

## 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 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-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 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C1-INH+Thrombomodulin+DAF+MCPcyt(-)<CTDM>とHLA-Ev(147)+IRES+human -2 microglobulin(h 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 -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 -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）

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。

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/μl区では2.5ng/μl区に比してより高い胚盤胞形成率が得られる傾向であった（NCTDM：47.8% [11/23] vs 24.0% [6/25], HLA-Ev：34.8% [8/23] vs 22.7% [5/22]）。一方、胚盤胞の遺伝子導入効率については、両区に差は見られなかった（75.0-100%）。

胚移植試験には、発生率が高い傾向であった1.25ng/μlのDNA濃度を採用した。NCTDM遺伝子およびHLA-Ev遺伝子を導入した顕微授精胚、それぞれ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

-Gal KOブタ（雌）と野生型ブタとの交配によって得られたheterozygous KO産仔を、他の-Gal KOブタ精子により受胎させて胎仔を回収し、新たに9ラインの-Gal KOブタ細胞を樹立した。

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

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。

.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 -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 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  $\alpha$ 1,3-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, 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 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) Sep 2-6, 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。Gal-knockout プ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。プタ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。異種移植プタ開発研究の流れ。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。Gal-knockout プ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。新生児プ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。プ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. 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。プタとヒト豚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。豚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プタ。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。プ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 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: プタにおける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: プタ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: 中空系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.
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,



渡邊將人、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。

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。

