

- dependent mechanisms. The 12<sup>th</sup> 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 12<sup>th</sup> 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 12<sup>th</sup> 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 12<sup>th</sup> 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 12<sup>th</sup> International Xenotransplantation Association. Nov 10-13 in Osaka.
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.

< 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.  $\alpha$  Gal-knockoutブタ関連の豚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.  $\alpha$  Gal-knockoutブタ関連の豚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. 新生児ブタ豚島の糖鎖について. 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. ブタ豚島の糖鎖抗原について. 豚・豚島移植研究会旭川 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による異種移植絶対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
- < 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.

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 monocyte 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、明治大長嶋比呂志. 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. 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
16. 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

<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
- G. 知的所有権の取得状況  
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

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

### 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。複数の補体制御因子をhybrid化した分子、及びHLA-Eを高発現する変異分子のブタ胚盤胞形成試験を行い、その結果よりブタへの遺伝子導入可能と判断した。

つぎに、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。

### 研究協力者

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)

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。

### 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 $\alpha$ -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。

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 $\alpha$ -Gal抗原のKOに成功し2006年末ホモが産まれた。我々は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。

具体的には、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

### B. 研究方法

#### 1. 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Cl-INH+Thrombomodulin+DAF+MCPcyt (-)<CTDM>とHLA-Ev (147)+IRES+human  $\beta$ -2 microglobulin (h $\beta$ 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/ $\mu$ lおよび2.5ng/ $\mu$ 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 $\alpha$ -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。

## 2. ダブルKOブタ作り

既存の $\alpha$ -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。

### (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. 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/ $\mu$ l区では2.5ng/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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。

### 2. ブタlineの整理

$\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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。一頭は33日目まで生存した(死因不明)。

### 3. 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 樹立した。

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。

#### D. 考察

作製したhybrid遺伝子構築に関しては、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、 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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

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。

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  $\alpha$ -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  $\alpha$ 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. 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.
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.

15. 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, Schindelhauer 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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, 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 24<sup>th</sup> International Congress of the Transplantation Society. 2012. July 15-19, Berlin.
6. 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 13<sup>th</sup> Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST) Sep2-6, In Kyoto
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 12<sup>th</sup> 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 12<sup>th</sup> International Xenotransplantation Association. Nov 10-13 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. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; 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. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; 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. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; 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. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association



(IXA): 10-13 Nov 2013; 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: 11-14 Jan 2014; 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: 11-14 Jan 2014; 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 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. 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.  $\alpha$  Gal-knockoutブタ関連の臍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.  $\alpha$ Gal-knockoutブタ関連の臍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. 新生児ブタ臍島の糖鎖について. 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. ブタ臍島の糖鎖抗原について. 臍・臍島移植研究会旭川 2011. 3月9-10日
7. 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. ブタとヒト臍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
8. 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. 臍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
9. 宮川周士、前田 晃、河村拓司、中畠賢吾、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
10. 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. ブタ臍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
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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回日本生殖医学学会学術講演会・総会: 15-16 Nov 2013; 神戸.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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. 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.

26. 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. 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.
  2. 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.
  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.
  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.
- G. 知的所有権の取得状況  
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

研究分担者 岡部 勝 大阪大学微生物研究所 教授  
伊川 正人 大阪大学微生物研究所 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、Transgenic mouse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、これもTransgenic mouseで発現を確かめた。また、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Plidromic Repeats) /Cas (CRISPR Associated) システムでのブタCMAH遺伝子のknockoutに一定の目途がたった。

### 研究協力者

蓮輪英毅 (助教)、江崎陽子 (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。現有する異種抗原  $\alpha$ -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。

### 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,  $\alpha$ -1,2FT, Endo- $\beta$ -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  $\beta$  actin (pCAGGS)、human EF-1 $\alpha$ 、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  $\beta 2m$ 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. 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BDF1xBDF 1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。

### 4. CMAH遺伝子の検索および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。

① CMAHのexon7部位に焦点をあて、そこにまず8カ所のsiteを設定し、さらに4カ所に絞り込んだ。

② この4カ所を含む遺伝子を約490bpでcloningし、pCAG-EGxxFP vectorに組み込んだ。(pCAG-EGxxFP-CMAH (Ex7)作成)

③ これをCHO細胞に遺伝子導入し、lineを確立した。

④ 設定したKO siteをpX330のBbsI siteに挿入し、この遺伝子を樹立したCHO細胞のlineに対して導入し、48時間後のGFPの発現量を検定した。

(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。

検定その他に使うマウス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 +  $\alpha$

C1-INH - DAF - DAF <C1DD>-----  
pCAGGS(chick  $\beta$  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)+humanβ2m--pCAGGS/HLA-Ev(147)-IRES-hβ2m <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-hβ2m <HLA-Ev\*>-- pCPI/HLA-Ev

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

## 3. マウスでの発現

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

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

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

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

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

## 4. 新規遺伝子の検索 :

①. 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。

1). off-target siteの検定。

設定したCMAH(ex7)のoff-target siteとしては、gS01<N12: 23><N13: 2><N14: 0>、gS03<N12: 3><N13: 0><N14: 0>、gAS04<N12: 0><N13: 0><N14: 0> gSA08<N12: 20><N13: 6><N14: 0>であった。

2). Validation in vitro

GFP強度は、gS01がbestと考えられた。

## 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。

また新しいKO方法である今回のCRISPH/CS法は、相同組み換え法に比べて、かなり容易にKOできると考えられた。CRISPH/CS法はダブルKOクローン個体の作出に有効であると判断できた。

## E. 結論

超急性拒絶反応克服において、的を得たhybrid遺伝子構築分子が、改良の上出来上がった。

また、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 Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. Sci Rep. 3:3355, 2013.

## G. 知的所有権の取得状況

特に無し。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
長嶋比呂志	哺乳動物胚および卵子の凍結保存	日本繁殖生物学会	繁殖生物学	interzoo	日本	2013	278-289
松成ひとみ 長嶋比呂志	動物個体内での臓器再生	中内啓光	幹細胞研究と再生医療	南山堂	日本	2013	130-135

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	44	1136-8	2012
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	44	1134-5	2012
Shuji Miyagawa, Yuichi Takama, Hiroshi Nagashima, Takehisa Ueno and Masahiro Fukuzawa.	Carbohydrate antigens.	Curr Opin Organ Transplant	17	174-9	2012
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 $\alpha$ -Gal-knockout pig islets, compared with humans.	Surgery Today	43	1439-47	2013
Umeyama K, Saito H, Kurome M, Matsunari H, Watanabe M, Nakaochi H, Nagashima H.	Characterization of the ICS1-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, Kurume M, Kessler B, Wolf E, Miyagawa S, Nakauchi H, Nagashima H.	Cloning of Homozygous $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase Gene Knock-Out Pigs by Somatic Cell Nuclear Transfer.	InTech		37-54	2013
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
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

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
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
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		
Akira Maeda, Takuji Kawamura, Ken-ingo 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		
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.				
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 inherited diabetic gene in humans.	J Reprod Dev	60		2014
Wuensch A, Baehr A, Bongoni A, K, Kemter E, Blutke A, Baars W, Haertle S, Zakhartchenko V, Kurtschmeier J, Kessler B, Faber C, Abicht JM, Reichart B, Wanke R, Schwinzler 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.	PLoS One	9		2014
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, Hanaizono Y, Nagashima H.	Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA.	Transplantation	In press		
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 dystrophin muscle.	Hum Mol Gene	22	4368-82	2013



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, Schindelhauer D, Petri T, Kind A, Nagashima H, Schieke A, Zimmer R, Wolf E.	Factors influencing the efficiency of generating genetically engineered pigs by nuclear transfer: multi-factorial analysis of a large dataset.	BMC Biotechnology			2013
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	2013
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 cell.	Genesis	51	763-776	2013
Maehara M, Sato M, Watanabe M, Matsunari H, Kokubo M, Kanai T, Sato M, Matsumura K, Hyon S, Yokoyama M, Mochida J, Nagashima H.	Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets.	BMC Biotechnology	13	58	2013
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	1808-1808	2013
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	59	299-603	2013
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



## A Cloning of Cytidine Monophospho-*N*-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase From Porcine Endothelial Cells

K. Ikeda, A. Yamamoto, A. Nanjo, C. Inuinaka, Y. Takama, T. Ueno, M. Fukuzawa, K. Nakano, H. Matsunari, H. Nagashima, and S. Miyagawa

### ABSTRACT

**Introduction.** The Hanganutziu-Deicher (H-D) antigen with terminal *N*-glycolyl neuraminic acid-(NeuGc) is widely distributed in mammalian species including monkeys and apes, but is not found in humans and birds. After the knock out of  $\alpha$ 1, 3galactosyltransferase, the H-D antigen became a major antigen of the “non-Gal antigen.” The expression of NeuGc is controlled by the activity of cytidine monophospho-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH). In this study, molecular cloning of pig CMAH was performed, as the first step in producing H-D knockout pigs.

**Methods.** A pig endothelial cell line, MYP30, was used. The DNA sequence of pig CMAH was queried in dbEST (NCBI) using the BLAST program to search for cDNA fragments of pig CMAH, based on an alignment analysis of the mouse CMAH sequence. A polymerase chain reaction experiment was performed and candidate cDNA clones were isolated. To obtain the 5'-end and 3'-end of the open reading frame sequence, a 5'-full RACE Core Set and 3'-full RACE Core Set were used.

**Results.** We cloned and characterized the pig CMAH gene. The ATG is located in exon 4, which corresponds to the mouse gene, and the stop codon is in exon 17. In the case of the 5' site of the gene, exon 3 was identified but exons 1 and 2 are still being investigated. On the other hand, exon 18 was newly identified in the 3' site of the gene.

**Conclusion.** The results represent useful information for future clinical xenotransplantation studies.

**T**HE POTENTIAL FOR THE CLINICAL APPLICATION of xenotransplantation has generated considerable interest in recent years. However, glycoantigen continues to be a major obstacle in successful clinical use of this technique. After the hyperacute rejection is avoided by several strategies to downregulate the  $\alpha$ -Gal epitope, the Hanganutziu-Deicher (H-D) antigen could be a cause to make a strong humoral response in pig-to-human transplantation.<sup>1</sup> Someone reported for this possibility, and others were against it.

With the exception of human and chickens, the H-D antigen with terminal *N*-glycolyl neuraminic acid (NeuGc) is widely distributed in the animal kingdom. The expression of NeuGc is controlled by cytidine monophospho-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) activity. The human CMAH gene underwent a major mutation since the time of the last common ancestor with the bonobo and chimpanzee. In this study, pig CMAH was originally cloned as the first step of the knockout of this gene.

### MATERIALS AND METHODS

#### Cell

A pig endothelial cell (PEC) line, MYP30,<sup>2</sup> was used in this study. Culture media were supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and kanamycin/amphotericin B. Cultures were maintained in a 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere at 37°C.

From the Division of Organ Transplantation, Department of Surgery (K.I., A.Y., A.N., C.I., Y.T., T.U., M.F., S.M.), Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan, and Department of Life Science (K.I., K.N., H.M., H.N.), Meiji University, Kawasaki, Kanagawa, Japan.

This work was supported by Grants-in Aid for Scientific Research, and Health and Labor Sciences Research Grants, Japan.

Address reprint requests to Shuji Miyagawa, Division of Organ Transplantation, Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. E-mail: miyagawa@orgtrp.med.osaka-u.ac.jp

Cloning of CMAH

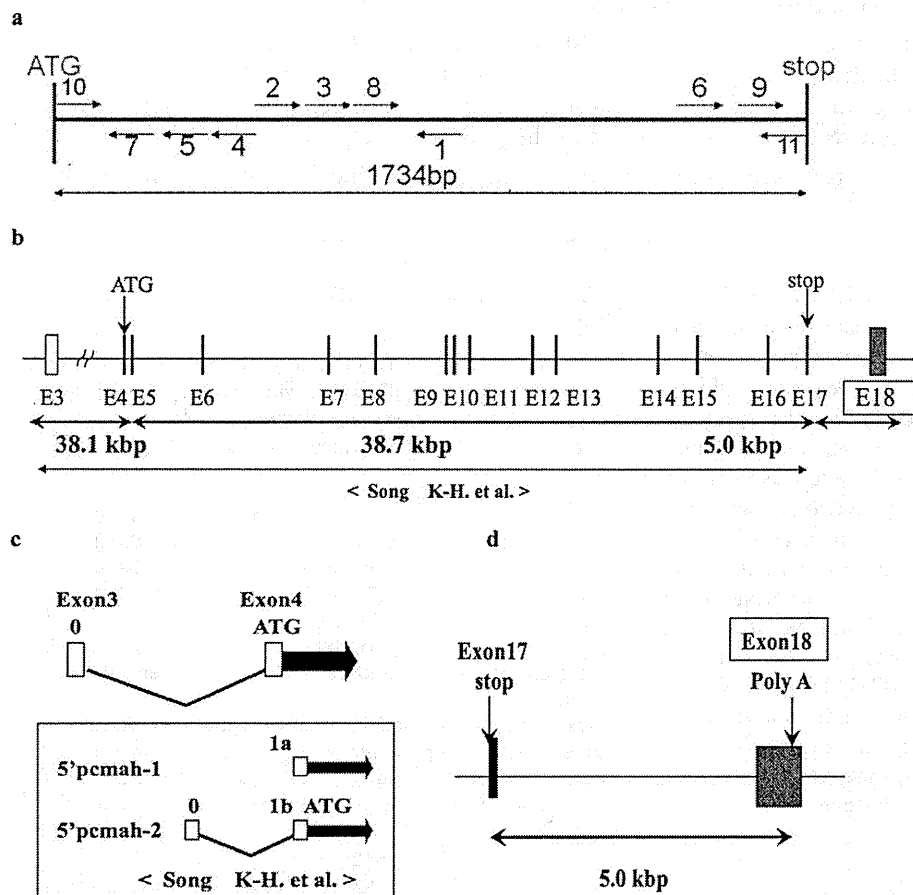
The DNA sequence of pig CMAH was queried in dbEST (NCBI) using the BLAST program to search for cDNA fragments of pig CMAH, based on an alignment analysis of the mouse CMAH sequence. Primers were identified, based on the EST cloning data. Total RNA was then isolated from the MYP-30 using the TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, Calif, USA). An oligoTex-dT30 mRNA purification kit was used for the mRNA preparation, following the manufacturer's recommended protocol (Takara, Tokyo, Japan). A portion of the mRNA was then reverse-transcribed using RevertraAce reverse-transcriptase (TOYOBO, Osaka, Japan) and a random oligo primer. A polymerase chain reaction experiment was performed and candidate cDNA clones were isolated using pyrobtest DNA polymerase (TOYOBO) with the following primers for pig CMAH: 5'-primer: CAGCGTGTGTTCAACTAATG, GAAGCTTGCTCATGTTATTCTG and 3'-primer: GTTGAACAGATGCGGAGAC, CACAGGATGAT-AGCAATTAACATG.

The amplified DNA fragments were subcloned into the EcoRV site of the pBluescript II SK(-) cloning vector by a TA-cloning method. The nucleotide sequences were determined by the dideoxy chain termination method using an ABI PRISM3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Calif, USA). To obtain the 5'-end and 3'-end of the open reading frame (ORF) sequence, a 5'-full RACE Core Set and 3'-full RACE Core Set (Takara) were used.<sup>3</sup>

RESULTS

Isolation of Pig CMAH cDNA

Several pig EST clones had a high homology with amino acid sequences common to mouse CMAH, suggesting that the porcine EST clones are partial sequences for pig CMAH. However, those dbEST sequences did not cover the whole sequence of pig CMAH. The cDNA fragments obtained were then subcloned into the plasmid vector and the sequence was confirmed by testing the multiple independent clones. The confirmed sequence of the ORF was in agreement with the report.<sup>4</sup> The specified primers for 5'-RACE, #1 to #5, 3'-RACE, #6, and sequence, #7 to #11, were next designed (Fig 1) < #1: TCAGCCTC-CAGCCAATCAG, #2: TGGGATTGAGAACCCAGATC, #3: GAAGTGCAGATCACGTACCT, #4: CGGGTTAG-GAGGATTAGTTC, #5: TTGACAGAAGCTTCCAG-GAG, #6: CGTGGTAAAGAATGGTCTGC, #7: TG-CATTTAACAGACCTTCCAT, #8: ACTACACGAGCCT-CCATCTGA, #9: TAAAACCTCCCCCTCACACCAC, #10: ATGAGCAGCATCGAACAACGAC, #11: CATCCCA-GAGCACATCAGGAA >. A 5'-RACE and a 3'-RACE were then performed to obtain the complete sequence of the pig CMAH mRNA.



**Fig 1.** Pig cytidine monophospho-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) was cloned from a pig cell line, MYP-30. (a) The primers. The position of primers for 5'- and 3'-RACE and for sequence are indicated. (b) The genome map of pig CMAH. The ATG of pig CMAH is located in exon 4, which corresponds to the mouse gene, and the stop codon is in exon 17. (c) The 5' end of CMAH gene. In the case of the 5' site of the gene, exon 3 was turned out but exons 1 and 2 were not, indicating just the same pattern as the reported data, 5'pcmah-2. (d) The 3' end of CMAH gene. Exon 18 was newly identified in the 3' site of the gene.

### Comparison of the AA Sequence With Other Mammals and Vertebrates

Alignment of the AA sequence of CMAH from the pig was then compared with other mammals and fish. The homology in the AA sequence of each CMAH was highly conserved among mammals: 89.4% for mouse, 92.4% for macaca, 92.7% for chimpanzee, 93.2% for human, and 54.8% for starfish.

### The Genome Map of Pig CMAH

To reveal the genome structure, the genome mapping of pig CMAH was performed in comparison with pig chromosome 7 ([CU468933] and [CT757509]:GenBank), using the BLAST program (NCBI). The ATG of pig CMAH is located in exon 4, which corresponds to the mouse gene, and the stop codon is in exon 17. While exon 18 was newly identified in the 3' site of the gene, in the case of the 5' site of the gene, exon 3 was also turned out but exons 1 and 2 are still being investigated (Fig 1).

### DISCUSSION

The expression of NeuGc is controlled by CMAH activity. A cDNA for human CMAH was cloned by two different groups.<sup>5,6</sup> The *N*-terminal truncation of the human hydroxylase is caused by the deletion of a 92-base pair-long exon 6, in the genomic DNA. Therefore, this epitope has the potential to be one of the largest epitopes in pig-to-human xenotransplantation, as a "non-Gal antigen," after  $\alpha$ 1,3GT is knocked out.

Concerning anti-H-D antibody production in humans, after many twists and turns, in 2002 Zhu et al indicated that the majority of human anti-non-Gal antibodies are specific for carbohydrate structures carrying terminally linked NeuGc, using flow cytometry and pig red blood cells that had been preincubated with sialidase. Furthermore, this anti-NeuGc activity was detectable in 85% of healthy humans.<sup>7</sup> In addition, the sialic acid genetics and biology include H-D antigen became clear as the genetic and physiological changes in human evolution.<sup>8</sup>

This program, to analyze the pig CMAH gene, actually started 3 years ago. During the delay of this project, clear data about pig CMAH gene have already been reported by Song et al.<sup>4</sup> They indicated a gene map until the stop codon and two types of 5'-UTR, such as 5'UTR-1(5'pcmah-1) and 5'UTR-2(5'pcmah-2; Fig 1c).

In this study, pig CMAH was cloned from a pig endothelial cell line, MYP-30. In the case of the 5' site of the gene, exon 3 was turned out and in agreement with the 5'UTR-2. However, exons 1 and 2 are still being investigated. On the other hand, exon 18 was identified in the 3' site of the gene. In addition, the reduction of the xenoantigenicity of the  $\alpha$ -Gal-KO PECs and fibroblasts by the siRNA of pig CMAH was now under investigation, to confirm if the H-D antigen synthesized by pig CMAH is one of the major non-Gal antigens. The results represent useful information for future clinical xenotransplantation studies.

### REFERENCES

1. Miyagawa S, Yamamoto A, Matsunami K, et al: Complement regulation in the GalT KO era. *Xenotransplantation* 17:11, 2010
2. Miyagawa S, Shirakura R, Iwata K, et al: Effects of transfected complement regulatory proteins, MCP, DAF, and MCP/DAF hybrid, on complement-mediated swine endothelial cell lysis. *Transplantation* 58:834, 1994
3. Matsunami K, Miyagawa S, Nakagawa K, et al: Molecular cloning of pigGnT-I and I.2: an application to xenotransplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 343:677, 2006
4. Song KH, Kang YJ, Jin UH, et al: Cloning and functional characterization of pig CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase for the synthesis of N-glycolylneuraminic acid as the xenoantigenic determinant in pig-human xenotransplantation. *Biochem* 427:179, 2010
5. Iric A, Koyama S, Kozutsumi Y, et al: The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans. *J Biol Chem* 273:15866, 1998
6. Chuu HH, Takematsu H, Diaz S, et al: A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11751, 1998
7. Zhu A, Hurst R: Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in healthy human serum. *Xenotransplantation* 9:376, 2002
8. Varki A: Uniquely human evolution of sialic acid genetics and biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(suppl) 2:8939, 2010