

201126034A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

バイオ人工細胞・臓器の開発による糖尿病その他の疾患の治療に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 宮川 周士

平成24(2012)年 5月

目 次

| | |
|--|---|
| I. 総括研究報告 バイオ人工細胞・臓器の開発による糖尿病その他の疾患の治療に関する研究 宮川 周士 | 1 |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. 遺伝子改変ブタに関する研究 長嶋 比呂志 | 5 |
| 2. 遺伝子構築に関する研究 宮川 周士 | 6 |
| 3. 遺伝子構築に関する研究 岡部 勝 | 7 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 8 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 8 |

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
総括研究報告書

バイオ人工細胞・臓器の開発による糖尿病その他の疾患の治療に関する研究

研究代表者 宮川周士

大阪大学大学院医学系研究科 小児成育外科 准教授

研究要旨

医療用バイオ人工細胞・臓器の開発のため遺伝子改変し、ヒトの免疫系になじむブタの作出を目指している。一年目は起こってくる超急性拒絶反応を止める主軸と成る複数の補体制御因子を hybrid 化した分子を作成し、これをブタ細胞で発現を確かめた。また同時に、HLA-E を高発現する変異分子も作成し、細胞での発現を確かめ、ブタに顕微授精 (ICSI-mediated gene transfer) 法を用いて、トランスジェニックブタの作出を試みたが、現時点で流産する結果となった。今後補体制御因子の方とともに、ICSI 法を再度行って行く予定である。

分担研究者

長島比呂志 明治大学農学部生命科学科
教授
岡部 勝 大阪大学遺伝情報実験センター
教授

研究協力者

大阪大学大学院医学系研究科 小児成育外科
上野豪久 (助教) 高間勇一 (医員)
王 丹丹 (院生) 山本志野 (研究員)
南條明子 (研究員) 乾中智佳子 (研究員)
明治大学農学部生命科学科
渡邊 将人 (研究員) 梅山一大 (研究員) 松
成ひとみ (院生)、中野和明 (院生)
大阪大学遺伝情報実験センター
伊川正人 (准教授)

A. 研究目的

目的は、医療用バイオ人工細胞・臓器の開発である。主眼をバイオ人工膵島とし、その細胞供給用の遺伝子改変ブタの作出をめざす。期間内に現有する糖転移酵素 GnT-III と補体制御因子 DAF (CD55) を遺伝子導入、かつ異種抗原 α -Gal を knockout (KO) したブタに、他の補体制御因子、抗凝固因子、細胞性免疫制御分子やレトロウイルス制御用遺伝子を導入し、臨床応用可能な膵島細胞の供給源となるブタを作出する。将来的に糖尿病患者へのこのバイオ人工膵島を足がかりに、劇症肝炎治療へバイオ人工肝臓、透析患者にバイオ人工腎臓の供給を目指す。またこの医療用ブタの開発により、移植医療を抜本的に変えることができ、国民の医療福祉に

絶大な貢献をもたらす事を目的とする。

現況としては、移植用臓器の開発は、我々が異種移植の超急性拒絶反応が宿主の補体と移植片の補体制御因子の種差に起因する反応である事を見だし報告した、それに伴い1990年頃より世界的にベンチャー産業と結び付きヒトの遺伝子を導入 (transgenic: TG)、あるいはブタの遺伝子をつぶした (knockout: KO) 遺伝子改変ブタの開発競争が始まった。米国ではハーバード大、Mayo Clinic、ピッツバーク大で開発が盛んで、ピッツバーク大では、Gal-KO-ブタをベースに、補体制御因子 DAF, 凝固因子である CD39, TFPI, CD39, thrombomodulin (TM), 細胞性免疫の制御を目的とし CTLA4-Ig, HLA-E, TRAIL を発現するブタを既に作成し、かけ合わせで Gal-KO/hCD46/TFPI/CTLA4-Ig ブタを作成している。一方、欧州では "Euro XENOME" プロジェクトを立ち上げ、ナンテ大 (仏) で Gal-KO/CD55/CD59/CD39/HT ブタを作出。ハンノーバー大 (独) で、今年 Gal-KO の作成に成功した。さらに DAF ブタ、TM ブタ、さらに HO-1 ブタを作製、ブタ内在性レトロウイルス (PERV) の knockdown (KD) ブタ、CTLA4-Ig のブタも作成している。また、豪のメルボルン大、韓国ではソウル大、台湾でも台北大学で盛んにブタを開発している。これに対し、我々は、H8年度よりトランジェニックブタ (DAF+糖転移酵素GnT-III) の作成に取りかかり、この線維芽細胞を使って α -Gal 抗原の KO に成功し 2006 年末ホモが産まれた。我々は既に何種類かの特許を所有し、この分野での極めて独自の異種移植用ブタを開発する事を目指している。

一方現在のバイオ人工細胞・臓器の臨床とし

ては、WHO によれば、既に臨床応用に 22 の報告が有り。加えて、2 年前よりニュージーランドでは国会で承認され、免疫隔離膜下の膵島移植の臨床が始まっている。ロシア、アルゼンチンでこれに続いている。

B. 方法

1. 遺伝子の選択。現在世界で遺伝子改変ブタ作製に関係する分子は、

- * 補体制御因子 ----C1-INH, MCP(CD46), DAF(CD55), CD59
- * 糖転移酵素 ----GnT-III, α -1, 2FT, Endo- β -galC
- * 凝固系 (抗凝固因子) ---TFPI, Thrombomodulin(TM), CD39
- * NK 細胞制御--HLA-G, HLA-E,
- * Macrophage 制御--CD47
- * T 細胞制御--CTLA4-Ig, FasL, TRAIL, CIITA
- * 保存-----Hemoxygenase-1,
- * 内在性ブタレトロウイルス (PERV) の KD
- * Hanganutziu-Deicher (H-D) 抗原の遺伝子(CMAH) の KD、等である。

今回の project では、まずは、Gal を KO したブタを base に下線を引いた分子を発現したブタの作出を目指す。

2. 遺伝子構築。

Promoter の選定では、現在使われている promoter は一般的に、CMV や RSV のウイルス promoter、Chick β actin(pCAGGS)、human EF-1 α 、humanmouse H2k、あるいは rat insulin II or pig Insulin promoter である。加えて、導入 gene 本来の promoter である。膵島での遺伝子発現は、一般的に insulin promoter が確実と思われるが、他の臓器での発現が望めない欠点がある。一方、pCAGGS はユビキタスに発現するが、一部の報告では膵島での発現が弱いとされている。今回はより重要と思われる CTDM を insuline promoter で、HLA-E を pCAGGS で発現させることにした。Enhancer には CMV の enhancer を使用した。

諸外国のブタ作出方法はヒトの遺伝子=cDNA や genome を 1 つ 1 つ導入し、高発現の系統を樹立し、交配により重ね合わせる方法である。また、最近では IRES に換え 2A システムを用い、2-3 の分子を繋いで一度に発現させる方法も一部で始められている。

我々は高発現を得るのに、cDNA の codon を

改変しブタで至適なものとする方法を取る。Codon 変換に関しては、各分子のアミノ酸配列を崩さず、ブタで最も頻度の高い t-RNA に合わせた DNA 配列に組み替える方法である。これまでに DAF を codon 変換し in vitro, in vivo (マウス) での強発現を確認している。

* 各分子の機能ドメインを、同分子、別の分子間で繋いだ多重化分子 (hybrid) を作製し、この人工 cDNA をブタに遺伝子導入する方法をとる。<CTDM>

DAF の機能ドメインに関しては、SCR2-3 が補体の classical pathway を制御し、SCR2-4 が alternative pathway を制御する事が判明しているので、SCR2-4 を使った。

同じく、MCP の場合も、補体制御機能が有る SCR2-4 を使った。

さらに、C1-INH に関しては、アミノ酸配列の 1-99 は補体制御機能とは関係ないので、この部分を取り除いた構造を作出した。

Thrombomoduline に関しては、直接抗凝固機能に関与する EGF4-6 と EGF3 の一部を選んだ。

* HLA-Ev(147) (147 番目の S を C に変更する事により高発現が見込まれる)に IRES で human β 2m を繋ぎ合わせた。<HLA-E*>

* CMAH の siRNA 法による KD を試みた。

* PERV の KD も試みた。ブタを使ったバイオ人工細胞・臓器での大きな難題はブタ PERV の存在である。siRNA による KD が効果を現す事を既に in vitro で確かめている。PERV 対策の siRNA の導入は次回になったが、既に H-1 promoter に pol 部分の siRNA を組み込む。又、U6 promoter も用意し、他の部分の siRNA を組み込む。

3. In vitro での確認

ブタの血管内皮細胞 (PEC) 及び繊維芽細胞で検定する。導入方法は、lipid 法 (リポフェクトアミン、等)、あるいは電気ショック法を用いた。

4. Transgenic ブタ作り

顕微授精 (ICSI-mediated gene transfer) 法を用いて、ブタの体外成熟卵に 2 種の遺伝子導入を行い、発生への影響を調べた。用いた遺伝子は C1-INH+Thrombomodulin+DAF+MCPcyt (-) <CTDM> と HLA-Ev(147)+IRES+human β 2-microglobulin(h β 2m) <HLA-E*> である。注入卵の胚盤胞への体外発生によって、導入遺伝子の初期発生への影響を解析した。発生阻害の見

られなかった遺伝子については、遺伝子導入胚の移植により胎仔の獲得を試みた。

C. 結果

1. 作製した遺伝子構築。

*. 補体制御 + α

C1-INH - DAF - DAF
<C1DD>----pCAGGS(chick β actin + CMV enhancer)/C1DD

C1-INH - Thrombomodulin - DAF - MCP <CTDM> ---pCAGGS/CTDM 及び pCPI(pig insulin promoter + CMV enhancer)/CTDM

* NK 細胞制御

HLA-Ev(147)+human β 2m---pCAGGS/HLA-Ev(147)-IRES-h β 2m <HLA-E*>-- pCPI/HLA-E*

* 糖鎖抗原の制御 H-D 抗原=pigCMAH の siRNA----H1/siRNA-pCMAH

* PERV の制御 PERV の KD-----H1/siRNA-PERV(pol)

2. 細胞での発現確認

これらの遺伝子をブタの血管内皮細胞に導入し、FACS で発現を確認した。

3. ブタでの発現

CTDM および HLA-E*遺伝子をそれぞれ約 40 個の卵に導入した結果、18.4%および 35.9%の胚盤胞形成率が得られた。対照の遺伝子導入を伴わない顕微授精区では 30.0%の胚盤胞形成率であったことから、HLA-E*遺伝子導入の発生阻害はないと判断した。

HLA-E*遺伝子導入胚 97 個を 2 頭のレシピエント雌に移植した。妊娠診断はまだ実施していない

D. 考察

遺伝子構築に関しては、in vitro での発現を確認するのは勿論であるが、ブタ個体及び目的臓器(臍島)での発現が重要と考えられる。

一方、我々は既に顕微授精法が遺伝子改変ブタの作出に効果的であることを確認している。この方法の応用により、HLA-E*および CTDM 遺伝子を導入したブタの作出は、十分可能であると考えられる。CTDM 遺伝子コンストラクトを再精製し、発生阻害性を検討する予定である。

また、個々の hybrid 遺伝子の in vivo での発現を確認した後、これらを繋ぎ合わせた比較的に長い構築を作製し、Gal-KO ブタからの fibroblast に in vitro で遺伝子導入し、高発現の line からの核移植により、遺伝子改変ブ

タを作製する方法を考えている。

E. 結論

プロジェクトの一年目であるため、今だブタ個体での導入遺伝子の発現に関する評価はできていない。現時点で、二つの遺伝子構築が終わり、それぞれ ICSI 法でブタに遺伝子導入し、in vivo での発現を検討中であるが、顕微授精法による、ブタ体外成熟卵への HLA-E*遺伝子の導入は発生を阻害せず、胎仔を得ることが可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

学会発表

《国内》

①宮川周士、南條明子、柏田紘明、福澤正洋、武石俊作、興津輝、(明治大学・農学部)長嶋比呂志、(米ベイラー大)松本慎一、 α Gal-knockout ブタ関連の臍島の糖鎖抗原の解析、第 47 回日本移植学会、仙台 2011, 10, 5-6

②高間勇一、柏田紘明、南條明子、中津志野、王丹丹、福澤正洋、宮川周士、(明治大学・農学部)長嶋比呂志、ブタ CMAH 遺伝子制御による抗原性の変化の検討、第 47 回日本移植学会、仙台 2011, 10, 5-6

③宮川周士・王丹丹・高間勇一・上野豪久・福澤正洋、長嶋比呂志、異種移植ブタ開発研究の流れ、日本異種移植研究会、広島 2011, 12, 10

④王丹丹、高間勇一、上野豪久、武石俊作、福澤正洋、宮川周士、(東京大学・生産技術研究所)興津輝、(米ベイラー大)松本慎一、(明治大学・農学部)中野和明、松成ひとみ、長嶋比呂志、 α Gal-knockout ブタ関連の臍島の糖鎖抗原の解析、日本異種移植研究会、広島 2011, 12, 10

⑤王丹丹、高間勇一、上野豪久、南條明子、乾中智佳子、福澤正洋、武石俊作、宮川周士、(東京大学・生産技術研究所)興津輝、(明治大学・農学部)長嶋比呂志、新生児ブタ臍島の糖鎖について、日本異種移植研究会、広島 2011, 12, 10

⑥(大阪大学・小児成育外科)王丹丹、高間勇一、上野豪久、福澤正洋、宮川周士、(東京大学)興津輝、(米ベイラー大)松本慎一、(東北大学)後藤昌史、(明治大学)長嶋比呂志、ブタ臍島の糖鎖抗原について、日本臍・臍島移植研究会 旭川 2012, 3, 9-10

⑦高間勇一、宮川周士、山本亜紀、井原欣幸、

上野豪久、福澤正洋、ラット小腸移植におけるケモカイン阻害剤

及びカルシニューリン阻害剤の効果の検討、第23回小腸移植研究会、熊本 2012, 3, 11

⑧宮川周士、バイオ人工細胞・臓器の世界の現況、第2回公開シンポジウム・先進医用ブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト、鹿児島 2012, 3, 22

《国際》

①Shuji Miyagawa,

* Complements in transplantation

12th Congress of the Asian Society of Transplantation, September 25-28, 2011, Seoul, Korea.

② Kosuke Ikeda, Akiko Nanjyo, Hiroaki Kashiwada, Yuichi Takama, Takehisa Ueno, Masahiro Fukuzawa, Kazuaki Nakano, Hitomi Matsunari, Hiroshi Nagashima, Shuji Miyagawa

* A cloning of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid (CMP-NeuAc) hydroxylase from porcine endothelial cells

12th Congress of the Asian Society of Transplantation, September 25-28, 2011, Seoul, Korea.

③ Akiko Nanjyo, Aki Yamamoto, Hiroaki Kashiwada, Kosuke Ikeda, Yuichi Takama, Takehisa Ueno, Masahiro Fukuzawa, Akihiro Kondo, Hiroshi Nagashima, Shuji Miyagawa

* Trial of knockdown for the H-D antigen of pig cells

12th Congress of the Asian Society of Transplantation, September 25-28, 2011, Seoul, Korea.

④Hiroaki Kashiwada, Akiko Nanjyo, Shino Nakatsu, Shunsaku Takeishi, Yuichi Takama, Akihiro Kondo, Teru Okitsu, Hiroshi Nagashima, Masahiro Fukuzawa, Shuji Miyagawa

* A study of the glycoantigens of neonatal porcine islet-like cell clusters using a lectin microarray

12th Congress of the Asian Society of Transplantation, September 25-28, 2011, Seoul, Korea.

⑤ Yuichi Takama, Shuji Miyagawa, Takehisa Ueno, Masahiro Fukuzawa

* Effects of a calcineurin inhibitor, FK506, and a CCR5/CXCR3 antagonist, TAK-779, in a rat small intestinal transplantation model

XIIth International Small Bowel Transplant Symposium, Washington DC, USA, September 15-18, 2011

⑥Hiroaki Kashiwada, Akiko Nanjyo, Shino Nakatsu, Yuichi Takama, Teru Okitsu, Hiroshi Nagashima, Masahiro Fukuzawa, Shuji Miyagawa.

* In comparison with APIs, NICCs are very rich in a2,6Neu5NAc, and reduced Fucose/Core Fucose & high-mannose form, and Lactosamine & Core 1 forms are upregulated, instead, in 5 day cultures.

The 11th Congress of International Congress for Xenotransplantation (Joint Conference with CST), 23-26 October, 2011, Miami, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服事業）
遺伝子改変ブタの作出に関する研究

分担研究報告書

分担研究者 長嶋比呂志
明治大学農学部生命科学科・教授

研究要旨

医療用バイオ人工細胞・臓器の開発のために、遺伝子改変したブタの作出を目指している。ブタ細胞で発現を確かめた、1. 複数の補体制御因子を hybrid 化した分子、また、2. HLA-E を高発現する変異分子を用い、ブタに顕微授精 (ICSI-mediated gene transfer) 法によるトランスジェニックブタの作出を試みたが、HLA-E 高発現変異分子は現時点で流産する結果となった。今後補体制御因子の方とともに、ICSI 法を再度行って行く予定である。

研究協力者

明治大学農学部生命科学科
渡邊 将人（研究員）、梅山一大（研究員）
松成ひとみ（院生）、中野和明（院生）

生阻害はないと判断した。HLA-E*遺伝子導入胚 97 個を 2 頭のレシピエント雌に移植した。妊娠診断はまだ実施していない。

A. 研究目的

我々は既に、糖転移酵素 GnT-III と CD55 を遺伝子導入し、かつ異種抗原 α -Gal を KO したブタを作出している。この遺伝子改変ブタに、新たな補体制御因子、抗凝固因子、細胞性免疫制御分子やレトロウイルス制御用遺伝子などを導入し、臨床応用可能な膵島細胞の供給源となるブタを作出する。

D. 考察

我々は既に、顕微授精法が遺伝子改変ブタの作出に効果的であることを確認している。この方法の応用により、HLA-E*および CTDM 遺伝子を導入したブタの作出は、十分可能であると考えられる。CTDM 遺伝子コンストラクトを再精製し、発生阻害性を検討する予定である。

B. 方法

顕微授精 (ICSI-mediated gene transfer) 法を用いて、ブタの体外成熟卵に 2 種の遺伝子導入を行い、発生への影響を調べた。用いた遺伝子は C1-INH+Thrombomodulin+DAF+MCPcyt(-)<CTDM> と HLA-Ev(147)+IRES+human β -2 microglobulin(h β 2m)<HLA-E*>である。注入卵の胚盤胞への体外発生によって、導入遺伝子の初期発生への影響を解析した。発生阻害の見られなかった遺伝子については、遺伝子導入胚の移植により胎仔の獲得を試みた。

E. 結論

顕微授精法による、ブタ体外成熟卵への HLA-E*遺伝子の導入は発生を阻害せず、胎仔を得ることが可能であると考えられる。

C. 結果

CTDM および HLA-E*遺伝子をそれぞれ約 40 個の卵に導入した結果、18.4%および 35.9%の胚盤胞形成率が得られた。対照の遺伝子導入を伴わない顕微授精区では 30.0%の胚盤胞形成率であったことから、HLA-E*遺伝子導入の発

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）

遺伝子構築に関する研究

研究報告書

研究代表者 宮川周士

大阪大学大学院医学系研究科 小児成育外科 准教授

研究要旨

医療用バイオ人工細胞・臓器の開発のため遺伝子改変し、医療用ブタの作出を目指している。一年目は起こってくる超急性拒絶反応を止める主軸と成る複数の補体制御因子を hybrid 化した分子を作成し、これをブタ細胞で発現を確かめた。また同時に、HLA-E を高発現する変異分子も作成し、細胞での発現を確かめた。

研究協力者

上野豪久（助教） 高間勇一（医員）
王 丹丹（院生） 山本志野（研究員）
南條明子（研究員） 乾中智佳子（研究員）

A. 研究目的

目的は、医療用バイオ人工細胞・臓器の開発である。主眼をバイオ人工膵島とし、その細胞供給用の遺伝子改変ブタの作出をめざす。

B. 方法

1. 遺伝子の選択。今回遺伝子改変ブタ作製に関係する分子は、補体制御因子 C1-INH, MCP (CD46), DAF (CD55)、凝固系（抗凝固因子）Thrombomodulin (TM)、NK 細胞制御 HLA-E、内在性ブタレトロウイルス（PERV）の KD、Hanganutziu-Deicher (H-D) 抗原の遺伝子 (CMAH) の KD である。

2. 遺伝子構築。今回はより重要と思われる CTDM を insuline promoter で、HLA-E を pCAGGS で発現させることにした。Enhancer には CMV の enhancer を使用した。我々は高発現を得るのに、cDNA の codon を改変しブタで至適なものとする方法を取る。

* 各分子の機能ドメインを、同分子、別の分子間で繋いだ多重分子 (hybrid) を作製し、この人工 cDNA をブタに遺伝子導入する方法をとる。〈CTDM〉

* HLA-Ev (147) (147 番目の S を C に変更する事により高発現が見込まれる) に IRES で human β 2m を繋ぎ合わせた。〈HLA-E*〉

* CMAH の siRNA 法による KD を試みた。

* PERV の KD も試みた。ブタを使ったバイオ人工細胞・臓器での大きな難題はブタ PERV の存在である。siRNA による KD が効

果を現す事を既に in vitro で確かめている。

3. In vitro での確認。ブタの血管内皮細胞 (PEC) 及び繊維芽細胞で検定する。

C. 結果

1. 作製した遺伝子構築。

* 補体制御 + α : C1-INH - Thrombomodulin - DAF - MCP <CTDM>

---pCAGGS/CTDM 及び pCPI (pig insulin promoter + CMV enhancer)/CTDM

* NK 細胞制御 : HLA-Ev (147)+human β 2m---pCAGGS/HLA-Ev (147)-IRES-h β 2m <HLA-E*〉

--- pCPI/HLA-E*

* 糖鎖抗原の制御 H-D 抗原=pigCMAH の siRNA----H1/siRNA-pCMAH

* PERV の制御 PERV の KD-----H1/siRNA-PERV (pol)

2. 細胞での発現確認

これらの遺伝子をブタの血管内皮細胞に導入し、FACS で発現を確認した。

D. 考察

遺伝子構築に関しては、in vitro での発現を確認するのは勿論であるが、ブタ個体及び目的臓器（膵島）での発現が重要と考えられる。また、個々の hybrid 遺伝子の in vivo での発現を確認した後、これらを繋ぎ合わせた比較的長い構築を作製し、Gal-KO ブタからの fibroblast に in vitro で遺伝子導入し、高発現の line からの核移植により、遺伝子改変ブタを作製する方法を考えている。

E. 結論

プロジェクトの一年目であるため、今だブタ個体での導入遺伝子の発現に関する評価はできていない。現時点で、二つの遺伝子構築が終わりそれぞれ ICSI 法でブタに遺伝子導入し、in vivo での発現を検討中である。

分担研究報告書

遺伝子構築に関する研究

分担研究者 岡部 勝
大阪大学遺伝情報実験センター 教授

研究要旨

バイオ人工細胞・臓器の開発用の遺伝子改変ブタを作出する前段階として、超急性拒絶反応を止める主軸と成る複数の補体制御因子を hybrid 化した分子を作成。また同時に、HLA-E を高発現する変異分子も作成し、これらのトランスジェニックマウスを作出した。

A. 研究目的

目的は、医療用バイオ人工細胞・臓器の開発である。主眼をバイオ人工膵島とし、その細胞供給用の遺伝子改変ブタの作出をめざす。

B. 方法

1. 遺伝子の選択。今回遺伝子改変ブタ作製に関係する分子は、補体制御因子 C1-INH, MCP (CD46), DAF (CD55)、凝固系（抗凝固因子）Thrombomodulin (TM)、NK 細胞制御 HLA-E、内在性ブタレトロウイルス (PERV) の KD, Hanganutziu-Deicher (H-D) 抗原の遺伝子 (CMAH) の KD である。

2. 遺伝子構築。今回はより重要と思われる CTDM を insuline promoter で、HLA-E を pCAGGS で発現させることにした。Enhancer には CMV の enhancer を使用した。我々は高発現を得るのに、cDNA の codon を改変しブタに至適なものとする方法を取る。

* 各分子の機能ドメインを、同分子、別の分子間で繋いだ多重合分子 (hybrid) を作製し、この人工 cDNA をブタに遺伝子導入する方法をとる。〈CTDM〉

* HLA-Ev (147) (147 番目の S を C に変更する事により高発現が見込まれる) に IRES で human $\beta 2m$ を繋ぎ合わせた。〈HLA-E*〉

3. トランジェニックマウス作製。通常のマイクロインジェクション法により、〈CTDM〉〈HLA-E*〉の 2 系統を作出した。

C. 結果

1. 作製した遺伝子構築。

* 補体制御 + α : C1-INH - Thrombomodulin - DAF - MCP 〈CTDM〉

---pCAGGS/CTDM 及び pCPI (pig insulin promoter + CMV enhancer)/CTDM

* NK 細胞制御 : HLA-Ev (147) + human $\beta 2m$ ---pCAGGS/HLA-Ev (147) - I

RES-h $\beta 2m$ 〈HLA-E*〉

--- pCPI/HLA-E*

2. トランスジェニックマウス

マイクロインジェクションした胚 (BDF1xBDF1) をそれぞれ 150 個ずつ移植し、

*pCPI (pig-insuline promoter/CMV enhancer) - CTDM 19 匹

*pCX-HLA-Ev (147) - IRES-h $\beta 2m$ 7 匹

の産子を得た。

特に pCX-HLA-Ev (147) - IRES-h $\beta 2m$ では帝王切開時に多くの着床痕が見られ、胎生期に多く死亡していた。

出生後も死亡が続き、

*pCPI (pig-insuline promoter/CMV enhancer) - CTDM 1 匹

*pCX-HLA-Ev (147) - IRES-h $\beta 2m$ 5 匹

のみの生残。生後の死亡理由については不明。

D. 考察

遺伝子構築に関しては、動物個体及び目的臓器 (膵島) での発現が重要と考えられる。また、個々の hybrid 遺伝子のマウス個体 in vivo での発現を確認した後、遺伝子改変ブタの作製に繋いで行くことを考えている。

E. 結論

プロジェクトの一年目であるため、作出した導入遺伝子の発現に関する評価はできていない。マウスを使って、さらに in vivo での発現を検討中である。

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|--|---|----------------|-----------------------|---------|---------|------|--------|
| Hitomi Matsunari, Masahito Watanabe, Kazuhiro Umeyama, Kazuaki Nakano, Yuka Ikezawa, Mayuko Kurome, Barbara Kessler, Eckhard Wolf, Shuji Miyagawa and Hiroshi Nagashima. | Cloning of Homozygous α 1,3-Galactosyltransferase Gene Knock-Out Pigs Somatic Cell Nuclear Transfer. | Shuji Miyagawa | [Xenotransplantation] | INTECH. | Croatia | 2012 | p37-54 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|-----------------------------|----|-------|-----------|
| Yuichi Takama, Shuji Miyagawa, Aki Yamamoto, Sabere Firdawes, Takehisa Ueno, Yoshiyuki Ihara, Akihiro Kondo, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka, and Masahiro Fukuzawa. | Effects of a calcineurin inhibitor, FK506, and a CCR5/CXCR3 antagonist, TAK-779, in a rat small intestinal transplantation model. | Transplant Immunology | 25 | 49-55 | 2011 |
| Yoichi Kakuta, Masayoshi Okumi, Shuji Miyagawa, Koichi Tsutahara, Toyofumi Abe, Koji Yazawa, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka, Shiroe Takahara, Norio Nonomura | The blocking of CCR5 and CXCR3 suppresses the infiltration of macrophages in acute renal allograft rejection. | Transplantation | 93 | 24-31 | 2012 |
| Shuji Miyagawa, Yuichi Takama, Hiroshi Nagashima, Takehisa Ueno and Masahiro Fukuzawa | Carbohydrate antigens. | Curr Opin Organ Transplant. | 17 | 174-9 | 2012 |
| Kosuke Ikeda, Aki Yamamoto, Akihiro Nanjo, Chikako Inuinaka, Yuichi Takama, Takehisa Ueno, Masahiro Fukuzawa, Kazuaki Nakano, Hitomi Matsunari, Hiroshi Nagashima and Shuji Miyagawa | A cloning of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid (CMP-NeuAc) hydroxylase from porcine endothelial cells | Transplant Proc | | | In press. |
| Shino Nakatsu, Yuichi Takama, Takehisa Ueno, Chikako Inuinaka, Shunsaku Takeishi, Akihiro Kondo, Teru Okitsu, Hiroshi Nagashima, Masahiro Fukuzawa and Shuji Miyagawa | A study of the glycoantigens of neonatal porcine islet-like cell clusters (NPCC) using a lectin microarray. | Transplant Proc. | | | In press. |
| Aki Yamamoto, Chikako Inuinaka, Shino Nakatsu, Yuichi Takama, Takehisa Ueno, Kosuke Ikeda, Hiroshi Nagashima, Akihiro Kondo, Masahiro Fukuzawa and Shuji Miyagawa | Trial using pig cells with the H-D antigen knocked down | Surgery Today | | | Submitted |