラ
- ③ES細胞を利用したキメラマウス

*Yutaka Hanazono 自治医科大学 分子病態治療研究センター 再生医学研究部 教授

キメラ



ヌエ



図1 伝説上の動物：キメラとヌエ
1つの動物に2つ以上の異種動物の組織が組み合わさっている。

ヒツジにサルの組織を作らせる

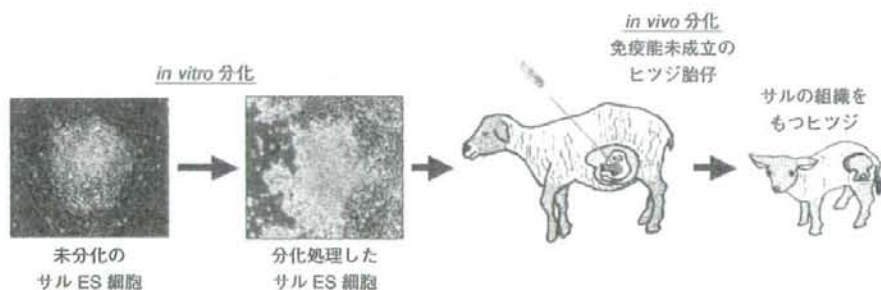


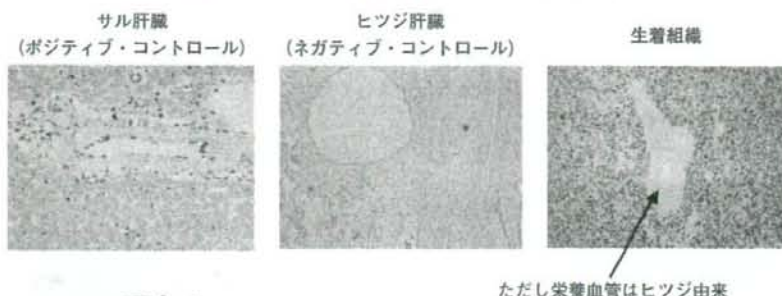
図2 まずサルES細胞を試験管内で適宜分化させる。その細胞を、ヒツジ胎仔に移植する。胎仔の体内で移植細胞の増殖・分化がうまく進めば、サルの組織をもったヒツジが生まれるというスキームである。ヒツジ胎仔は免疫系が未成熟で、移植細胞が拒絶されないというのが前提である

今回の筆者らのキメラ作製法は、②と③の折衷になるだろう。図2にその方法を示す。まずサルES細胞を試験管内で適宜分化させる。その細胞を、ヒツジ胎仔に移植する。胎仔の体内環境の中で、移植細胞の増殖、分化、成熟を進ませる。うまくいけば、サルの組織をもったヒツジが生まれるというスキームである。ヒツジ胎仔はまだ免疫系が未成立で、移植したサルの細胞が拒絶されな

いというのが前提にある。今回はサルES細胞を使ったが、ヒトES細胞を利用すれば、ヒツジにヒトの組織を作らせることができるかもしれない。そうなればいろいろな医療応用が考えられるだろう。

しかし、本当にこんなことが可能なのか、まず未分化のサルES細胞を移植して、生着するかどうかを調べた¹⁾。全部で15頭36か所に未分化の

ヒツジに生着した組織はサルの移植片である
れっきとしたサル/ヒツジキメラ (またはヌエ) !



生着組織の核型=サルの核型

写真2 ヒツジに生着した細胞は、サルに特異的な DNA プローブで染まり、しかも、サルの核型をもっていた。ヒツジの体内に、間違いなくサルの細胞ができたことを示す。ただし、栄養血管はヒツジ由来であった

サル ES 細胞の代わりに、ヒト ES 細胞を使えば、ヒトのグラフトをもつヒツジの作出が可能ということである。もっとも家畜からヒトへの水平感染の可能性が否定できないから、本研究の移植医療への応用はまだ先の話で、今は基礎研究の段階であることを強調しておきたい。

3. ヒツジ体内でサル細胞の運命

さて、サルの細胞がヒツジ胎仔に生着するかしらないかはどんな条件で決まるのだろうか。まず移植した妊娠日数(満期 147 日)が問題になるが、妊娠 50 日を過ぎると全く生着しない。妊娠 50 日以内が必要条件であった。また、移植細胞数をみると、1 か所に百万個より少ないと全く生着しなかった。百万個以上の細胞数が必要であることがわかった。

次に、GFP を発現するサル ES 細胞を使って、移植後の追跡実験を行った。ファースト・トリメスター(妊娠 1/3 期、妊娠 50 日以前)に移植した場合、移植後 5 日目には、GFP 陽性の移植細胞

胞がはっきり検出され、移植 2 週間後には、その GFP 陽性領域の増大が見られた。一方、ファースト・トリメスター以降(妊娠 50 日以降)に移植した場合、移植 5 日目は移植細胞がみられたものの、移植 2 週間後には、GFP 陽性領域は消失し、GFP に染まらない宿主由来の肉芽組織に置き換わり、T 細胞の浸潤が見られるだけで、移植細胞は見事に拒絶されていた。移植細胞の生着のためには、ファースト・トリメスターに移植することが必要である。

4. 異種細胞が拒絶されない理由

ファースト・トリメスター(妊娠 50 日以前)に移植したヒツジでは、移植細胞に対する免疫寛容が誘導されたのだろうか? まず、液性免疫を調べたところ、生下時には移植細胞に対する IgG が検出された。すなわち、液性免疫は誘導されていた。次に細胞性免疫を調べた。サルの奇形腫をもって生まれたヒツジの単核球を使って、混合リンパ球試験 (MLR) を行ったところ、生まれた

生後みられた 腫瘍

15頭 36か所中
4頭 6か所



切除腫瘍



HE染色



免疫組織染色

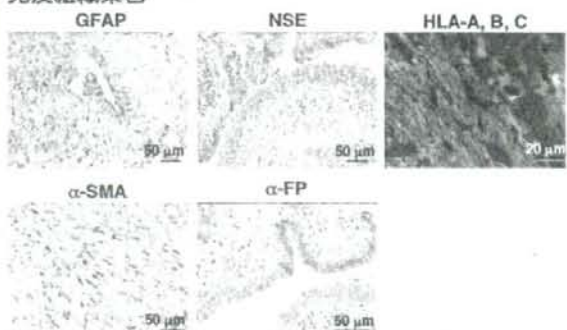


写真1 本当にヒツジにサルの組織を作らせることが可能か、まず未分化のままのサル ES 細胞をヒツジ胎仔に移植して、サルの組織ができるどうかを調べた。その結果、生後、15 頭中 4 頭で腫瘍（コブ）をもつヒツジが生まれた（図の矢印）。腫瘍は成熟型奇形腫だった（巻頭カラー図版参照）
免疫組織染色法で、神経グリアマーカーの GFAP、ニューロンマーカーの NSE、肝臓マーカーの α FP、平滑筋マーカーの α SMA などが陽性の組織構造があった。なお、これらは HLA 陽性だった。HLA 抗体がサルの MHC に交叉したと考えられる。したがって、これら腫瘍は、サルの移植片と考えられた。

ままのサル ES 細胞を移植したところ、4 頭 6 か所で、生後のヒツジに腫瘍（コブ）の形成が認められた。腫瘍を切除し、切片を HE 染色して観察すると、成熟した三胚葉構造をもつ奇形腫（腫瘍の一種、未分化の ES 細胞は免疫不全マウスに移植すると奇形腫を作る性質をもつが、それと同じもの）だった。このことは免疫組織染色でも確認した（写真1）。たとえば、神経グリアマーカーの GFAP、ニューロンマーカーの NSE、肝臓マーカーの α FP、平滑筋マーカーの α SMA などが陽性の組織構造があった。しかも、HLA が陽性だった。ヒツジの細胞が HLA 陽性になるはずはないから、これはサルの MHC と交叉したものと思われた。したがって、たまたまヒツジの奇形腫が合併したのではなく、サルの奇形腫ができた可能性が示唆された。

ほんとうにサルの組織がヒツジにできたことを証明するために、サルゲノムだけを特異的に認識して、ヒツジゲノムは認識しないプローブを使って、生着した組織を染めたところ、明らかにサルのものだとわかった（写真2）。ただし、栄養血管は、宿主のヒツジ由来だった。生着組織の細胞の核型を調べても、それはサルの核型に一致した。ヒツジに生着した組織は、間違いなくサルの移植片（グラフト）で、ヒツジ血管によって栄養されていたのである。別の実験だが、サル ES 細胞を造血系に分化させてからヒツジ胎仔に移植して、サルの血液をもつヒツジの作出にも成功している²⁾。

免疫能正常のヒツジにサルのグラフトがくっついているわけで、これは、神話でなくて本当のカメラといえよう。この結果の示唆するところは、

ヒツジは、移植したES細胞に感作されていることがわかった。つまり、サル組織が長期間にわたってヒツジに生着しているにもかかわらず、移植したサルの細胞に対して液性免疫も細胞性免疫も検出されたわけである。実際、サル組織が生着しているヒツジに、再度、同じサルES細胞を追加移植しても、さらなる生着はみられなかった。したがって、移植細胞に対する、いわゆる免疫寛容は誘導されていないことになる。

サル組織の生着が見られたヒツジでは、移植直後に宿主(ヒツジ)のCD3陽性のT細胞の浸潤が認められる。しかし、サルのグラフトの破壊を伴っていない。一方、B細胞・マクロファージ・好中球の浸潤はほとんど見られなかった。この組織像を見て、サルのグラフトを囲むT細胞は制御性T細胞(Treg)ではないかと推測した。Tregは、免疫反応を抑えるT細胞である。ヒツジのTregに反応する抗体で染めてみると、移植2週間後、案の定、グラフト周囲のT細胞の半分以上がTregだった。移植3か月後の生下時でも、グラフト内のT細胞の10%がTregだった。Tregによって免疫拒絶が抑えられていたと考えられる。生後、免疫能が正常にかかわらず異種動物のグラフトをもつ、すなわち、ギリシャ神話に登場

するようなキメラ(またはヌエ)ができたのは、Tregの働きだったらしい。

5. おわりに

百万個以上のサルES細胞を妊娠50日未満のヒツジ胎仔に移植すると、肉眼的なサルのグラフトをもつヒツジの作製が可能である。このサル/ヒツジキメラでは、サルの細胞に対する免疫寛容は誘導されていなかったが、Tregによって免疫拒絶が抑えられ、長期にわたる「肉眼的」サル/ヒツジキメラ状態を可能にした。将来、サルES細胞の代わりにヒトES細胞を使えば、ヒツジ体内にヒトのグラフトを作製しうることを示した。

[謝辞] 本研究は、宇都宮大学農学部の長尾慶和准教授、国立成育医療センターの林聡博士との共同研究である。

文 献

- 1) Y. Tanaka *et al.*, *Stem Cells Dev.*, 17, 367-382 (2008)
- 2) K. Sasaki *et al.*, *Transplantation*, 79, 32-37 (2005)