

201322012B

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23～25年度 総合研究報告書

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 14
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 21
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 30
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 33

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

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した。超急性拒絶反応を止める主軸とな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、動物個体（マウス）での発現とブタ胚盤胞形成試験の結果よりブタへの遺伝子導入可能と判断した。一方、既存のhomozygous GalT-K0ブタの正常性・生存性を改善した。さらに、GalT-K0ブタの胎児繊維芽細胞を用い、H-D抗原をin vitroでknockoutすることに複数line（雌・雄）成功した。

今後、GalT/H-DダブルK0ブタ個体作出後の胎児繊維芽細胞を用い、あるいはこのin vitro K0の胎児繊維芽細胞を用い、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

岡部 勝

大阪大学遺伝情報実験センター 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）、前田章（研究員）

河村拓司（院生）、王 丹丹（院生）、

高間勇一（医員）、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）

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。現有する異種抗原 α -Galをknockout (K0)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 (knock out: 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-K0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-K0/h

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

CD46/TFPI/CTLA4-Igブタを作成している。

一方、欧州では、ナンテ大 (仏) でGal-KO/CD55/CD59/CD39/HTブタを作出。ハノーバー大 (独) で、Gal-KO の作成した。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。さらに、昨年、米国と韓国でHanganutziu-Deicher (H-D) のKOが報告されている。

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32の報告が有り。加えて、5年前よりニュージーランドではLCT社をたちあげ、国会で承認され、免疫隔離膜下の膵島移植の臨床が始めている。ロシア、アルゼンチンでこれに続いている。さらに数年前より、大塚製薬工場KKが出資した合弁会社がこのLCT社を引き継いでいる。

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。

B. 研究方法

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, CII TA。

* 保存——Hemoxygenase-1。

* 内在性ブタレトロウイルス (PERV) のKD。

* H-D抗原の遺伝子 (cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase : CMAH) のKO、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、現在世界で使われているpromoterは一般的に、CMVやRSVのウイルスpromoter、Chick β actin (pCAGGS)、human EF-1 α 、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。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 in suline 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ため、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しないので、この部分を取り除いた構造を作出した。

Thrombomodulin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。

また、CTDMの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、あとでこれを加えた<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IRESでhuman β 2mを繋ぎ合わせた<HLA-E*>。また新たに、これらを2Aで繋ぎ合わせた<HLA-Ev>。

* 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。

H-1 promoterにpol部分のsiRNA(#1)を組み込む。又、U6 promoterも用意し、他の部分のsiRNA(#2)を組み込む。

3. In vitroでの発現確認

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

まずは、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+MCPeyt(-)<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児の獲得を試みた。

次に、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。

6. ブタのline整理

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。

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。

7. ダブルKOブタ作り

既存の α -Gal-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)。

①homozygous 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。

②. 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。

8. 更なる遺伝子の検索。

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。

(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. 作製した遺伝子構築。

*. 補体制御 + α

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

Cl-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#
1)

2. 新規に作製した遺伝子構築。

* NCTDM < 補体制御 + α >

Cl-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)

3. 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。

4. 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(脾臓での発現を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で脾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。

5. ブタでの発現

I. 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。さらに3頭にCTDMを含めて移植した。しかし、産仔は得られなかった。

II. 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 2.7% [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頭に移植した。しかし、産仔は得られなかった。

6. ブタ line の整理

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。

この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。1頭は33日目まで生存 (死因不明)。

7. ダブルKOブタ作り

①. DK3-9系 (雌) の細胞に、ZFN法で新たに homozygous GalT /heterozygous CMAH-KO細胞を樹立。この細胞から、核移植で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ZFN法でhomozygous GalT/CMAH-KO細胞を2 line 樹立。

②. 新しい遺伝的背景を導入したhomozygous GalT-KO細胞 (DK3-1neo) の遺伝子改変により、この細胞より (TALEN) 法でhomozygous GalT-KO/homozygous CMAH-KOのダブルhomozygous KO細胞を2 line 樹立した。

8. 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を決定し、ブタ細胞で効果を検証した。

D. 考察

作製したhybrid遺伝子構築に関しては、的を射た分子が、改良の上出来上がったと考えている。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、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針である。

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、細胞レベルでは既に、GalT/CMAH-ダブルKOを2種類（雌雄）作出している。

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法をブタの系で習得した。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。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 $\alpha 2, 6$ -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年目まで流産が何度か続き、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

1年目、2年目と通じて、ICSI法での遺伝子導入を試みたが流産した。このため、新たな課題であるCHAHをKOしたブタの胎児を確立し、その繊維芽細胞に導入予定の遺伝子を高発現させ、さらに核移植す

る方法が考えられた。

一方、既存のhomozygous GalT-KOブタの正常性・生存性を改善でき、さらに α Galに次ぐ糖鎖抗原であるH-D抗原のKOに目処がたった。加えて、マクロファージに対して有効な遺伝子が判明し、新たな糖鎖抗原の検索にも目処がたった。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

<論文発表>

1. 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;44:1136-8.
2. 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;44:1134-5.
3. Shuji Miyagawa, Yuichi Takama, Hiroshi Nagashima, Takehisa Ueno and Masahiro Fukuzawa. Carbohydrate antigens. *Curr Opin Organ Transplant.* 2012; 17: 174-9.
4. 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* 2013;43:1439-47.
5. 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.* 2012;79:218-228.

6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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*, DOI: 10.1097/TP.0b013e3182a95cbc, 2013.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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. 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, 2011. Sep 25th-28th, Seoul, Korea.
 2. 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, 2011. Sep 25th-28th, Seoul, Korea.
 3. Hiroaki 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, 2011. Sep 25th-28th, Seoul, Korea.

4. Hiroaki Kashiwada, Akiko Nanjyo, Shino Nakatsu, Yuichi Takama, Teru Okitsu, Hiroshi Nagashima, Masahiro Fukuzawa, Shuji Miyagawa. In comparison with APIs, NICCs are very rich in a 2,6Neu5NAc, 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.
5. Wang D, Maeda A, Ueno T, Takama Y, Fukuzawa M, Matsumoto S, Okitsu T, Goto M, Kondou K, Nagashima H, Miyagawa S. 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. The 24th International Congress of the Transplantation Society. 2012. July 15-19, Berlin.
6. Akira Maeda, Takuji Kawamura, Dandan Wang, Takehisa Ueno, Noriaki Usui and Shuji Miyagawa. Monocytic suppressor cells derived from peripheral blood suppress CTL lysis in xenotransplantation. Seoul Forum on Xenotransplantation. 2012. Nov. 3, Seoul.
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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
14. 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.

15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
- < 招待講演・国際学会 >
1. Shuji Miyagawa. Complements in transplantation. 12th Congress of the Asian Society of Transplantation, 2011. Sep 25th-28th, Seoul, Korea.
 2. Shuji Miyagawa A study for glyco antigens in porcine islets. Seoul Forum on Xenotransplantation. 2012. Nov. 3, Seoul, Korea.
 3. Shuji Miyagawa A feature of glyco-antigen in porcine islets. 2012 CABX Workshop and International Symposium. Transgenic Animal and its Application. Dec.2-4, Seogwipo, Jeju, Korea.
 4. Shuji Miyagawa. The study for the antigenicity in pig to human xenotransplantation. First Korean Xenotransplantation Association Symposium. 2013. Jun 28. In Seoul.
 5. Nagashima H: Tg pigs- recent progress: Multiple Tg+GalTKO. In: Joint IXA/JEXSPINE Plenary Session: 13 Nov 2013; Osaka.
- < 国内学会 >
1. 宮川周士、南條明子、柏田紘明、福沢正洋、武石

- 俊作、興津 輝、長嶋比呂志、松本慎一. α Gal-knockoutブタ関連の膵島の糖鎖抗原の解析. 日本移植学会 (47)、仙台 2011. 10月5-6日.
2. 高間勇一、柏田紘明、南條明子、中津志野、王丹丹、福沢正洋、宮川周士、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. 日本移植学会 (47)、仙台 2011. 10月5-6日
3. 宮川周士・王丹丹・高間勇一・上野豪久・福沢正洋、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月10日
4. 王丹丹、高間勇一、上野豪久、武石俊作、福沢正洋、宮川周士、興津 輝、松本慎一、中野和明、松成ひとみ、長嶋比呂志. α Gal-knockoutブタ関連の膵島の糖鎖抗原の解析日本異種移植研究会、広島 2011. 12月10日
5. 王丹丹、高間勇一、上野豪久、南條明子、乾中智佳子、福沢正洋、武石俊作、宮川周士、興津輝、長嶋比呂志. 新生児ブタ膵島の糖鎖について. 日本異種移植研究会、広島 2011. 12月10日
6. 王丹丹、高間勇一、上野豪久、福沢正洋、宮川周士、興津 輝、松本慎一、後藤昌史、長嶋比呂志. ブタ膵島の糖鎖抗原について. 膵・膵島移植研究会旭川 2011. 3月9-10日
7. 前田晃、王丹丹、野上有里子、上野豪久、臼井規朗、宮川周士. 末梢血単核球より得られた monocytic suppressor cellsによる異種移植拒絶反応抑制効果の検討. 日本移植学会 (48)、2012. 名古屋 9月20-21日
8. 宮川周士、前田晃、野上有里子、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. ブタとヒト膵島の糖鎖抗原の差異について. 日本移植学会 (48)、2012. 名古屋 9月20-21日
9. 前田 晃. Poly I:C activated monocytic suppressor cells suppress CTL lysis in xenotransplantation via mechanisms independent of iNOS and arginase-1. 日本免疫学会 (41) 神戸、2012. 12月5-7日
10. 前田 晃、王丹丹、野上有里子、上野豪久、臼井規朗、宮川周士. Poly-IC活性化monocytic suppressor cellsによる異種抗原特異的CTL抑制効果の検討. 日本異種移植研究会(15)、京都 2012. 12月8日
11. 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. 膵島の糖鎖構造についての検討. 日本異種移植研究会(15)、京都 2012. 12月8日
12. 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 2013. 7月5-6日
13. 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 2013. 年9月5-7日
14. 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. 日本移植学会 (49)、京都 2013. 年9月5-7日
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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
24. 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
25. 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.
26. 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.
27. 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. In: 第16回日本異種移植研究会: 10 Nov 2013; 大阪.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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: 脾臓欠損ブタ胎仔を用いた外来性細

胞由来臓器形成の試み. In: 第13回日本再生医療学会総会: 4-6 Mar 2014; 京都.

32. 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.

G. 知的所有権の取得状況
特に無し。

<招待講演・国内>

1. 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月22日
2. 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 2013. 9月5-7日
3. 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回東海大学テニユアトラック制度シンポジウム: 14 Dec 2013; 伊勢原.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.

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

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した。超急性拒絶反応を止める主軸とな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、動物個体(マウス)での発現とブタ胚盤胞形成試験の結果よりブタへの遺伝子導入可能と判断した。

今後、GalT/cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH)ダブルKOブタ個体作出後の胎児繊維芽細胞を用い、あるいはこのin vitro KOの胎児繊維芽細胞を用い、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)、前田章(研究員)
河村拓司(院生)、王丹丹(院生)、
高間勇一(医員)、山本志野(研究員)、
南條明子(研究員)、乾中智佳子(研究員)、

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。

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。現有する異種抗原 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。

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

B. 研究方法

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, CII TA。
- * 保存—Hemoxygenase-1。
- * 内在性ブタレトロウイルス(PERV)のKD。

* H-D抗原の遺伝子(cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase : CMAH)のKO、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、現在世界で使われているpromoterは一般的に、CMVやRSVのウイルスpromoter、Chick β actin(pCAGGS)、human EF-1 α 、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ため、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しないので、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。

また、CTDMの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、あとでこれを加えた<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IRESでhuman β 2mを繋ぎ合わせた<HLA-E*>。また新たに、これらを2Aで繋ぎ合わせた<HLA-Ev>。

* 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。

H-1 promoterにpol部分のsiRNA (#1)を組み込む。又、U6 promoterも用意し、他の部分のsiRNA (#2)を組み込む。

3. In vitroでの発現確認

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. 更なる遺伝子の検索。

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。

(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. 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---pCAGG
S/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#
1)

2. 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 <H
LA-Ev>--- pCPI/HLA-Ev

* PERVの制御 PERVのKD---U6/siRNA-PERV (pol#
2)

3. 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。

4. 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を決定し、ブタ細胞で効果を検証した。

D. 考察

作製したhybrid遺伝子構築に関しては、的を得た分子が、改良の上出来上がったと考えている。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hybd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、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針である。

また、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

1年目、2年目と通じて、ICSI法での遺伝子導入を試みたが流産した。このため、新たな課題であるCHAHをKOしたブタの胎児を確立し、その繊維芽細胞に導入予定の遺伝子を高発現させ、さらに核移植する方法が考えられた。

一方、既存のhomozygous GalT-KOブタの正常性・生存性を改善でき、さらに α Galに次ぐ糖鎖抗原であるH-D抗原のKOに目処がたった。加えて、マクロファージに対して有効な遺伝子が判明し、新たな糖鎖抗原の検索にも目処がたった。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

<論文発表>

1. 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;44:1136-8.
2. 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;44:1134-5.
3. Shuji Miyagawa, Yuichi Takama, Hiroshi Nagashima, Takehisa Ueno and Masahiro Fukuzawa. Carbohydrate antigens. *Curr Opin Organ Transplant.* 2012; 17: 174-9.
4. 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* 2013;43:1439-47.
5. 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.
6. 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.
7. 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
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.

12. 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*, 183:412-418, DOI 10.1016/j.jss.2012.12.037, 2013.

< 国際学会 >

1. 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, 2011. Sep 25th-28th, Seoul, Korea.
2. 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, 2011. Sep 25th-28th, Seoul, Korea.
3. Hiroaki 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, 2011. Sep 25th-28th, Seoul, Korea.
4. Hiroaki Kashiwada, Akiko Nanjyo, Shino Nakatsu, Yuichi Takama, Teru Okitsu, Hiroshi Nagashima, Masahiro Fukuzawa, Shuji Miyagawa. In comparison with APIs, NICCs are very rich in a 2,6Neu5NAc, 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 Congre-

ss for Xenotransplantation (Joint Conference with CST), 23-26 October, 2011, Miami, USA.

5. Wang D, Maeda A, Ueno T, Takama Y, Fukuzawa M, Matsumoto S, Okitsu T, Goto M, Kondono K, Nagashima H, Miyagawa S. 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. The 24th International Congress of the Transplantation Society. 2012. July 15-19, Berlin.
6. Akira Maeda, Takuji Kawamura, Dandan Wang, Takehisa Ueno, Noriaki Usui and Shuji Miyagawa. Monocytic suppressor cells derived from peripheral blood suppress CTL lysis in xenotransplantation. Seoul Forum on Xenotransplantation. 2012. Nov. 3, Seoul.
7. 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
8. 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
9. 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
10. Akira Maeda, Takuji Kawamura, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Hiroshi Eguchi, Shuji Miyagawa. Poly I:C-activated monocytic suppressor cells suppress xenogenic cytotoxicity via IDO-