

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮川 周士

平成25(2013)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-----	1
宮川 周士	
II. 分担研究報告	
1. 遺伝子改変ブタの作出に関する研究 -----	5
長嶋 比呂志	
2. 遺伝子構築に関する研究 -----	7
宮川 周士	
3. 遺伝子構築に関する研究 -----	9
岡部 勝	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	10
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	10

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）
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。今回は当初作製した hybrid 化分子のマウス個体での発現を確認した。同時にこれらの一部改変しブタ細胞で発現を確かめた。次に、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 (TG) ブタの作出を試みたが現時点で TG 産仔は得られていない。今後 ICSI 法を再度試みると同時に、細胞株を樹立し核移植による方法も検討する予定である。

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) 王 丹丹 (院生) 河村拓史

(院生) 前田 晃 (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 (研究員)、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) 蓮輪英毅 (助教)

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。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。

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。ハーバード大学は CD47 ブタを開発。Mayo Clinic では Gal-KO+MCP (CD46)-TG ブタを作製。ピッツバーク大では既に Gal-KO /hCD46/TFPI/CTLA4-Ig ブタを作成。欧州 "XENOME" プロジェクトは Gal-KO/CD55/CD59/CD39/HT ブタを報告している。ハノーバー大でも、Gal-KO、DAF、TM、HO-1、ブタ内在性レトロウイルス (PERV) の KD、CTLA4-Ig と A20 のブタも作成。豪のメルボルン大では、Gal-KO をベースに CD55/CD59/CTLA4-Ig を導入。韓国では、ソウル大が4年後の臨床実施に向けて、Gal-KO、HO-1、sTNFR-Ig ブタ、又 M-gen 社が、DAF、HLA-E ブタを報告。台北大学でも DAF ブタと HO-1 ブタを開発している。一方、WHO はホームページに、35 件の臨床報告を掲載している。特に注目すべきは、4 年前よりニュージーランドでは免疫隔離膜下の膵島移植の臨床が始まっている (LCT 社)。ロシアでもアルゼンチンでもこれに続いている。これに対し、我々は、H8 年度よりトランスジェニックブタ (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。

前年度には遺伝子導入ブタが得られなかったため、新たに遺伝子コンストラクトの構築と精製を行い、新たに遺伝子改変ブタを作成することを目的とした。さらに、既存の α -Gal KO

ブタをベースに、より体細胞クローニングに適した細胞の樹立も目的とする。

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,

* 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、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。

一般的に現在使われている promoter は、CMV や RSV のウイルス promoter、Chick β actin (pCAGGS)、human EF-1 α 、human mouse 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。豚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、一部の報告では豚島での発現が弱いとされている。今回は CTDM を insuline promoter で、HLA-E を pCAGGS で発現させることにした。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 (1) . 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。

(2) . 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: Thrombomodulin 部分に関しては、直接抗凝固機能に関与する EGF4-6 と EGF3 の一部を選んだが、Thrombin の結合には EGF3 の部分のさらに 12 個のアミノ酸の必要と判断し、これを加えた。<NCTDM>

* 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 2A で human β 2m を繋ぎ合わせた。<HLA-Ev>

* PERV の KD も試みる。既に H-1 promoter に pol 部分の siRNA を組み込んだが、又、U6 promoter も用意し、他の部分の siRNA を組み込んだ。

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。発現の確認には FACS を用いた。

4. Transgenic マウス作り

昨年作った 2 種類のコンストラクト <CTDM> <HLA-E*> を、通常のマイクロインジェクションにより BDF1xBDF1 にそれぞれ 150 個の胚を移植した。生後 8 週令のマウスの各臓器での発現を RT-PCR で検討した。

5. Transgenic ブタ作り

2 種類のコンストラクト <NCTDM> と <HLA-Ev> を、Intracytoplasmic sperm injection-mediated gene transfer (ICSI) 法によりブタ体外成熟卵へ注入した。精子との共培養に用いる DNA 濃度を 1.25ng/ μ l および 2.5ng/ μ l とし、顕微授精胚の正常分割率、胚盤胞形成率への影響を両区で比較した。得られた胚盤胞 (発生培養 7 日目) の PCR 解析により、遺伝子導入の有無 (一過性導入も含む) を調べた。以上の実験により、導入に用いる DNA の適性濃度を決定し、顕微授精胚のレシピエントブタへ移植を行った。

さらに既存の α -Gal KO ブタを野生型ブタと交配するなどして、近交化や発生に影響のある変異の進んだ系統への新たな血液の導入を図った。

C. 結果

1. 新規に作製した遺伝子構築。

* NCTDM < 補体制御 + α >

C1-INH - Thrombomodulin - DAF - MCP <NCTDM> ---pCAGGS/NCTDM 及び pCPI(pig insulin promoter + CMV enhancer)/NCTDM---昨年の CTDM を改良した

* NK 細胞制御
pCAGGS/HLA-Ev(147)-2A-h β 2m <HLA-Ev>---
pCPI/HLA-Ev

* PERV の制御 PERV の
KD-----U6/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. マウスでの発現

pCPI/CTDM および pCX/HLA-E*をマウスに TG し、それぞれ 4 匹、2 匹の line を得た。内、2 匹、1 匹の発現を生後 8 週令で RT-PCR で解析した (膵臓での発現を 1 とした)。

*CTDM#1: 脳 (5.41)、心 (0.19)、肺 (1.17)、胸腺 (0.30)、肝 (0.06)、腎 (0.13)、腸 (0.39)、脾 (1.61)、膵 (1) <n=2>

*CTDM#2: 心 (2.45)、肺 (7.29)、胸腺 (9.25)、肝 (0.03)、腎 (0.71)、脾 (14.25)、膵 (1)

*HLA-E: 脳 (2.75)、心 (70.71)、肺 (15.48)、胸腺 (0.17)、肝 (0.36)、腎 (1.28)、腸 (0.30)、脾 (2.81)、筋 (12.86)、膵 (1)。であった。<n=3>

両方の promoter で膵臓での発現を確かめたが、pCPI の方が相対的に高発現と考えられた。

4. ブタでの発現

NCTDM および HLA-Ev 遺伝子両者ともに、1.25ng/ μ l 区では 2.5ng/ μ l 区に比してより高い胚盤胞形成率が得られる傾向であった (NCTDM : 47.8% [11/23] vs 24.0% [6/25], HLA-Ev : 34.8% [8/23] vs 22.7% [5/22])。一方、胚盤胞の遺伝子導入効率については、両区に差は見られなかった (75.0-100%)。

胚移植試験には、発生率が高い傾向であった 1.25ng/ μ l の DNA 濃度を採用した。NCTDM 遺伝子および HLA-Ev 遺伝子を導入した顕微授精胚、それぞれ 69 個および 79 個を 2 頭のレシピエントブタに移植した (さらに 2 頭に移植予定)。 α -Gal KO ブタ (雌) と野生型ブタとの交配によって得られた heterozygous KO 産仔を、他の α -Gal KO ブタ精子により受胎させて胎仔を回収し、新たに 9 ラインの α -Gal KO ブタ細胞を

樹立した。

D. 考察

顕微授精法の応用により、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たが、今回 CTDM 遺伝子構築を再建し、再精製し、発生阻害性を検討した。

既存の α -Gal KO 細胞は、KO ブタの作成過程における近交化の影響やエピジェネティック変異の影響を受け、そのことが作出された体細胞クローン個体の正常性に影響していたと考えられる。既存の α -Gal KO ブタに新たな血液を導入したことで、発生異常を生じない新たな核ドナー細胞が樹立された可能性は高い。新たに作成・精製した遺伝子コンストラクトには顕著な発生阻害性が見られなかったため、遺伝子改変個体が得られる可能性は高く、表現形が確認できれば、新たに樹立した細胞への遺伝子導入に移ることができる。

また、個々の hybrid 遺伝子のブタ個体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 2 年目であるが、去年は流産のため、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。マウスでの評価に戻すとともに、遺伝子に多少の変化を加えた。現時点で、2 つの遺伝子の構築が終わり、それぞれ ICSI 法でブタに遺伝子導入し、ブタでの発現を検討中であるが、遺伝子導入した個体はまだ得られていない。表現形の解析には分娩を待たなければならない。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

* Ikeda K, Yamamoto A, Nanjo A, Inuinaka C, Takama Y, Ueno T, Fukuzawa M, Nakano K, Matsunari H, Nagashima H, Miyagawa S. A cloning of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase from porcine endothelial cells. Transplant Proc. 2012 May;44(4):1136-8.

*Nakatsu S, Takama Y, Ueno T, Inuinaka C,

Takeishi S, Kondo A, Okitsu T, Nagashima H, Fukuzawa M, Miyagawa S. A study of the glycoantigens of neonatal porcine islet-like cell clusters (NPCC) using a lectin microarray. *Transplant Proc.* 2012;44(4):1134-5.

* Shuji Miyagawa, Yuichi Takama, Hiroshi Nagashima, Takehisa Ueno and Masahiro Fukuzawa

Carbohydrate antigens. *Curr Opin Organ Transplant.* 2012; 17: 174-9.

* Aki Yamamoto, Kosuke Ikeda, Dandan Wang, Shino Nakatsu, Yuichi Takama, Takehisa Ueno, Hiroshi Nagashima, Akihiro Kondo, Masahiro Fukuzawa and Shuji Miyagawa. Trial using pig cells with the H-D antigen knocked down. *Surgery Today* In press

* Shuji Miyagawa, Akira Maeda, Shunsaku Takeishi, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Shinichi Matsumoto, Teru Okitsu, Masafumi Goto, Hiroshi Nagashima. A Lectin array analysis for wild-type and α -Gal-knockout pig islets, compared with humans. *Surgery Today* in press

* Akira Maeda, Takehisa Ueno, Shino Nakatsu, Dandan Wang, Noriaki Usui, Shunsaku Takeishi, Teru Okitsu, Masafumi Goto, Hiroshi Nagashima, Shuji Miyagawa. A lectin microarray study of glycoantigens in neonatal porcine islet-like cell clusters (NPCC). *J Surgical Research in press*

* Umeyama K, Saito H, Kurome M, Matsunari H, Watanabe M, Nakauchi H, Nagashima H: Characterization of the ICSI-mediated gene transfer method in the production of transgenic pigs. *Molecular Reproduction and Development*, 79:218-228, 2012.

* Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Ikezawa Y, Kurome M, Kessler B, Wolf E, Miyagawa S, Nakauchi H, Nagashima H: Chapter 3: Cloning of homozygous α 1,3-galactosyltransferase gene knock-out pigs by somatic cell nuclear transfer. In: *Xenotransplantation*. Edited by Miyagawa S. InTech, Rijeka, Croatia 2012.

2. 学会発表

The 24th International Congress of the Transplantation Society
July 15-19, Berlin

* Adult pig islets, rich in the high-mannose form

compared with humans, were slightly up-regulated, and alpha-linked GalNAc was reduced by Gal-knockout

Wang D, Maeda A, Ueno T, Takama Y, Fukuzawa M, Matsumoto S, Okitsu T, Goto M, Kondo K, Nagashima H, Miyagawa S.

*The blocking of CXCR3 and CCR5 suppresses the infiltration of T lymphocytes in rat renal ischemia reperfusion

Tsutahara K, Okumi M, Kakuta Y, Abe T, Yazawa K, Miyagawa S, Matsunami K, Otsuka H, Kaimori J, Takahara S, Nonomura N.

Seoul Forum on Xenotransplantation

Nov. 3, Seoul

* A study for glyco-antigens in porcine islets. Shuji Miyagawa

* Monocytic suppressor cells derived from peripheral blood suppress CTL lysis in xenotransplantation

Akira Maeda, Takuji Kawamura, Dandan Wang, Takehisa Ueno, Noriaki Usui and Shuji Miyagawa

2012 CABX Workshop and International Symposium

Transgenic Animal and its Application

Dec.2-4, Seogwipo, Jeju, Korea

* A feature of glyco-antigen in porcine islets. Shuji Miyagawa

H.知的財産権の出願・登録状況
特に無し

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）
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標としている。前年度には遺伝子導入ブタが得られなかったため、新たに遺伝子コンストラクトの構築と精製を行い、超急性拒絶だけでなく遅延性拒絶にも対応し得る遺伝子改変ブタを作成することを目的とした。1. 複数の補体制御因子を hybrid 化した分子および 2. HLA-E を高発現する変異分子を用いて顕微授精を行い産仔を得たが、遺伝子組換え個体の作出には至らなかった。

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。

B. 方法

2 種の遺伝子コンストラクト Pig insulin promoter+C1-INH+Thrombomodulin+DAF+MCPcyt(-) <NCTDM> と pCX/HLA-Ev(147)+2AP+human beta-2 microtubulin <HLA-Ev> を、Intracytoplasmic sperm injection-mediated gene transfer 法によりブタ体外成熟卵へ注入した。精子との共培養に用いる DNA 濃度を 1.25ng/ μ l および 2.5ng/ μ l とし、顕微授精胚の正常分割率、胚盤胞形成率への影響を両区で比較した。得られた胚盤胞（発生培養 7 日目）の PCR 解析により、遺伝子導入の有無（一過性導入も含む）を調べた。以上の実験により、導入に用いる DNA の適性濃度を決定し、顕微授精胚のレシピエントブタへ移植を行った。

C. 結果

NCTDM および HLA-Ev 遺伝子両者ともに、1.25ng/ μ l 区では 2.5ng/ μ l 区に比してより高い胚盤胞形成率が得られる傾向であった（NCTDM : 47.8% [11/23] vs. 24.0% [6/25], HLA-Ev : 34.8% [8/23] vs. 22.7% [5/22]）。一方、胚盤胞の遺伝子導入効率については、両区に差は見られなかった（75.0-100%）。

胚移植試験には、発生率が高い傾向であった 1.25ng/ μ l の DNA 濃度を採用した。NCTDM 遺伝子および HLA-Ev 遺伝子を導入した顕微授精胚、それぞれ 151 個および 156 個を 4 頭のレシピエントブタに移植した。

4 頭中 3 頭が妊娠したが、1 頭が流産した。残る 2 頭を妊娠 109 日齢に剖検し、合計 4 頭の胎仔を得た。

これらの胎仔中に遺伝子改変個体は認められなかった。

D. 考察

新たに構築・精製した遺伝子コンストラクトを導入されたブタ卵の胚盤胞への発生には、特段の問題は見られなかった。しかし、顕微授精胚の移植で得られた胎仔数が予想より少なく、また遺伝子改変個体を得られなかったことから、遺伝子導入の影響で胎仔が死亡している可能性が懸念された。

E. 結論

顕微授精法では導入遺伝子のコピー数の制御が困難であることから、胎仔発育への影響が懸念される遺伝子コンストラクトの導入には不利である。 α 1,3-galactosyltransferase (GalT) 遺伝子ノックアウトブタ細胞への遺伝子導入に切り替えて、今後は遺伝子導入を行うこととする。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

① Miyagawa S, Maeda A, Takeishi S, Ueno T, Usui N, Matsumoto S, Okitsu T, Goto M, Nagashima H: A Lectin array analysis for wild-type and α -Gal-knockout pig islets, compared with humans. Surgery Today 2012, in press.

② Umeyama K, Saito H, Kurome M, Matsunari H, Watanabe M, Nakauchi H, Nagashima H: Characterization of the ICSI-mediated gene transfer method in the production of transgenic pigs. Molecular Reproduction and Development, 79:218-228, 2012.

③ Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Ikezawa Y, Kurome M, Kessler B, Wolf E, Miyagawa S, Nakauchi H, Nagashima H: Chapter 3: Cloning of homozygous α 1,3-galactosyltransferase gene knock-out pigs by somatic cell nuclear transfer. In: Xenotransplantation. Edited by Miyagawa S. InTech, Rijeka, Croatia 2012.

2. 学会発表

① 宮川周士, 前田晃, 王丹丹, 上野豪久, 臼井規朗, 興津輝, 後藤昌史, 松本慎一, 長嶋比呂志: 豚島の糖鎖構造についての検討. In: 第15回日本異種移植研究会: 8 Dec 2012; 京都.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特に無し。

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）
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。複製と b2m の連結遺伝子を一部改変し、これらの発現をブタ細胞で確かめた。

研究協力者

上野豪久（助教） 王 丹丹（院生）
河村拓史（院生） 前田 晃（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。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 である。
2. 遺伝子構築。(1)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っている。また、(2)各分子の機能ドメインを、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。

* < NCTDM > 昨年作成した CTDM (insuline promoter) の Thrombomodulin 部分を改変した。Thrombomoduline 部分に関しては、直接抗凝固機能に関与する EGF4-6 と EGF3 の一部を選んだが、Thrombin の結合には EGF3 の部分のさらに 12 個のアミノ酸の必要と判断し、これを加えた。Enhancer には CMV の enhancer を使用した。

* < HLA-Ev > 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 2A システムを使って human β 2m を繋ぎ合わせ、pCAGGS に入れた。

* 新しい U6 promoter を使って、PERV の KD 用のベクターを作出した。

3. In vitro での確認。上記 TG 用遺伝子をブタの血管内皮細胞 (PEC) で検定した。

C. 結果

1. 新規に作製した遺伝子構築。

* NCTDM < 補体制御 + α >

C1-INH - Thrombomodulin - DAF - MCP <NCTDM> ---pCAGGS/CTDM 及び pCPI (pig insulin promoter + CMV enhancer)/NCTDM--- 昨年の CTDM を改良した

* NK 細胞制御 pCAGGS/HLA-Ev (147)-2A-h β 2m <N-HLA-E>--- pCPI/N-HLA-E

* PERV の制御 PERV の KD-----U6/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、動物個体 (in vivo) 及び目的臓器（膵臓）での発現が重要と考えられる。今回マウスでの発現は、岡部チームにより確認できた。最終的には、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は ICSI 法でブタに遺伝子導入したが流産した。その為、マウスで TG を作成し in vivo での発現を確認した。

現時点で、二つの遺伝子の再構築が終わり、ICSI法でブタに遺伝子導入し発現を検討中である。

F. 健康危険情報
特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

* Ikeda K, Yamamoto A, Nanjo A, Inuinaka C, Takama Y, Ueno T, Fukuzawa M, Nakano K, Matsunari H, Nagashima H, Miyagawa S. A cloning of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase from porcine endothelial cells. *Transplant Proc.* 2012 May;44(4):1136-8.

* Nakatsu S, Takama Y, Ueno T, Inuinaka C, Takeishi S, Kondo A, Okitsu T, Nagashima H, Fukuzawa M, Miyagawa S. A study of the glycoantigens of neonatal porcine islet-like cell clusters (NPCC) using a lectin microarray. *Transplant Proc.* 2012;44(4):1134-5.

* Shuji Miyagawa, Yuichi Takama, Hiroshi Nagashima, Takehisa Ueno and Masahiro Fukuzawa
Carbohydrate antigens. *Curr Opin Organ Transplant.* 2012; 17: 174-9.

* Aki Yamamoto, Kosuke Ikeda, Dandan Wang, Shino Nakatsu, Yuichi Takama, Takehisa Ueno, Hiroshi Nagashima, Akihiro Kondo, Masahiro Fukuzawa and Shuji Miyagawa. Trial using pig cells with the H-D antigen knocked down. *Surgery Today* In press

* Shuji Miyagawa, Akira Maeda, Shunsaku Takeishi, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Shinichi Matsumoto, Teru Okitsu, Masafumi Goto, Hiroshi Nagashima. A Lectin array analysis for wild-type and α -Gal-knockout pig islets, compared with humans. *Surgery Today* in press

* Akira Maeda, Takehisa Ueno, Shino Nakatsu, Dandan Wang, Noriaki Usui, Shunsaku Takeishi, Teru Okitsu, Masafumi Goto, Hiroshi Nagashima, Shuji Miyagawa. A lectin microarray study of glycoantigens in neonatal porcine islet-like cell clusters (NPCC). *J Surgical Research* in press

2. 学会発表

The 24th International Congress of the Transplantation Society
July 15-19, Berlin

* Adult pig islets, rich in the high-mannose form

compared with humans, were slightly up-regulated, and alpha-linked GalNAc was reduced by Gal-knockout

Wang D, Maeda A, Ueno T, Takama Y, Fukuzawa M, Matsumoto S, Okitsu T, Goto M, Kondo K, Nagashima H, Miyagawa S.

*The blocking of CXCR3 and CCR5 suppresses the infiltration of T lymphocytes in rat renal ischemia reperfusion

Tsutahara K, Okumi M, Kakuta Y, Abe T, Yazawa K, Miyagawa S, Matsunami K, Otsuka H, Kaimori J, Takahara S, Nonomura N.

Seoul Forum on Xenotransplantation

Nov. 3, Seoul

* A study for glyco-antigens in porcine islets.
Shuji Miyagawa

* Monocytic suppressor cells derived from peripheral blood suppress CTL lysis in xenotransplantation

Akira Maeda, Takuji Kawamura, Dandan Wang, Takehisa Ueno, Noriaki Usui and Shuji Miyagawa

2012 CABX Workshop and International Symposium

Transgenic Animal and its Application

Dec.2-4, Seogwipo, Jeju, Korea

* A feature of glyco-antigen in porcine islets.
Shuji Miyagawa

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し。

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

昨年作った2種類のコンストラクト<CTDM><HLA-E*>を、通常のマイクロインジェクションによりそれぞれ150個の胚を移植した。生後8週令のマウスの各臓器での発現をRT-PCRで検討した。両方の promoter で膵臓での発現を確かめたが、pCPI (insulin promoter)の方が beta-actin より相対的に高発現と考えられた。

A. 研究目的

我々のグループは、既に糖転移酵素 GnT-III と CD55 のトランスジェニック (TG) ブタを作出している。今回は 23 年度に既出の遺伝子構築での TG ブタの重なる流産の原因を考えるため、マウスでの発現を検討した。

*CTDM#2 : 心 (2.45)、肺 (7.29)、胸腺 (9.25)、肝 (0.03)、腎 (0.71)、脾 (14.25)、膵 (1)

*HLA-E : 脳 (2.75)、心 (70.71)、肺 (15.48)、胸腺 (0.17)、肝 (0.36)、腎 (1.28)、腸 (0.30)、脾 (2.81)、筋 (12.86)、膵 (1)。であった。<n=3>

B. 方法

1. 昨年度作出の遺伝子構築。

* CTDM < 補体制御 + 抗凝固因子 >

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

* NK 細胞制御

pCAGGS/HLA-Ev(147)-IRES-hβ2m < HLA-E* >

両方の promoter で膵臓での発現を確かめたが、pCPIの方が相対的に高発現と考えられた。

D. 考察

HLA-E*およびCTDM遺伝子を導入したブタの作出は、流産したため in vivo での発現に問題があると考えられたが、CTDM、HLA-E 遺伝子コンストラクト自体は、in vivo (マウス) 発現に問題は無いようであった。

2. Transgenic マウス作り

昨年作出した2種類のコンストラクト<CTDM><HLA-E*>を、通常のマイクロインジェクションにより BDF1xBDF1 にそれぞれ150個の胚を移植した。生後8週令のマウスの各臓器での発現をRT-PCRで検討した。

E. 結論

両方のコンストラクトとも、in vivo で胎仔を得ることが可能であると考えられた。

C. 結果

8週令マウスでの発現

pCPI/CTDMA および pCX/HLA-E をマウスに TG し、最終的にそれぞれ4匹、2匹の line を得た。内、2匹、1匹の発現をRT-PCRで解析した（膵臓での発現を1とした）。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

特に無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し。

*CTDM#1 : 脳 (5.41)、心 (0.19)、肺 (1.17)、胸腺 (0.30)、肝 (0.06)、腎 (0.13)、腸 (0.39)、脾 (1.61)、膵 (1) <n=2>

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 Umeeyama, 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
Shuji Miyagawa, Akira Maeda	Glycoprotein α 1,3-galactosyltransferase 1, pseudogene (GGTA1P)	Shuji Miyagawa	The second edition. [Handbook of Glycosyltransferases and related genes]	Springer-Reference		In press.	

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

