

201322012A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)

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25年度 総括研究報告書

研究代表者 宮川 周士

平成26(2014)年 5月

目 次

I. 総合研究報告書

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	-----	1
大阪大学大学院 医学系研究科・臓器移植学 准教授 宮川 周士		

II. 分担研究報告

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	-----	9
大阪大学大学院 医学系研究科・臓器移植学 准教授 宮川 周士		

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	-----	12
明治大学農学部 生命科学科発生工学研究室 教授 長嶋 比呂志		

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	-----	20
大阪大学 微生物病研究所 教授 伊川 正人		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	25
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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

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。作製したhybrid遺伝子構築に関しては、動物個体(マウス)での発現と胚盤胞形成試験で遺伝子導入可能と判断した。一方、既存のhomozygous GalT-knockout(KO)ブタの正常性・生存性を改善し、H-D抗原のさらなるKOにも一定の目途がたった。つまり、GalT-KOブタの胎児繊維芽細胞のH-D抗原をin vitroでKOに成功しており、今後、導入予定の遺伝子を高発現させ、その核を移植する方法が新たに考えられた。

分担研究者

長島比呂志

明治大学農学部生命科学科 教授

伊川正人

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

上野豪久(助教)、王丹丹(院生)、

河村拓司(院生)、前田章(研究員)

明治大学農学部生命科学科

渡辺将人(研究員)、梅山一大(研究員)、

松成ひとみ(研究員)、中野和明(研究員)

大阪大学遺伝情報実験センター

蓮輪英毅(助教)、江崎陽子(研究員)

伝子を導入(transgenic: TG)し、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、異種抗原(α Gal)のKOブタを基に数種の免疫制御分子をTGし、 α Gal-KO/hCD46/TFPI/CTLA4-Igブタ、等を作成。独や豪、韓国でも国家プロジェクトが続いている。昨年、 α Galに続き、次の異種抗原であるCMAH(cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, H-D抗原)のKOも米、韓で報告された。

我々は前年度までに、 α Gal-KOブタにZFN法でHDにKOを加え、一旦hetero HD-KOのクローン産仔を経て、 α Gal/HD-KOのfibroblast line

(雌)を確立した。一方、別の α Gal-KO細胞からTALEN法により直接 α Gal/HD-KOのfibroblastのline(雄)も確立した。さらに、免疫抑制分子の機能ドメインを繋いだhybridとして、CTDM(C1-INH・Thrombomodulin・DAF・MCPのhybrid)〈補体制御+ α 〉及びHLA-Ev(147)-2A-hb2m〈細胞制御〉を作製した。

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を供給できる。また、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。

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。

移植用臓器の開発は、我々が異種移植の拒絶反応が主に補体系の種差に起因する事を見いだす(Transplantation 46:825, 1988)、1990年頃よりヒトの遺

B. 研究方法

1). 既存の α -Gal(α 1,3 galactosyl transferase)-KOブタに、既に報告があるCMAHのKOを加え、さらに出来上がった新奇のhybrid遺伝子を導入する。

①. まずは、既存のブタのlineの整理。

雌のhomozygous GalT-KOクローンブタ(DK3-9系)を野生型雄ブタと交配し、heterozygous GalT-KOブタを新たに作出した。これによって、体細胞クローニングによって無性生殖的に維持されてきたGalT-KOブタの系統に、有性生殖を介して新しい遺伝的背景の導入を行った。得られたheterozygous GalT-KO雌を、既存のhomozygous GalT-KO雄個体(DK3-1系)の精子で人工的に受胎させ胎仔を得た。この胎仔より樹立した繊維芽細胞(DK3-1neo)を用いて、体細胞核移植によるクローン個体作出を行った。

②. homozygous GalT-KOクローンブタ(DK3-9系、雌)の細胞を対象に、CMAH遺伝子を標的とするZinc finger nuclease (ZFN) mRNAを導入した。得られたheterozygous CMAH-KO細胞を体細胞核移植に用いて、クローン産仔の作出を行った。

③. さらに、遺伝的背景を更新したhomozygous GalT-KO細胞(DK3-1neo)に対しては、Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) mRNAを導入することでCMAH-KOの遺伝子改変を行った。

2). この間、将来を見据えて、マクロファージ/樹上細胞(DC)を制御できる新たな遺伝子を検索するとともに、 α -GalとH-D抗原以外の新たな糖鎖抗原を作り出す原因遺伝子を検索する。

①. ブタ血管内皮に対するヒト・マクロファージ/DCによる障害を制御する分子を検定した。

②. ブタとヒトのisletsの糖鎖構造を3次元HPLC法及び質量分析(MALDI-TOF-MS)にて検索した。

③. CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas(CRISPR Associated)システムでのブタCMAH遺伝子のKO siteを検索した。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する動物愛護上の配慮に関しては、

大阪大学および明治大学の動物実験委員会を通過した上でおこなっている。

検定その他に使うブタは麻酔時に注射の痛みを伴うが、その後覚醒する事無く安楽死させている。

C. 結果

1). ①. 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。新しい遺伝的背景を導入したhomozygous GalT-KO細胞(DK3-1neo)から4頭のクローン産仔を得た。その内3頭は産後虚弱のため、出生後2日までに試料採取に供した。一頭は33日目まで生存(死因不明)。

②. 新たに樹立したhomozygous GalT-KO/heterozygous CMAH-KO細胞(DK3-9系)から、4頭のクローン産仔を得た。4頭中の1頭は健常であったが、3頭は死産あるいは産後虚弱であった。健常個体から次世代クローン個体作出のための初代培養細胞を樹立した。さらに、この細胞へ再度ZFN mRNAを導入することにより、homozygous GalT-KO/homozygous CMAH-KOのダブルKO細胞(雌)を、最終的に2ライン樹立した。

③. 新しい遺伝的背景を導入したhomozygous GalT-KO細胞(DK3-1neo雄)の遺伝子改変により、homozygous GalT-KO/homozygous CMAH-KOのダブルhomozygous KO細胞を2ライン樹立した。

2). 新規遺伝子の検索:

①. 末梢血単核球よりの単球をGM-CSF+LPSで誘導した活性化マクロファージはブタ血管内皮細胞(SEC)に対し強い細胞傷害活性を示したが、HLA-Eおよび α 2,6-ST遺伝子の導入により、SECはマクロファージ誘導細胞傷害から著明に免れた。

②. ブタisletsには、ヒトisletsに見られない硫酸化糖が多数見受けられ、現在抗原性との関連を検索中である。

③. CRISPR法の確立。設定したCMAH(ex7)のoff-target siteとしては、検索ではN=14で全て0

であった。現在、Exon7のbestのtarget siteを検索中である。

D. 考察

作製したhybrid遺伝子構築に関しては、in vitroでの発現の確認を終え、動物個体（マウス）での発現を確かめている。顕微受精法（ICSI法）によりブタ個体の作出を試み失敗に終わったが、胚盤胞形成試験で高効率であったため、経験的に遺伝子導入可能と判断した。

あくまで最終的には、 α -Gal+CMAH-ダブルKO-ブタに、これらのhybrid遺伝子を発現させる事が目標なので、検定としては十分ではないが一応終了して、次のステップに進んだ。つまり、既存のlineを整理して α -Gal-KOブタのlineを使って、CHAHをKOしたブタ（ダブルKO-ブタ）の繊維芽細胞に検定済の新奇hybrid遺伝子を高発現させ、それを核移植する方法である。

一方、既存のhomozygous GalT-KOブタに新たな遺伝的背景を導入した細胞から、生存可能なクローンブタが得られたことから、homozygous GalT-KO細胞において従来懸念されていた近交化の影響やエピジェネティック変異の影響が、ある程度改善されたと考えている。現在、homozygous GalT-KOかつheterozygous CMAH-KO個体作出までの達成状況である。

また新しいKO方法である今回のCRISPR/CS法や、TALEN法、あるいはZFN法は、以前の相同組み換え法に比べて、かなり容易にKOできる様になったと考えられる。これらの方法は我々の系においてダブルKOクローン個体の作出に有効であると判断できた。

さらに、新たなKO目的の遺伝子あるいは導入遺伝子の検討として、HLA-Eの導入がNK細胞だけでなくマクロファージに対して、既に有効性が報告されているCD47以上の抑制効果が確認できた。また α 2,6-STの遺伝子導入もマクロファージの細胞傷害活性を著明に抑制することが明らかとなった。さらに、糖鎖抗原の解析から担当遺伝子を検索する一步として硫酸転移酵素が考えられたことも大きな収穫である。

最後に、大動物を使った実験に関しては費用がか

かる。今回、新奇遺伝子のブタでの発現実験はブタ個体まで行なって確認する事になっていたが、2年目まで流産が続き、顕微受精法による胚盤胞形成試験で代用するかたちとなった。資金的な理由からも十分な実験が出来ず、効率は良いとは言えない。アメリカや韓国並の資金供与が望まれる。またブタのlineの整理に関しては、ブタは生まれるのに約4ヶ月かかり、生殖年齢まで達する事を考えると1サイクル1年はかかるため、これもまた資金量や期間面での制約と相まって制約がかかったが、うまく効率よく既存のlineが整理できたと考える。

E. 結論

プロジェクトの2年目もICSI法でブタに遺伝子導入したが産仔を得なかった為、現在進行中のpCHAH（H-D抗原）をin vitroでKOしたブタの胎児の繊維芽細胞に、導入予定の遺伝子を高発現させ、その核を移植する方法が新たに考えられた。一方、既存のhomozygous GalT-KOブタの正常性・生存性を改善し、さらに超急性拒絶反応克服において α Galに次ぐ糖鎖抗原であるH-D抗原の除去には、ブタCMAH 遺伝子のgenomeの配列も確認し、目途がたった。

加えて、マクロファージに対して有効な遺伝子が判明し、新たな糖鎖抗原の研究にも目処がたった。また別法としてのCRISPR/CS法も含めて新奇KO法は今後のブタでのKOに有効と考えられた。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

<論文発表>

1. 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*. 43:782-6, 2013.
2. 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*. 183:412-8, 2013.
3. Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shuji Miyagawa. The suppression of inflammatory macrophage-mediated cytotoxicity and proinflammatory cytokine production by transgenic expression of HLA-E. *Transplant Immunology*. 29:76-81, 2013.
 4. Shuji Miyagawa, Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Sachiko Kondo, Shinichi Matsumoto, Teru Okitsu, Masafumi Goto, Hiroshi Nagashima. A comparison of the main structures of *N*-glycans of porcine islets with those from humans. *Glycobiology*. 24:25-38, 2014.
 5. Akira Maeda, Takuji Kawamura, Dandan Wang, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Shuji Miyagawa. Monocytic suppressor cells derived from human peripheral blood suppress xenogenic immune reaction. *Xenotransplantation*. In press.
 6. Akira Maeda, Takuji Kawamura, Kengo Nakahata, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shuji Miyagawa. Regulation of macrophage-mediated xenocytotoxicity by overexpression of alpha 2,6-sialyltransferase in swine endothelial cells. *Transplant Proc*. In press.
 7. Matsunari H, Kobayashi T., Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Nagaya M, Hara M, Nakachi H, Nagashima H: Transgenic pigs with pancreas specific expression of green fluorescent protein. *J Reprod Dev*. In press.
 8. Hara S, Umeyama K, Yokoo T, Nagashima H, Nagata M: Diffuse glomerular nodular lesions in diabetic pigs carrying a dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha, an inheritant diabetic gene in humans. *PLoS One* DOI: 9:e92219. DOI: 10.1371/journal.pone.0092219/PONE-D-13-45932 [pii], 2014.
 9. Wuensch A, Baehr A, Bongoni AK, Kemter E, Blutke A, Baars W, Haertle S, Zakhartchenko V, Kurome M, Kessler B, Faber C, Abicht JM, Reichart B, Wanke R, Schwitzer R, Nagashima H, Rieben R, Ayares D, Wolf E, Klymiuk N: Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in single- and multitransgenic pigs. *Transplantation*. 97:138-47, 2014.
 10. Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Maehara M, Kanai T, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Takayanagi S, Arai Y, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H: Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. *PLOS ONE* 8:e76478. DOI: 10.1371/journal.pone.0076478 PONE-D-13-27603 [pii], 2013.
 11. Klymiuk N, Blutke A, Graf A, Krause S, Burkhardt K, Wuensch A, Krebs S, Kessler B, Zakhartchenko V, Kurome M, Kemter E, Nagashima H, Schoser B, Herbach N, Blum H, Wanke R, Aartsma-Rus A, Thirion C, Lochmuller H, Walter M.C, Wolf E: Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum Mol Genet* 22:4368-82, 2013.
 12. Kurome M, Geistlinger L, Kessler B, Zakhartchenko V, Klymiuk N, Wuensch A, Richter A, Baehr A, Kraehe K, Burkhardt K, Flisikowski K, Flisikowska T, Merkl C, Landmann M, Durkovic M, Tschukes A, Kraner S, Schindelbauer D, Petri T, Kind A, Nagashima H, Schnieke A, Zimmer R, Wolf E: Factors influencing the efficiency of generating genetically engineered pigs by nuclear transfer: multi-factorial analysis of a large data set. *BMC Biotechnol* 13:43, 2013.
 13. Yamamoto A, Ikeda K, Wang D, Nakatsu S, Takama Y, Ueno T, Nagashima H, Kondo A, Fukuzawa M,

Miyagawa S: Trial using pig cells with the H-D antigen knocked down. *Surgery Today*. 43:782-6, 2013.

14. Arai Y, Ohgane J, Fujishiro S, Nakano K, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N, Sakamoto N, Makino T, Yagi S, Shiota K, Hanazono Y, Nagashima H: DNA methylation profiles provide a viable index for porcine pluripotent stem cells. *Genesis*. 51:763-776, 2013.
15. Maehara M, Sato M, Watanabe M, Matsunari H, Kokubo M, Kanai T, Sato M, Matsumura K, Hyon SH, Yokoyama M, Mochida J, Nagashima H: Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets. *BMC Biotechnology*. 13:58, 2013.
16. Shigeta T, Hsu HC, Enosawa S, Matsuno N, Kasahara M, Matsunari H, Umeyama K, Watanabe M, Nagashima H: Transgenic pig expressing the red fluorescent protein kusabira-orange as a novel tool for preclinical studies on hepatocyte transplantation. *Transplantation Proceedings*. 45:1808-1810, 2013.
17. Umeyama K, Honda K, Matsunari H, Nakano K, Hidaka T, Sekiguchi K, Mochizuki H, Takeuchi Y, Fujiwara T, Watanabe M, Nagaya M, Nagashima H. Production of diabetic offspring using cryopreserved epididymal sperm by in vitro fertilization and intrafallopian insemination techniques in transgenic pigs. *J Reprod Dev*. 59: 599-603, 2013.

<総説>

1. 内倉鮎子、松成ひとみ、前原美樹、長嶋比呂志：卵・組織・細胞シートのガラス化保存の現状と可能性、*再生医療* 13, 48-51, 2014.

<著書（共著）>

1. 長嶋比呂志：哺乳動物胚および卵子の凍結保存。In: *繁殖生物学*. Edited by 日本繁殖生物学会：interzoo; 2013: 278-289.
2. 松成ひとみ、長嶋比呂志：動物個体内での臓器

再生。In: *幹細胞研究と再生医療*. 南山堂; 2013: 130-135.

< 国際学会 >

1. Dandan Wang, Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Shinichi Matsumoto, Teru Okitsu, Masafumi Goto, Hiroshi Nagashima, Shuji Miyagawa. The main structures of *N*-glycans of porcine islets. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST) Sep2-6. In Kyoto
2. Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Shuji Miyagawa. Regulation of macrophage-mediated xenocytotoxicity by overexpression of alpha 2,6-sialyltransferase in swine endothelial cells. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST). Sep2-6. In Kyoto
3. Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Shuji Miyagawa. Monocytic suppressor cells derived from human peripheral blood suppress xenogenic NK lysis. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST). Sep2-6. In Kyoto
4. Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shuji Miyagawa. Poly I:C-activated monocytic suppressor cells suppress xenogenic cytotoxicity via IDO-dependent mechanisms. The 12th International Xenotransplantation Association. Nov10-13. In Osaka
5. Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shuji Miyagawa. The suppression of inflammatory macrophage-mediated cytotoxicity and proinflammatory cytokine production by transgenic expression of HLA-E. The 12th International Xenotransplantation Association. Nov10-13. In Osaka
6. Dandan Wang, Akira Maeda, Takuji Kawamura,

- Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shuji Miyagawa. Regulation of macrophage-mediated xenocytotoxicity by overexpression of alpha 2,6-sialyltransferase in swine endothelial cells. The 12th International Xenotransplantation Association. Nov 10-13. In Osaka.
7. Shuji Miyagawa, Akira Maeda, Dandan Wang, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shinichi Matsumoto, Teru Okitsu, Masafumi Goto, Hiroshi Nagashima. The adult porcine islets preparation contained several glycans that were not detected in human islets. The 12th International Xenotransplantation Association. Nov 10-13. In Osaka.
 8. Dandan Wang, Akira Maeda, Takuji Kawamura, Kengo Nakahata, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Nagashima, Shuji Miyagawa. The structures of *N*-glycans of neonatal porcine islet-like cell clusters. The 12th International Xenotransplantation Association. Nov10-13. In Osaka.
 9. Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Kanai T, Hayashida G, Matsumura K, Kobayashi M, Kuramoto M, Asano Y, Sakai R, Uchikura A, Arai Y, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nagashima H: Application of blastocyst complementation to development of genetically modified pigs for xenotransplantation. The 12th International Xenotransplantation Association. Nov10-13. In Osaka.
 10. Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Maehara M, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: In vivo generation of exogenic pancreas in apancreatic cloned pigs via blastocyst complementation. The 12th International Xenotransplantation Association. Nov10-13. In Osaka.
 11. Sahara H, Nagashima H, Miura K, Waki S, Kawai A, Nakano K, Matsunari H, Arai Y, Sekijima M, Tasaki M, Setoyama K, Shimizu A, Date H, Yamada K: Attenuation of hyperacute dysfunction and microangiopathy by the treatment of carbon monoxide in GalT-KO pulmonary xenotransplantation. The 12th International Xenotransplantation Association. Nov10-13. In Osaka.
 12. Waki S, Sahara H, Miura K, Kawai A, Sekijima M, Nakano K, Matsunari H, Arai Y, Tasaki M, Shimizu A, Nagashima H, Yamada K: Porcine CMV may be the causative agent of porcine kidney rejection in GalT-KO pig to nonhuman primate preclinical xenotransplantation. The 12th International Xenotransplantation Association. Nov10-13. In Osaka.
 13. Uchikura A, Wakayama T, Wakayama S, Matsunari H, Maehara M, Matsumura Y, Nakano K, Sasaki E, Okahara J, Tsuchiya H, Nakauchi H, Nagashima H: Practical application of the hollow fiber vitrification method for cryopreservation of mammalian embryos. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: Jan 11-14. Reno, USA.
 14. Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Maehara M, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: In vivo exogenic organ generation with organogenesis-disabled cloned pigs as a platform. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: Jan 11-14. Reno, USA.
 15. Kobayashi M, Watanabe M, Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Hayashida G, Matsumura Y, Kuramoto M, Sakai R, Arai Y, Umeyama K, Watanabe N, Onodera M, Nagaya M, Nagashima H: Generation and characterization of transgenic-cloned pigs expressing the far-red fluorescent protein monomeric plm. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: Jan 11-14. Reno, USA.
- <招待講演・国際学会>
1. Shuji Miyagawa. The study for the antigenicity in pig

to human xenotransplantation. First Korean Xenotransplantation Association Symposium. Jun 28. In Seoul.

2. Nagashima H: Tg pigs- recent progress: Multiple Tg+GalTKO. In: Joint IXA/JEXSPINE Plenary Session. The 12th International Xenotransplantation Association. Nov10-13. In Osaka.

<国内学会>

1. 宮川周士、前田 晃、河村拓司、中島賢吾、上野豪久、臼井規朗、伊川正人、岡部 勝、長嶋比呂志. 臨床移植用遺伝子改変ブタ. 補体シンポジウム (50), 旭川7月5-6日。
2. 前田 晃、河村 拓史、上野豪久、臼井規朗、江口 寛、宮川周士. ヒトHLA-E遺伝子強制発現によるマクロファージ性細胞傷害の抑制効果の検討. 日本移植学会 (49)、京都 H25年9月5-7日。
3. 宮川周士、王 丹丹、前田晃、江口寛、上野豪久、臼井規朗、後藤昌史、松本慎一、長嶋比呂志. ブタ豚島の硫酸化糖の抗原性について。日本移植学会 (49)、京都 H25年9月5-7日。
4. 内倉鮎子、松成ひとみ、松村幸奈、中野和明、浅野吉則、前原美樹、若山清香、若山照彦、長嶋比呂志: 中空糸ガラス化法の実用化に関する研究-1: 融解速度の胚生存性への影響. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京。
5. 牧野智宏、東大、内田奈緒美、坂本望、新井良和、松本守雄、長嶋比呂志、大鐘潤: ブタにおけるFbn1遺伝子のエピジェネティック制御解析. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京。
6. 東大、内田奈緒美、坂本望、牧野智宏、新井良和、長嶋比呂志、大鐘潤: 骨格筋分化抑制遺伝子MstnのDNAメチル化による発現制御. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京。
7. 内田奈緒美、東大、坂本望、牧野智宏、新井良和、長嶋比呂志、大鐘潤: 脂肪細胞分化に関わる遺伝子の発現制御. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京。
8. 坂本望、東大、内田奈緒美、牧野智宏、新井良和、長嶋比呂志、大鐘潤: ブタHnf1a, Hnf4aの肝臓特異的発現にはDNAメチル化とアンチセンス非コードRNAが関与する. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京。
9. 林田豪太、渡邊将人、松成ひとみ、中野和明、金井貴博、小林美里奈、松村幸奈、倉本桃子、坂井理恵子、浅野吉則、内倉鮎子、前原美樹、新井良和、梅山一大、長屋昌樹、沢野朝子、宮脇敦史、長嶋比呂志: 細胞周期可視化蛍光プローブFucci を発現するブタ体細胞核移植胚の作出. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京。
10. 浅野吉則、松成ひとみ、小林美里奈、内倉鮎子、中野和明、林田豪太、松村幸奈、倉本桃子、坂井理恵子、金井貴博、松田泰輔、新井良和、渡邊将人、長嶋比呂志: DNAメチル化阻害剤およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がブタ体細胞核移植胚の発生能に及ぼす影響. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京。
11. 松村幸奈、前原美樹、本田香澄、林田豪太、倉本桃子、中野和明、松成ひとみ、小林美里奈、内倉鮎子、浅野吉則、渡邊将人、梅山一大、長屋昌樹、長嶋比呂志: ガラス化保存された体外成熟/体外受精胚を用いた糖尿病モデル遺伝子改変ブタの作出. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京。
12. Akira Maeda, Takuji Kawamura, Kengo Nakahata, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shuji Miyagawa. Transgenic expression of HLA-E and CD33 suppresses macrophage-mediated cytotoxicity and pro-inflammatory cytokine. 日本異種移植研究会(16)、大阪 H25年11月10日。
13. Akira Maeda, Takuji Kawamura, Kengo Nakahata, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shuji Miyagawa. Transgenic expression of HLA-E and CD33 suppresses macrophage-mediated cytotoxicity

- and pro-inflammatory cytokine. 日本異種移植研究会(16)、大阪 H25年11月10日。
14. 内倉鮎子, 松村幸奈, 中野和明, 浅野吉則, 長嶋比呂志: 中空糸法によるマウス胚およびブタ胚のガラス化保存. In: 第58回日本生殖医学会学術講演会・総会: 15-16 Nov 2013; 神戸。
 15. 坂井理恵子, 中野和明, 松成ひとみ, 新井良和, 渡邊將人, 梅山一大, 佐原寿史, 山田和彦, 長屋昌樹, 宮川周士, 長嶋比呂志: 異種移植研究における遺伝子改変ブタの作出への人工生殖技術の利用. In: 第1回日本先進工医学ブタ研究会: 12 Nov 2013; 大阪。
 16. 坂井理恵子, 中野和明, 松成ひとみ, 新井良和, 渡邊將人, 梅山一大, 長屋昌樹, 宮川周士, 長嶋比呂志: 遺伝子改変クローンブタ開発における人工生殖技術を利用した遺伝的バックグラウンドの更新. In: 第16回日本異種移植研究会: 10 Nov 2013; 大阪。
 17. 松田泰輔, 渡邊將人, 中野和明, 松成ひとみ, 小林美里奈, 林田豪太, 倉本桃子, 金井貴博, 山口智之, 中内啓光, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: ブタ卵におけるmRNA injection法を用いたZinc Finger Nucleasesによる遺伝子ノックアウト. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸。
 18. Arai Y, Ohgane J, Fujishiro S, Nakano K, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N, Sakamoto N, Makino T, Yagi S, Shiota K, Hanazono Y, Nagashima H: Evaluation of porcine induced pluripotent stem cells based on the DNA methylation profile of mouse embryonic stem cell-specific hypomethylated loci. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸。
 19. 渡邊將人, 中野和明, 松成ひとみ, 松田泰輔, 金井貴博, 小林美里奈, 松村幸奈, 坂井理恵子, 倉本桃子, 林田豪太, 浅野吉則, 高柳就子, 新井良和, 梅山一大, 長屋昌樹, 豊花, 長嶋比呂志: Zinc finger nuclease発現mRNAによるIL2RG遺伝子ノックアウトブタの作出. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸。
 20. 松成ひとみ, 浅野吉則, 小林美里奈, 内倉鮎子, 渡邊將人, 梅山一大, 長屋昌樹, 中内啓光, 長嶋比呂志. 膵臓欠損ブタ胎仔を用いた外来性細胞由来膵臓形成の試み. In: 第13回日本再生医療学会総会: 4-6 Mar 2014; 京都。
 21. 前原美樹, 佐藤正人, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 松村幸奈, 坂井理恵子, 小久保舞美, 松村和明, 玄丞然, 長嶋比呂志. ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存法の開発: 実用化に向けた改良研究-1. In: 第13回日本再生医療学会総会: 4-6 Mar 2014; 京都。
- <招待講演・国内>
1. 宮川周士, 前田晃, 江口寛, 長嶋比呂志. 異種移植の現況. 日本移植学会 (49)、京都 H25年9月5-7日。
 2. 長嶋比呂志: 遺伝子改変ブタ・クローンブタによるトランスレーショナルリサーチの展開. In: 第4回東海大学テニュアトラック制度シンポジウム: 14 Dec 2013; 伊勢原。
 3. 長嶋比呂志: トランスレーショナルリサーチにおけるクローンブタ・遺伝子改変ブタの可能性. In: 第5回愛宕Nephrology Forum: 26 Nov 2013; 東京。
 4. 長嶋比呂志: クローンブタをプラットフォームとするトランスレーショナルリサーチ. In: 東京医科歯科大学大学院特別講義: 11 Oct 2013; 東京。
 5. 長嶋比呂志: 生殖工学技術が拓く未来の動物生産. In: 第106回日本繁殖生物学会市民公開講座: 14 Sep 2013; 東京。
 6. 長嶋比呂志: クローンブタを用いた臓器移植・再生研究の現状と将来展望. In: 第28回福島移植フォーラム: 27 Jul 2013; 福島。
 7. 長嶋比呂志: クローン動物の医学・医療への利用. In: 第5回産学連携情報交換会(農林水産省主催): 18 Jun 2013; 東京。
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特に無し。

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

分担代表者 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。マクロファージに対して有効な遺伝子を判明し、また、新たな糖鎖抗原の研究にも目処がたった。別法としてのCRISPR/CS法はブタでのKOに有効と考えられた。

研究協力者

大阪大学大学院医学系研究科

上野豪久 (助教)、王丹丹 (院生)、
河村拓司 (院生)、前田章 (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. 研究方法

1). 既存の α -Gal(α 1,3 galactosyl transferase)-KOブタに、既に報告があるCMAH(cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, H-D抗原)のKOを加え、さらに出来上がった新奇のhybrid遺伝子を導入する。

この間、将来を見据えて、マクロファージ/樹上細胞(DC)を制御できる新たな遺伝子を検索するとともに、 α GalとH-D抗原以外の新たな糖鎖抗原を作り出す原因遺伝子を検索する。

①. ブタ血管内皮に対するヒト・マクロファージ/DCによる障害を制御する分子を検定した。

②. ブタとヒトのisletsの糖鎖構造を中心に3次元HPLC法及び質量分析(MALDI-TOF-MS)にて検索。

③. CRISPR法の適応。

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced

Short Palindromic Repeats) /Cas (CRISPR Associated) システムでのブタCMAH遺伝子のKO siteを検索した。

C. 結果

1). 新規遺伝子の検索:

①. 末梢血単核球よりの単球をGM-CSF+LPSで誘導した活性化マクロファージはブタ血管内皮細胞(SEC)に対し強い細胞傷害活性を示したが、HLA-Eおよび α 2,6-ST遺伝子の導入により、SECはマクロファージ誘導細胞傷害から著明に免れた。

②. ブタisletsには、ヒトisletsに見られない硫酸化糖が多数見受けられ、現在抗原性との関連を検索中である。

③. CRISPR法の確立。 設定したCMAH(ex7)のbestのtarget siteをブタ細胞で有効である事が判明した。

D. 考察

既存のlineを整理して α -Gal-KOブタのlineを使って、CMAHをKOしたブタ(ダブルKO-ブタ)の繊維芽細胞に検定済の新奇hybrid遺伝子を高発現させ、それを核移植する方法を考えている。

新たなKO目的の遺伝子あるいは導入遺伝子の検討として、HLA-Eの導入がNK細胞だけでなくマクロファージに対して、既に有効性が報告されているCD47以上の抑制効果が確認できた。また α 2,6-STの遺伝子導入もマクロファージの細胞傷害活性を著明に抑

制することが明らかとなった。さらに、糖鎖抗原の解析から担当遺伝子を検索する一步として硫酸転移酵素が考えられたことも大きな収穫である。

E. 結論

α Galに次ぐ糖鎖抗原であるH-D抗原の除去には、ブタCMAH 遺伝子のknockoutの目途がたった。

加えて、マクロファージに対して有効な遺伝子が判明し、新たな糖鎖抗原の研究にも目処がたった。また別法としてのCRISPR/CS法は、今後のブタでのKOに有効と考えられた。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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*. 2013;43:782-6.
- ② 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*. 183:412-8, 2013.
- ③ Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shuji Miyagawa. The suppression of inflammatory macrophage-mediated cytotoxicity and proinflammatory cytokine production by transgenic expression of HLA-E. *Transplant Immunology*. 29:76-81, 2013
- ④ Shuji Miyagawa, Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Sachiko Kondo, Shinichi Matsumoto, Teru Okitsu, Masafumi Goto, Hiroshi Nagashima. A comparison of the main

structures of *N*-glycans of porcine islets with those from humans. *Glycobiology*. 2014, 24, 25-38.

- ⑤ Akira Maeda, Takuji Kawamura, Dandan Wang, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Shuji Miyagawa. Monocytic suppressor cells derived from human peripheral blood suppress xenogenic immune reaction. *Xenotransplantation*. in press.
- ⑥ Akira Maeda, Takuji Kawamura, Kengo Nakahata, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shuji Miyagawa. Regulation of macrophage-mediated xenocytotoxicity by overexpression of alpha 2,6-sialyltransferase in swine endothelial cells. *Transplant Proc*. In press

2. 学会発表

- ① 宮川周士、前田 晃、河村拓司、中嶋賢吾、上野豪久、臼井規朗、伊川正人、岡部 勝、長嶋比呂志. 臨床移植用遺伝子改変ブタ. 補体シンポジウム (50), 旭川7月5-6日
- ② 前田 晃、河村 拓史、上野豪久、臼井規朗、江口 寛、宮川周士. ヒトHLA-E遺伝子強制発現によるマクロファージ性細胞傷害の抑制効果の検討. 日本移植学会 (49)、京都 H25年9月5-7日
- ③ 宮川周士、王 丹丹、前田晃、江口寛、上野豪久、臼井規朗、後藤昌史、松本慎一、長嶋比呂志. ブタ膵島の硫酸化糖の抗原性について
- ④ 宮川周士、前田晃、江口寛、長嶋比呂志. 異種移植の現況
- ⑤ Akira Maeda, Takuji Kawamura, Kengo Nakahata, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shuji Miyagawa. Transgenic expression of HLA-E and CD33 suppresses macrophage-mediated cytotoxicity and pro-inflammatory cytokine. 日本異種移植研究会 (16)、大阪 H25年11月10日
- ⑥ 坂井理恵子、中野和明、松成ひとみ、新井良和、渡邊将人、梅山一大、長屋昌樹、宮川周士、長嶋比呂志. 遺伝子改変クローンブタ開発における人工生殖技術を利用した遺伝的バックグラウ

ンドの更新。日本異種移植研究会(16)、大阪
H25年11月10日

- ⑦ Akira Maeda, Takuji Kawamura, Kengo Nakahata, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shuji Miyagawa. Transgenic expression of HLA-E and CD33 suppresses macrophage-mediated cytotoxicity and pro-inflammatory cytokine. 日本異種移植研究会(16)、大阪 H25年11月10日
- ⑧ 坂井理恵子、中野和明、松成ひとみ、新井良和、渡邊将人、梅山一大、佐原寿史、山田和彦、長屋昌樹、宮川周士、長嶋比呂志。異種移植における遺伝子改変ブタの作出への人工生殖技術の利用。日本先進医工学ブタ研究会(1)、大阪 11月12日
- 学会発表(国際学会)
- ① Shuji Miyagawa. The study for the antigenicity in pig to human xenotransplantation. First Korean Xenotransplantation Association Symposium 2013.Jun 28. In Seoul.
- ② Dandan Wang, Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Shinichi Matsumoto, Teru Okitsu, Masafumi Goto, Hiroshi Nagashima, Shuji Miyagawa. The main structures of *N*-glycans of porcine islets. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST)Sep2-6,In Kyoto
- ③ Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Shuji Miyagawa. Regulation of macrophage-mediated xenocytotoxicity by overexpression of alpha 2,6-sialyltransferase in swine endothelial cells. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST)Sep2-6,In Kyoto
- ④ Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Shuji Miyagawa. Monocytic suppressor cells derived from human peripheral blood suppress xenogenic NK lysis. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST)Sep2-6,In Kyoto
- ⑤ Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno,

Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shuji Miyagawa. Poly I:C-activated monocytic suppressor cells suppress xenogenic cytotoxicity via IDO-dependent mechanisms. The 12th International Xenotransplantation Association.Nov 10-13 in Osaka

- ⑥ Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shuji Miyagawa. The suppression of inflammatory macrophage-mediated cytotoxicity and proinflammatory cytokine production by transgenic expression of HLA-E. The 12th International Xenotransplantation Association.Nov 10-13 in Osaka
- ⑦ Dandan Wang, Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shuji Miyagawa. Regulation of macrophage-mediated xenocytotoxicity by overexpression of alpha 2,6-sialyltransferase in swine endothelial cells. The 12th International Xenotransplantation Association.Nov 10-13 in Osaka
- ⑧ Shuji Miyagawa, Akira Maeda, Dandan Wang, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shinichi Matsumoto, Teru Okitsu, Masafumi Goto, Hiroshi Nagashima. The adult porcine islets preparation contained several glycans that were not detected in human islets. The 12th International Xenotransplantation Association.Nov 10-13 in Osaka
- ⑨ Dandan Wang, Akira Maeda, Takuji Kawamura, Kengo Nakahata, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Nagashima, Shuji Miyagawa. The structures of *N*-glycans of neonatal porcine islet-like cell clusters. The 12th International Xenotransplantation Association.Nov 10-13 in Osaka.

H. 知的所有権の出願・登録状況
特に無し

遺伝子改変ブタの作出に関する研究

研究分担者 長嶋比呂志 明治大学農学部生命科学科発生工学研究室 教授

研究要旨：既存の $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase gene knockout (GalT-KO)ブタへ有性生殖を介して新しい遺伝的背景の導入を行い、より体細胞クローニングに適した homozygous GalT-KO 細胞を樹立した。樹立した細胞の体細胞クローニングによって、GalT-KO 生存産仔が得られることが確認された。

さらに、ゲノム編集技術を用いて、Hanganutziu-Deicher (H-D)抗原の合成を司る cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH)遺伝子をノックアウトすることに成功した。最終的に、GalT/CMAH-ダブル homozygous KO の遺伝形質を持つ、雌雄の細胞が樹立された。

A. 研究目的

既存の $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase gene knockout (GalT-KO)ブタをベースとして、より体細胞クローニングに適した細胞を樹立することを目的とした。さらに、GalT-KO 細胞に対して、Hanganutziu-Deicher (H-D) 抗原の合成を司る cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH)遺伝子ノックアウトを追加することを、第2の目的とした。

B. 研究方法

1. 遺伝的背景を更新した homozygous GalT-KO 細胞の樹立とクローン産仔の作出

雌の homozygous GalT-KO クローンブタ (DK3-9 系)を野生型雄ブタと交配し、heterozygous GalT-KO ブタを新たに作出した。これによって、体細胞クローニングにより無性生殖的に維持されてきた GalT-KO ブタの系統に、有性生殖を介して新しい遺伝的背景の導入を行った。得られた heterozygous GalT-KO 雌を、既存の

homozygous GalT-KO 雄個体 (DK3-1 系)の精子で人工的に受精させ胎仔を得た。この胎仔より樹立した繊維芽細胞 (DK3-1neo)を用いて、体細胞核移植によるクローン個体作出を行った。

2. 雌の GalT/CMAH-ダブル KO 細胞の獲得

雌の homozygous GalT-KO クローンブタ (DK3-9)の細胞を対象に、CMAH 遺伝子を標的とする Zinc finger nuclease (ZFN) mRNA を導入した。得られた heterozygous CMAH-KO 細胞を体細胞核移植に用いて、クローン産仔の作出を行った。homozygous CMAH-KO 細胞の樹立のため、この得られたクローン産仔由来繊維芽細胞 (heterozygous CMAH-KO)へ再度 ZFN mRNA を導入した。

3. 雄の GalT/CMAH-ダブル KO 細胞の獲得

遺伝的背景を更新した homozygous GalT-KO 細胞 (DK3-1neo)を用いて、

CMAH 遺伝子を標的とする Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) mRNA の導入を行った。

C. 結果

1. 遺伝的背景を更新した homozygous GalT-KO 細胞の樹立とクローン産仔の作出

遺伝的背景を更新した homozygous GalT-KO 細胞 (DK3-1neo) から 4 頭のクローン産仔を得た。その内 3 頭は産後虚弱のため、出生後 2 日までに試料採取に供した。残る 1 頭は出生後 33 日まで生存を確認した後、試料採取に供した。

2. 雌の GalT/CMAH-ダブル KO 細胞の獲得

新たに樹立した homozygous GalT-KO/heterozygous CMAH-KO 細胞から、4 頭のクローン産仔を得た。4 頭中の 1 頭は健常であったが、3 頭は死産あるいは産後虚弱であった。出生後 2 日に健常個体から次世代クローン個体作出のための初代培養細胞を樹立した。この細胞へ再度 ZFN mRNA を導入することにより、homozygous GalT-KO/homozygous CMAH-KO のダブル KO 細胞を、最終的に 2 ライン樹立した。これにより雌の GalT/CMAH-ダブル KO 細胞が獲得された。

3. 雄の GalT/CMAH-ダブル KO 細胞の獲得

遺伝的背景が更新された homozygous

GalT-KO 細胞 (DK3-1neo) に対する TALEN mRNA による遺伝子改変を行った結果、homozygous GalT-KO/homozygous CMAH-KO のダブル KO 細胞が、最終的に 2 ライン樹立された。これにより雄の GalT/CMAH-ダブル KO 細胞が獲得された。

D. 考察

既存の homozygous GalT-KO ブタに新たな遺伝的背景を導入した細胞から、生存可能なクローンブタが得られたことから、homozygous GalT-KO 細胞において従来懸念されていた近交化の影響やエピジェネティック変異の影響が、ある程度改善されたと考えられる。

ZFN や TALEN を用いたゲノム編集は、既存の遺伝子ノックアウトブタ（すなわち GalT-KO）に新たな遺伝子ノックアウト（すなわち CMAH-KO）を追加するために有効であった。

超急性拒絶反応克服において $\alpha 1,3$ -galactose epitope に次ぐ障害である H-D 抗原の除去にも成功したことで、今後の研究の進展が大いに期待される。本研究で、ゲノム編集技術を用いて、雌雄の GalT/CMAH-ダブル KO 細胞が樹立されたので、今後はこれらの細胞が体細胞核移植に適した増殖能や染色体正常性を有しているかどうかを見極める必要がある。細胞の状態が良好であれば、それらを用いた体細胞クローニングによって、GalT/CMAH-ダブル homozygous KO 個体の作出は、十分可能であると考えられる。

E. 結論

既存の homozygous GalT-KO ブタを、有性生殖のサイクルに組み入れることで、個体の正常性・生存性を改善し得た。ゲノム編集技術の利用により、既存の遺伝子ノックアウトブタへの新たな遺伝子ノックアウトの追加は、十分に実用的な効率で行い得る。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

<原著論文>

1. Matsunari H, Kobayashi T, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Nagaya M, Hara M, Nakauchi H, Nagashima H: Transgenic pigs with pancreas specific expression of green fluorescent protein. *J Reprod Dev* 60:in press. 2014.
2. Hara S, Umeyama K, Yokoo T, Nagashima H, Nagata M: Diffuse glomerular nodular lesions in diabetic pigs carrying a dominant- negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha, an inheritant diabetic gene in humans. *PLoS One* DOI: 9:e92219. DOI: 10.1371/journal.pone.0092219PONE-D-13-45932 [pii], 2014.

3. Wuensch A, Baehr A, Bongoni AK, Kemter E, Blutke A, Baars W, Haertle S, Zakhartchenko V, Kurome M, Kessler B, Faber C, Abicht JM, Reichart B, Wanke R, Schwinzer R, Nagashima H, Rieben R, Ayares D, Wolf E, Klymiuk N: Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in single- and multitransgenic pigs. *Transplantation*, DOI: 10.1097/TP.0b013e3182a95cbc, 2013.
4. Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Maehara M, Kanai T, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Takayanagi S, Arai Y, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H: Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. *PLOS ONE* 8:e76478. DOI: 10.1371/journal.pone.0076478 PONE-D-13-27603 [pii], 2013.
5. Klymiuk N, Blutke A, Graf A, Krause S, Burkhardt K, Wuensch A, Krebs S, Kessler B, Zakhartchenko V, Kurome M, Kemter E, Nagashima H, Schoser B, Herbach N, Blum H, Wanke R,

- Aartsma-Rus A, Thirion C, Lochmuller H, Walter M.C, Wolf E: Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum Mol Genet* 22:4368-82, 2013
6. Kurome M, Geistlinger L, Kessler B, Zakhartchenko V, Klymiuk N, Wuensch A, Richter A, Baehr A, Kraehe K, Burkhardt K, Flisikowski K, Flisikowska T, Merkl C, Landmann M, Durkovic M, Tschukes A, Kraner S, Schindelbauer D, Petri T, Kind A, Nagashima H, Schnieke A, Zimmer R, Wolf E: Factors influencing the efficiency of generating genetically engineered pigs by nuclear transfer: multi-factorial analysis of a large data set. *BMC Biotechnol* 13:43. DOI: 1472-6750-13-43 [pii], 10.1186/1472-6750-13-43, 2013
7. Yamamoto A, Ikeda K, Wang D, Nakatsu S, Takama Y, Ueno T, Nagashima H, Kondo A, Fukuzawa M, Miyagawa S: Trial using pig cells with the H-D antigen knocked down. *Surg Today* 43:782-6. DOI: 10.1007/s00595-012-0274-x, 2013
8. Arai Y, Ohgane J, Fujishiro S, Nakano K, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N, Sakamoto N, Makino T, Yagi S, Shiota K, Hanazono Y, Nagashima H: DNA methylation profiles provide a viable index for porcine pluripotent stem cells. *Genesis*, 51(11):763-776, 2013.
9. Maehara M, Sato M, Watanabe M, Matsunari H, Kokubo M, Kanai T, Sato M, Matsumura K, Hyon SH, Yokoyama M, Mochida J, Nagashima H: Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets. *BMC Biotechnology* , 13:58, 2013.
10. Maeda A, Ueno T, Nakatsu S, Wang DD, Usui N, Takeishi S, Okitsu T, Goto M, Nagashima H, Miyagawa S: A lectin microarray study of glycoantigens in neonatal porcine islet-like cell clusters. *Journal of Surgical Research* , 183(1):412-418, DOI 10.1016/j.jss.2012.12.037, 2013.
11. Shigeta T, Hsu HC, Enosawa S, Matsuno N, Kasahara M, Matsunari H, Umeyama K, Watanabe M, Nagashima H: Transgenic pig expressing the res fluorescent protein kusabira-orange as a nobel tool for preclinical studies on hepatocyte transplantation. *Transplantation Proceedings*, 45:1808-1810, 2013.
12. Umeyama K, Honda K, Matsunari H,

Nakano K, Hidaka T, Sekiguchi K, Mochizuki H, Takeuchi Y, Fujiwara T, Watanabe M, Nagaya M, Nagashima H. Production of diabetic offspring using cryopreserved epididymal sperm by in vitro fertilization and intrafallopian insemination techniques in transgenic pigs. J Reprod Dev 59(6): 599-603, 2013.

<総説>

1. 内倉鮎子、松成ひとみ、前原美樹、長嶋比呂志：卵・組織・細胞シートのガラス化保存の現状と可能性、再生医療 13, 48-51, 2014

<著書（共著）>

1. 長嶋比呂志：哺乳動物胚および卵子の凍結保存. In: 繁殖生物学. Edited by 日本繁殖生物学会: interzoo; 2013: 278-289.
2. 松成ひとみ, 長嶋比呂志：動物個体内での臓器再生. In: 幹細胞研究と再生医療. 南山堂; 2013: 130-135.

<招待講演・国際学会>

1. Nagashima H: Tg pigs- recent progress: Multiple Tg+GalTKO. In: Joint IXA/JEXSPINE Plenary Session: 13 Nov 2013; Osaka.

<招待講演・国内>

1. 長嶋比呂志：遺伝子改変ブタ・クロー

ンブタによるトランスレショナルリサーチの展開. In: 第4回東海大学テニユアトラック制度シンポジウム: 14 Dec 2013; 伊勢原.

2. 長嶋比呂志：トランスレショナルリサーチにおけるクローンブタ・遺伝子改変ブタの可能性. In: 第5回愛宕 Nephrology Forum: 26 Nov 2013; 東京.
3. 長嶋比呂志：クローンブタをプラットフォームとするトランスレショナルリサーチ. In: 東京医科歯科大学大学院特別講義: 11 Oct 2013; 東京.
4. 長嶋比呂志：生殖工学技術が拓く未来の動物生産. In: 第106回日本繁殖生物学会市民公開講座: 14 Sep 2013; 東京.
5. 長嶋比呂志：クローンブタを用いた臓器移植・再生研究の現状と将来展望. In: 第28回福島移植フォーラム: 27 Jul 2013; 福島.
6. 長嶋比呂志：クローン動物の医学・医療への利用. In: 第5回産学連携情報交換会(農林水産省主催) : 18 Jun 2013; 東京.

<国際学会>

1. Uchikura A, Wakayama T, Wakayama S, Matsunari H, Maehara M, Matsumura Y, Nakano K, Sasaki E, Okahara J, Tsuchiya H, Nakauchi H, Nagashima H: Practical application of the hollow fiber vitrification method for

- cryopreservation of mammalian embryos. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.
2. Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Maehara M, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: In vivo exogenic organ generation with organogenesis-disabled cloned pigs as a platform. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.
 3. Kobayashi M, Watanabe M, Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Hayashida G, Matsumura Y, Kuramoto M, Sakai R, Arai Y, Umeyama K, Watanabe N, Onodera M, Nagaya M, Nagashima H: Generation and characterization of transgenic-cloned pigs expressing the far-red fluorescent protein monomeric plum. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.
 4. Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Kanai T, Hayashida G, Matsumura K, Kobayashi M, Kuramoto M, Asano Y, Sakai R, Uchikura A, Arai Y, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nagashima H: Application of blastocyst complementation to development of genetically modified pigs for xenotransplantation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.
 5. Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Maehara M, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: In vivo generation of exogenic pancreas in apancreatic cloned pigs via blastocyst complementation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.
 6. Sahara H, Nagashima H, Miura K, Waki S, Kawai A, Nakano K, Matsunari H, Arai Y, Sekijima M, Tasaki M, Setoyama K, Shimizu A, Date H, Yamada K: Attenuation of hyperacute dysfunction and microangiopathy by the treatment of carbon monoxide in GalT-KO pulmonary xenotransplantation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.
 7. Waki S, Sahara H, Miura K, Kawai A, Sekijima M, Nakano K, Matsunari H, Arai Y, Tasaki M, Shimizu A, Nagashima H, Yamada K: Porcine CMV may be the causative agent of

porcine kidney rejection in GalT-KO pig to nonhuman primate preclinical xenotransplantation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.

<国内学会>

1. 松成ひとみ、浅野吉則、小林美里奈、内倉鮎子、渡邊将人、梅山一大、長屋昌樹、中内啓光、長嶋比呂志。臍臓欠損ブタ胎仔を用いた外来性細胞由来臍臓形成の試み。In: 第13回日本再生医療学会総会: 4-6 Mar 2014; 京都。
2. 前原美樹、佐藤正人、松成ひとみ、内倉鮎子、松村幸奈、坂井理恵子、小久保舞美、松村和明、玄丞然、長嶋比呂志。ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存法の開発：実用化に向けた改良研究-1。In: 第13回日本再生医療学会総会: 4-6 Mar 2014; 京都。
3. 松田泰輔、渡邊将人、中野和明、松成ひとみ、小林美里奈、林田豪太、倉本桃子、金井貴博、山口智之、中内啓光、長屋昌樹、長嶋比呂志。ブタ卵におけるmRNA injection法を用いたZinc Finger Nucleasesによる遺伝子ノックアウト。In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸。
4. Arai Y, Ohgane J, Fujishiro S, Nakano K, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N, Sakamoto N, Makino T, Yagi S, Shiota K, Hanazono Y, Nagashima H: Evaluation of porcine induced pluripotent stem cells based on the DNA methylation profile of mouse embryonic stem cell-specific hypomethylated loci. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸。
5. 渡邊将人、中野和明、松成ひとみ、松田泰輔、金井貴博、小林美里奈、松村幸奈、坂井理恵子、倉本桃子、林田豪太、浅野吉則、高柳就子、新井良和、梅山一大、長屋昌樹、豊花、長嶋比呂志: Zinc finger nuclease発現mRNAによるIL2RG遺伝子ノックアウトブタの作出。In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸。
6. 内倉鮎子、松村幸奈、中野和明、浅野吉則、長嶋比呂志: 中空糸法によるマウス胚およびブタ胚のガラス化保存。In: 第58回日本生殖医学会学術講演会・総会: 15-16 Nov 2013; 神戸。
7. 坂井理恵子、中野和明、松成ひとみ、新井良和、渡邊将人、梅山一大、佐原寿史、山田和彦、長屋昌樹、宮川周士、長嶋比呂志: 異種移植研究における遺伝子改変ブタの作出への人工生殖技術の利用。In: 第1回日本先進医工学ブタ研究会: 12 Nov 2013; 大阪。
8. 坂井理恵子、中野和明、松成ひとみ、新井良和、渡邊将人、梅山一大、長屋昌樹、宮川周士、長嶋比呂志: 遺伝子改変クローンブタ開発における人工生殖技術を利用した遺伝的バックグラウ