

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。同時にこれらを一歩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)

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 -GalKO

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 -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成する。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

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係る分子は、

* 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 、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。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: Thrombomoduline 部分に関しては、直接抗凝固機能に關与する 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 -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 (臍臓での発現を 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)、臍(1) <n=2>

*CTDM#2: 心(2.45) \ 肺(7.29) \ 胸腺(9.25) \
 肝(0.03) \ 腎(0.71) \ 脾(14.25)、臍(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) \ 臍(1)。であった。<
 n=3>

両方の promoter で臍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)。
 -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
 -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 -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 -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 -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
 が確認されれば、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、昨年は流産
 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。複数と 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。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。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, Shimichi 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。