

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 -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ィ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/μl および 2.5ng/μl 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/μl 区では 2.5ng/μl 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/μl 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。1,3-galactosyl transferase (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

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 a-Gal-knockout pig islets,

compared with humans. Surgery Today 2012, 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 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

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。