

201335023A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

(再生医療関係研究分野)

医療に役立つブタの開発研究:

免疫のないブタからヒト血液をもつブタへ

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 花園 豊

平成 26 年(2014 年)4 月

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

(再生医療関係研究分野)

医療に役立つブタの開発研究:

免疫のないブタからヒト血液をもつブタへ

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 花園 豊

平成 26 年(2014 年)4 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

医療に役立つブタの開発研究:免疫のないブタからヒト血液をもつブタへ

花園 豊 ----- 1

### II. 分担研究報告

実験用遺伝子改変ミニブタの開発に関する研究

長嶋比呂志 -----12

ブタ生体分子イメージングの開発と応用研究

西村 智 -----17

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----30

厚生労働科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(再生医療関係研究分野))  
総括研究報告書

医療に役立つブタの開発研究:免疫のないブタからヒト血液をもつブタへ

研究代表者 花園 豊  
自治医科大学 分子病態治療研究センター 再生医学研究部・教授

### 研究要旨

**目的:**本研究では、自治医科大学のブタ利用研究施設(ピッグセンター)を整備しながら、ブタの光分子イメージング技術を開発し、ヒトでの血栓性疾患への治療応用を検討する。これによって、ブタ生体内の血液細胞を可視化し、ブタ体内での血液細胞の動態や血栓形成の瞬間を捉える。ヒト血液細胞をもつブタ(ヒト化ブタ)等が出来れば、本技術を適用する。本研究を通して、ヒト病態モデルの作出、診断・治療技術の開発、薬効評価に役立てる。特にヒト iPS 細胞から作製した人工血小板のブタ生体内での動態解析を試みる。

**当該年度の成果:**1) ピッグセンターの整備(花園担当):ブタの無菌的管理を可能にする目的で、本学ピッグセンターに無菌ユニットを導入した。試験運転を行ない、ISO クラス 6 (クラス 1000)のクリーンルームを達成した。これは、病院無菌治療室の要件(クラス 10000 以下)を十分満たす無菌度である。ここで免疫抑制剤を投与した免疫不全ブタの試験飼育を実行した。

2) 実験用ブタの作製(長嶋担当):本年度は、研究分担者の長嶋が作製に成功した免疫不全(SCID)ブタの解析を行った。ブタの共通 $\gamma$ 鎖遺伝子ノックアウトにより、T 細胞および NK 細胞の欠損というヒトの X 連鎖重症複合免疫不全症に非常に類似した表現型が現れることを確認した。その他にも、赤色蛍光タンパクであるクサビラ・オレンジの遺伝子を組み込んだ、ミニブタ交雑種の作出に成功した。また、デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルブタの作製をめざして、ジストロフィン遺伝子ノックアウト細胞からクローン胚を作出し得ることを確認した。

3) ブタ用イメージングデバイスの開発・設置(西村・花園担当):ブタの体内組織・細胞の可視化を目的として、平成 25 年度は、ブタ等大型動物故に必要な正立顕微鏡および支持周辺機器を考案し、ブタに適用可能なイメージングデバイスを設置した。イメージングデバイスに必要なハードウェアおよびソフトウェアを開発した。

4) 生体光分子イメージング法の開発(西村担当):大型動物への予備検討として、平成 25 年度にはマウスを用いた生体光分子イメージング法を行った。具体的には、骨髄・末梢血管・代謝臓器におけるイメージングを行い、生活習慣病・血液疾患をはじめとする病態の基礎的・応用的知見を得た。たとえば、動脈硬化を基盤とした心筋梗塞・脳卒中のモデルとなる、レーザー傷害による血栓形成モデルを確立し、血栓形成過程の詳細を明らかにした。さらにヒト iPS 細胞のマウス生体内で評価系を確立し、ブタへの応用に備えた基礎技術を集積した。

## 研究分担者

長嶋比呂志・明治大学農学部教授

西村智・自治医科大学分子病態治療研究センター教授

### A. 研究目的

医学において「基礎研究」と「臨床応用」の間の道のりは決して短くない。iPS 細胞技術を含め新規技術の臨床応用には、マウスで proof-of-concept を取得後、大型動物を用いた有効性・安全性の検証が欠かせない。これこそ研究代表者らがかねてから推進してきたことである。実際、ブタやヒツジを用いた研究代表者らの実績は他に類を見ない。今までに本研究グループは、各種動物 iPS 細胞、ヒトの血液細胞をもつヒツジ、膝臓欠損ブタなど、大型動物利用研究で卓越した研究成果を挙げてきた。

自治医科大学のブタ等大型動物を用いた幹細胞・創薬研究は、平成 24 年 12 月厚労省「iPS 細胞等を利用した創薬研究支援事業」として採択され、ブタ研究施設のさらなる充実を図ったところである。さらに、本学は、平成 25 年度採択された JST 再生医療実現拠点ネットワークプログラム個別課題において、ヒト iPS 細胞由来の血液・免疫をもつ動物(ブタ等)を作製することになった。

最近、研究分担者の長嶋らは、免疫のないブタ(免疫不全ブタ)の作出に成功した。これをヒト細胞の受け皿として利用すれば、ヒトの癌など種々の疾患・病態をブタ in vivo で

再現できるようになる。

一方、研究分担者の西村らは、マウスを用いて生体光分子イメージング法を独自に開発し、生体内の各種細胞の動態や機能を可視化してきた。この生体イメージング法は、世界最高水準の解像度・マルチカラーで、生体内の多様な現象を可視化できる。ヒトでの再生医療への安全性・有効性の担保のためには、ブタは非常に有用である。さらに、iPS 細胞由来人工血小板をヒト iPS 細胞の最初の応用例として実現すべく、iPS 細胞由来人工血小板の効率のよい作製方法を樹立しただけでなく、NOG マウス内部での血栓形成を可能にした。

以上を踏まえ、本研究では、世界最高水準のブタ利用研究施設を整備しながら、ブタのイメージング技術を開発し、ブタ生体内の血液細胞の可視化をめざす。具体的には、ブタ生体内のヒト血液細胞を可視化する。たとえば、骨髄における造血幹細胞とニッチとの相互作用の可視化、炎症部位へのリンパ球・好中球浸潤の可視化、血小板が血栓を形成する瞬間の可視化等である。これらのイメージングは、創薬研究のみならず、種々病態メカニズムの解明や、新たな低侵襲臨床診断手法の樹立に役立つ。それを通して、ヒト病態モデルの作出、診断・治療技術の開発、薬効評価など医療に役立てる。

本研究では、自治医科大学の花園研究室と西村研究室、および明治大学の長嶋研究室が参画する。これら三研究室は、それぞれ

れの強みを活かし、ブタ研究において優れて相互補完的な関係にある(花園:細胞研究、長嶋:発生研究、西村:イメージング研究)。

自治医科大学ピッグセンターは、ブタ専用CT・MRI・無菌ユニットを完備し、本研究の実施母体となる。また、本ピッグセンターを通して、他施設との連携・研究交流を積極的に推進したい。

平成 25 年度は、予定どおりブタ無菌ユニットの試運転・調整と、ブタ用イメージングデバイスの開発を実施した。平成 26 年度は、免疫のないブタの飼育・維持と、ブタを用いて生体光分子イメージング法の開発をめざす。平成 27 年度は、ブタ生体内血液細胞の可視化をめざす。

## B. 研究方法

### (1) ブタ無菌ユニットの開発(花園)

平成 24 年度厚労省「iPS 細胞等を利用した創薬研究支援事業」による補助で、本学ピッグセンターに無菌ユニットを導入した。試験運転を行ない、HEPA フィルターの流路・流量・流速を調整しながら高度クリーンルームの実現を図った。これによって、今後の免疫不全ブタを用いる実験に備える。

### (2) 遺伝子改変ブタの産生・維持と改良(長嶋)

長嶋らは、IL2 受容体共通  $\gamma$  鎖遺伝子のノックアウトによって、免疫不全(SCID)ブタ

の作製に成功した(Watanabe et al, *PLOS ONE* 2013)。本研究では、この SCID ブタの解析・産生・維持を図る。さらに、ヒトの血液をもつブタのベース・ブタとして利用できるように、他の遺伝子変異を併せ持つ二重・三重の遺伝子改変 SCID ブタを作製し、本研究に利用する。

### (3) ブタ用イメージングデバイスの開発・設置(西村)

ブタに特化した一光子、さらに、二光子近赤外イメージングデバイスを開発する。その際には、マウス用の高機能に特化したデバイスの作製とは別に、倒立・正立のいずれかに依存しない光学系の開発、顕微鏡周辺デバイス(高精度の大型動物観察用ステージなど)の開発を行い、関連特許の取得および製品開発を行う。デバイスは本学ピッグセンターに設置する。特に大型動物ゆえに通常の顕微鏡が用いられないため、特別に開発したユニット型の倒立顕微鏡を用いる。

### (4) 倫理面への配慮

#### (a) 臨床研究

将来、ヒト iPS 由来細胞を臨床研究に用いる場合は、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」「生物由来原料基準」「ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質および安全性の確保に関する指針」に則る必要があるため、本研究でヒト iPS 細胞を作製する場合も、将来の臨床応用を考慮して、これらの指針との整合性を確保しつつ研究を進める。iPS 細胞の作製については、以下のとおり機関内承認が得られている。

花園豊申請「iPS 細胞の作製」  
平成 23 年 11 月 24 日承認  
承認番号 第臨 11-8 号

#### (b) ヒト材料の利用

本研究で作製した iPS 細胞のゲノムを解析する場合、インフォームドコンセント取得と個人情報保護には十二分の注意を払う。「臨床研究に関する倫理指針」「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、それぞれについて機関内委員会で承認を得る必要がある。ただし、本年度はヒトゲノムの解析を行わなかった。

#### (c) 組換え DNA 実験

iPS 細胞作製や各種分化誘導実験は、組換え DNA 実験を含む。組換え DNA 実験は、カルタヘナ法に基づき機関内承認を得る。本事業は P1A で実施可能である。なお、本学ピッグセンターは P2A 仕様である。

研究代表者の花園が実施した組換え DNA 実験については、以下のとおり機関内承認が得られている。

・花園豊申請「幹細胞を利用する再生医療技術の開発」

平成 24 年 3 月 2 日承認

許可番号 11-119

改定版 平成 25 年 8 月 27 日承認

許可番号 13-100

・阿部朋行申請「大型動物を利用する幹細胞操作技術の開発」

平成 25 年 12 月 20 日承認

許可番号 13-133

研究分担者の組換え DNA 実験の承認状

況については各分担研究報告書を参照のこと。

#### (d) 動物実験倫理

本研究では動物実験が含まれる。本研究では、ヒト細胞の動物への投与にあたっては、動物初期胚への投与は行わず、それより発生の進んだ胎仔、または成体への投与を行なう。

動物愛護には最大限の配慮を払う。動物実験プロトコールは機関内承認を得る。本学ピッグセンターは、世界で最も厳しい「Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International(国際実験動物管理公認協会、AAALAC)」の認証を得ている。

研究代表者の花園が実施した動物実験については、以下のとおり機関内承認が得られている。

・ブタ実験

花園豊申請「ブタを利用する幹細胞研究」

平成 25 年 3 月 27 日承認

承認番号 第 13150 号

・マウス実験

花園豊申請「幹細胞の増殖・分化の解析」

平成 25 年 3 月 27 日承認

承認番号 第 13149 号

研究分担者の動物実験の承認状況については各分担研究報告書を参照のこと。

#### (e) 本学の審査体制

自治医科大学で行われる研究の倫理に関する審査は、(a)ヒトゲノム遺伝子解析研究については遺伝子解析研究倫理審査委員会、

(b)疫学研究については疫学研究倫理審査委員会、(c)臨床研究については臨床研究倫理審査委員会、(d)ヒト ES 細胞使用研究についてはヒト ES 細胞研究倫理審査委員会、(e)遺伝子組換え実験については遺伝子組換え実験安全委員会が審査する。いずれの委員会も、国の指針等に適合した委員会である。(f)動物実験計画書は、本学の実験動物規程に基づいて学外委員も入れた動物実験委員会が審査する。

### C. 研究結果

#### (1) ピッグセンターの整備 (花園担当)

ブタの無菌的管理を可能にする目的で、本学ピッグセンターに無菌ユニット(日本エアーテック(株))を導入した。試験運転・調整を行ない、ISO クラス 6 (クラス 1000)のクリーンルームを達成した。これは、病院無菌治療室の要件(クラス 10000 以下)を十分満たす無菌度である。

ここで免疫抑制剤を投与した免疫不全ブタの試験飼育を実行した。具体的には、臓器移植用の免疫抑制剤投与プロトコールを実験用ミニブタに適用した。すなわち、タクロリムス(グラセプター1mg/kg/day)、ミコフェノール酸モフェチル(MMF 750mg/day、体重換算 62mg/kg/day)、プレドニゾロン(20mg/body/day)を経口投与した。本無菌ユニットを用いて約2ヶ月の飼育を行うことが出来たものの、感染症を避けることはできなかった。今後、さらに長期の無菌的飼育には、ブタ自身の無菌化も必要と考えられた。



図 1 自治医科大学ピッグセンターに設置されたブタ用無菌ユニット

#### (2) 実験用ブタの作製 (長嶋担当)

本年度は、免疫不全(SCID)ブタの作製を行ったところである。SCID とは、細胞性免疫も液性免疫も欠損するいわゆる重症複合型免疫不全症 (Severe Combined Immuno-Deficiency) のことである。これは、ヒトでもマウスでも X 染色体上にある IL2 受容体  $\gamma$  鎖遺伝子の欠損によって生じる。そこで、ブタで同遺伝子を欠損させ SCID ブタを作ることをねらった。

具体的には、Zn フィンガーヌクレアーゼ法によって、ブタ体細胞の IL2 受容体  $\gamma$  鎖遺伝子をノックアウトした。この細胞核を未受精卵に移植した(体細胞核移植)。核移植した細胞をブタ仮親子宮内に移植した。

満期でブタ胎仔を取り出し解析したところ、IL2 受容体  $\gamma$  鎖遺伝子発現なく、胸腺がなく、T/NK 細胞なく、免疫不全ブタと結論された。この表現型は、ヒトの重症複合型免疫不全症の症状に類似する。マウスでは同遺伝子の欠損により B 細胞も消失するが、得られ



たブタには B 細胞が検出されることから、重症免疫不全症モデルとして、よりヒトに近い特徴を有する。

その他にも、赤色蛍光タンパクの一種であるクサビラ・オレンジ遺伝子を組み込んだミニブタ交雑種を作製した。従来のクサビラ・オレンジ トランスジェニックブタが、肉豚をベースに作出されたものであったのに対し、ミニブタ交雑種は約半分の体重であり、研究利用により適したサイズとなっている。また、デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルブタの作製をめざして、ジストロフィン遺伝子ノックアウト細胞からクローン胚の作出が可能なことを確認した。

### (3) ブタ用イメージングデバイスの開発 (西村・花園担当)

ブタの体内組織・細胞の可視化を目的として、平成 25 年度は、ブタ等大型動物故に必要な正立顕微鏡および支持周辺機器を考案し、ブタに適用可能なイメージングデバイスを設置した。通常の顕微鏡ではなく、ユニット型の顕微鏡を筐体に組み付ける型で、独自に開発したもので、同様のものや大型動物での実施例はいまだ報告されていない。

### (4) 生体光分子イメージング法の開発 (西村担当)

大型動物への予備検討として、平成 25 年度にはマウスを用いた生体光分子イメージング法を行った。具体的には、骨髄・末梢血管・代謝臓器におけるイメージングを行い、生活習慣病・血液疾患をはじめとする病態

の基礎的・応用的知見を得た。たとえば、動脈硬化を基盤とした心筋梗塞・脳卒中のモデルとなる、レーザー傷害による血栓形成モデルを確立し、血栓形成過程の詳細を明らかにした。さらに、ヒト iPS 細胞由来人工血小板を TAMRA 染色で染め、NOG マウス内部で血栓形成を観察した。その結果、人工血小板が生体内で有効に働くことを確認した。

## D. 考察

### (1) ブタ利用研究の推進

体重 50 kg のミニブタは、臓器の大きさや生理学的特徴がヒトに似ている。長期間飼育しても家畜ブタのように大きくならない(家畜ブタは 200 kg になる)。新薬開発で副作用や効果の判定にも使われている。世界的にブタの利用が着実に増えている。ヨーロッパではブタ利用がサルやイヌを上回り実験動物の主役に躍り出ている。近年は、毛のないすべすべ肌のブタ(メキシカンヘアレス)や、超小型のマイクロミニブタ(富士マイクラ)など、本学ピッグセンターにおける特殊なブタの飼育も拡大し、先端医学研究に導入されている。ブタの体内にヒトの細胞を移植して、ヒトの臓器を育てる研究も進みつつある。

しかし、我が国では、欧米に比べて、ブタ利用が伸び悩む。ブタを食用の家畜ブタと区別し、その価格(ミニブタの価格は家畜ブタの 10 倍)にあった成果を上げる仕組みが必要である。平成 26 年、福島に実験用ミニブタを用いた GLP 対応の医療機器開発センターが設立されることは、この観点から前

進である。一方、我々の行なうようなブタ利用研究開発(R/D)がなければ、我が国発の医療機器・医療技術の芽が育たない。東京と福島の間地点に位置する本学に、ブタ利用の最新・最高の R/D 拠点ピッグセンターを整備し、よりよい医療を実現したい。同時に、医療機器やブタ関連の産業を活性化したい。

## (2) 生体光分子イメージングの実現

本研究で開発する生体光分子イメージングは、ブタのみならずヒト臨床に応用出来る可能性が高い。本研究計画では今までの実績を生かして、光イメージングをマウスからブタに応用し、新たなイメージング手法とする。他のイメージングモダリティよりも低侵襲に多くの情報を得ることにより、よりリアルな生体現象を可視化し、病態が完全に形成されるまでの初期の炎症性変化などを鋭敏にとらえることが期待される。

生体親和性の高い光イメージングにより、血液細胞、たとえば血小板の可視化が可能になれば、心血管イベント発症の予測・リスク層別化・治療効果の予測と決定によるテーラーメイド医療に役立つと考えられる。イメージングの対象となる細胞や組織は、血管内の血小板にとどまらず、骨髄中の造血幹細胞や、炎症部位のリンパ球・好中球など多岐にわたり、病態解明をめざした基礎研究のみならず、臨床応用への橋渡し・トランスレーションが可能になる。

いままで同様の試みはされているが、実際に大型動物で単一細胞レベルでの可視化がされた例はなく、もしブタで血小板血栓が

確認されればそのインパクトはきわめて大きいと考えられる。なぜなら血栓性疾患では、生体側の要素が強く、マウスとヒトでは大きく乖離し、大型動物での検討が不可欠だからである。また、再生医療を視野にいれても、ヒトに生理機能が近いブタにおいて、iPS 誘導細胞の評価は重要になると考えられる。

## (3) トランスレーショナル・リサーチとレギュラトリー・サイエンスの推進

前述のとおり、ブタ等大型動物を用いた検証によって、ヒトに外挿しやすい有効性・安全性情報を社会に発信できる。なお、ブタは、そのサイズや生理的特徴がヒトと類似していることから、薬効評価だけではなく、ステントや内視鏡などデバイスの有効性・安全性評価にも有用である。たとえば、最近、核磁気共鳴(MR)対応性を謳う医療用デバイスが売り出されているが、本当に大丈夫かどうかは、本ピッグセンター内 MRI を用いてブタで検証可能である。すなわち、レギュラトリー・サイエンスの推進に貢献できる。

## E. 結論

本研究では、生体光分子イメージング法をブタに適用する。それによって、ブタ生体内のヒト血液細胞を可視化する。たとえば、血管内を流れる赤血球や好中球の可視化や、血小板が血栓を形成する瞬間の可視化などである。これらのイメージングは、創薬研究のみならず、種々病態メカニズムの解明や、新たな低侵襲臨床診断手法の樹立に役立つ。本研究は、当初の計画通り進捗している。

平成 25 年度(初年度)は、計画通り、ブタ無菌ユニットの設置・運営、およびブタ用イメージングデバイスの開発を行なった。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Nakamura, S., Takayama, N., Hirata, S., Seo, H., Endo, H., Ochi, K., Fujita, K.-I., Koike, T., Harimoto, K.-I., Dohda, T., Watanabe, A., Okita, K., Takahashi, N., Sawaguchi, A., Yamanaka, S., Nakauchi, H., **Nishimura, S.**, Eto, K.: Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2014 Apr. 3; 14(4): 535–548. (doi: 10.1016/j.stem.2014.01.011.) Epub 2014 Feb. 13.
2. Kunishima, S., **Nishimura, S.**, Suzuki, H., Imaizumi, M., Saito, H.: TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *European Journal of Haematology* 2014 Apr.; 92(4): 276–282. (doi: 10.1111/ejh.12252.) Epub 2014 Jan. 11.
3. Sakata, A., Ohmori, T., **Nishimura, S.**, Suzuki, H., Madoiwa, S., Mimuro, J., Kario, K., Sakata, Y.: Paxillin is an intrinsic negative regulator of platelet activation in mice. *Thrombosis Journal* 2014 Jan. 2; 12(1): 1. (doi: 10.1186/1477-9560-12-1.)
4. **西村智**: 生体分子イメージングによる血栓形成・血管機能の可視化. *日本血栓止血学会誌* 2013; 24(6): 588–592.
5. **Nishimura, S.**, Manabe, I., Takaki, S., Nagaskai, M., Ostu, M., Yamahsita, H., Sugita, J., Yoshimura, K., Eto, K., Komuro, I., Kadowaki, T., Nagai, R.: Adipose natural regulatory B cells negatively control adipose tissue inflammation. *Cell Metabolism* 2013 Nov. 5; 18: 759–766.
6. 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* 2013 Oct. 9; 8(10): e76478. (doi:10.1371/journal.pone.0076478)
7. **西村智:** 生体分子イメージングによる血栓の可視化. *日本血栓止血学会誌* 2013; 24(4): 396–401.
8. Arai, Y., Ohgane, J., Fujishiro, S.-H., 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* 2013 Nov.; 51(11): 763–776. (doi:10.1002/dvg.22423) Epub 2013 Aug. 30.
9. 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. *Human Molecular Genetics* 2013 Nov.1; 22(21): 4368–4382. (doi: 10.1093/hmg/ddt287.) Epub 2013 Jun. 19.
10. **西村智:** 生体二光子イメージングによる生活習慣病の分子機構を慢性炎症の寄与. *日本レーザー医学会誌* 2013; 34(2): 77–81.
11. Nakano, K., Watanabe, M., Matsunari, H., Matsuda, T., Honda, K., Maehara, M., Kanai, T., Hayashida, G., Kobayashi, M., Kuramoto, M., Arai, Y., Umeyama, K., Fujishiro, S.-H., Mizukami, Y., Nagaya, M., **Hanazono, Y., Nagashima, H.:** Generating porcine chimeras using inner cell mass cells and parthenogenetic preimplantation embryos. *PLOS ONE* 2013 Apr. 23; 8(4): e61900. (doi:10.1371/journal.pone.0061900)
12. **花園豊:** 大型動物を用いた幹細胞研究. *臨床血液* 2013; 54(4): 329–335.

## 学会発表

(研究分担者の学会発表については、総括研究報告書には記入せずに、分担研究報告書に記入した。)

1. **花園豊**: 幹細胞治療研究における医学と獣医学の連携. 平成 25 年度獣医学術学会年次大会, 幕張, 2014 年 2 月 21-23 日. (講演要旨集 p.194-195)
2. 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. 第 36 回日本分子生物学会, 神戸, December 3-6, 2013.
3. 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, **花園豊**, **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. 第 36 回日本分子生物学会, 神戸, December 3-6, 2013.
4. **Hanazono, Y.**: Porcine iPS. 12th Congress of International Xenotransplantation Association, Osaka, November 10-13, 2013. (abstracts p.111)
5. **花園豊**: マウスからヒトへ: ブタを利用する橋渡し研究. 第 1 回日本先進医工学ブタ研究会, 大阪, 2013 年 11 月 12 日. (抄録集 p. 3)
6. **Hanazono, Y.**: Human-to-animal reversed xenogeneic transplantation for producing human blood in animals. Joint Meeting of the 2nd Symposium of the East Asia Xenotransplantation Association (EAXA) /the 16th Annual Meeting of the Japanese Society for Xenotransplantation, Osaka, November 10, 2013.
7. **花園豊**: 再生医学研究: 臨床応用をめざして. 第 77 回日本皮膚科学会東部支部学術大会, 大宮, 2013 年 9 月 21-22 日. (抄録集 p. 53)
8. 下澤律浩, 藤城修平, 水上喜久, 阿部朋行, **花園豊**: カニクイザル初期胚を用いた ES 細胞の特性に関する検討. 第 54 回日本卵子学会, 東京, 2013 年 5 月 25-26 日. (Journal of Mammalian Ova Research, Vol.30 (2), S94, 2013)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 特許

発明者：西村智

発明の名称：生体イメージングによる血小板

機能評価システム

出願日：平成 22 年 6 月 1 日

出願番号：特願 2010-125869

厚生労働科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(再生医療関係研究分野))  
分担研究報告書

実験用遺伝子改変ミニブタの開発に関する研究

研究分担者 長嶋比呂志  
明治大学農学部・教授

研究要旨

本年度は、研究分担者の長嶋が作製に成功した免疫不全(SCID)ブタの解析を行った。ブタの共通 $\gamma$ 鎖遺伝子ノックアウトにより、T細胞およびNK細胞の欠損というヒトのX連鎖重症複合免疫不全症に非常に類似した表現型が現れることを確認した。また、赤色蛍光タンパク質であるクサビラ・オレンジ遺伝子を導入したミニブタ交雑種の作出に成功した。さらに、ジストロフィン遺伝子ノックアウト細胞の核移植において、クローン胚盤胞が得られることを確認した。

A. 研究目的

本分担課題では、ヒト化ブタ作製の基盤となる免疫不全ブタの解析と、疾病の診断・治療技術の開発や薬効評価に役立つ病態モデルブタの作出を目的とした。

B. 研究方法

(1) 免疫不全ブタの解析

共通 $\gamma$ 鎖遺伝子ノックアウトを施した体細胞クローンブタの終末期胎仔を解析に用いた。帝王切開により妊娠 113 日の胎仔を回

収した。臍帯を結紮した後直ちに開腹し、下大静脈から採血した。血液中のリンパ球(T細胞、B細胞、NK細胞)の有無はフローサイトメーターにより解析した。胸腺については肉眼解剖学的に観察を行った。脾臓組織については、組織化学的解析によりリンパ球の分布域を確認した。また、脾臓組織における共通 $\gamma$ 鎖タンパク質の発現をウエスタンブロット解析により確認した。

(2) 遺伝子改変ミニブタの作出

クサビラ・オレンジ遺伝子組換えブタの凍結精巣上体精子を、発情同期化および排卵

誘起したミニブタの卵管内に注入した。分娩予定日に破水を確認後、帝王切開により胎仔を取り出し、その後人工哺育した。新生仔の蛍光発現、遺伝子解析を行い、離乳期までの成長を確認した。

ドイツ Ludwigh-Maximilians 大学 E. Wolf 教授から分与を受けたジストロフィン遺伝子ノックアウト細胞をサブクローニングし、体細胞核移植を行った。

### (3) 倫理面への配慮

動物実験および組換え DNA 実験は、以下のとおり機関内承認を受け実施した。

#### 動物実験

・長嶋比呂志申請「遺伝子ノックアウトによる免疫不全ブタの作出」

平成 22 年 5 月 21 日承認

承認番号 IACUC10-0004

・長嶋比呂志申請「緑色ならびに赤色蛍光遺伝子導入トランスジェニックブタの繁殖並びに生殖細胞の保存」

平成 23 年 4 月 6 日承認

承認番号 IACUC11-0016

・長嶋比呂志申請「ブタ体外生産胚の移植実験」

平成 24 年 5 月 10 日承認

承認番号 IACUC12-0008

#### 組換え DNA 実験

・長嶋比呂志申請「緑色ならびに赤色蛍光蛋白遺伝子導入トランスジェニックブタの繁殖並びに生殖細胞の保存」

平成 23 年 4 月 1 日承認

農安 11 第 5 号

・長嶋比呂志申請「遺伝子ノックアウトによる免疫不全ブタの作出」

平成 22 年 4 月 1 日承認

農安 10 第 10 号

なお、ヒト細胞等のヒトに由来する材料は扱っていない。

## C. 研究結果

### (1) 免疫不全ブタの解析

共通  $\gamma$  鎖遺伝子ノックアウトブタの血液をフローサイトメトリーにより解析した結果、T 細胞および NK 細胞が欠損していることが明らかとなった。一方、B 細胞は存在した。胸腺は形成されておらず欠損していた(図 1)。脾臓組織では、白脾髄内中心動脈の動脈周囲リンパ鞘組織のリンパ細胞域において、リンパ球はほぼ観察されず、共通  $\gamma$  鎖タンパク質の発現が完全に欠損していた。

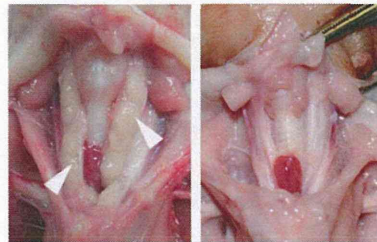


図 1 野生型ブタ(左)と共通  $\gamma$  鎖遺伝子ノックアウトブタ(右)の上縦隔(矢頭:胸腺)

### (2) 遺伝子改変ミニブタの作出

2 頭のミニブタに対し卵管内精子注入を行った結果、1 頭が妊娠した。帝王切開で 2 頭の新生仔を得た(雌)。それらは、全身性にクサビラ・オレンジの蛍光を発現することが



確認された(図 2)。尾の組織から採取した DNA の PCR 解析により、クサビラ・オレンジ遺伝子を有することが確認された。出生時体重は、0.73 kg (平均)であり、ミニブタと肉豚のほぼ中間であった。生後 4 ヶ月で、8 kg に成長した。4 ヶ月時体重は、肉豚の約 70%であった。

ジストロフィン遺伝子ノックアウト細胞は、サブクローニングにおいて一定の増殖性を示し、電気融合法による体細胞核移植で、胚盤胞が得られることが確認された。



図 2 クサビラ・オレンジ遺伝子を発現するミニブタ交雑種

#### D. 考察

本研究で解析した共通  $\gamma$  鎖遺伝子ノックアウトブタは、胸腺を欠損しており、また T 細胞および NK 細胞を消失した特徴を有することから、ヒトの X 連鎖重症複合免疫不全症

と非常に類似した表現型を示すものと考えられる。これら免疫不全症の表現型以外には異常な所見も観察されなかったことから、今後は適切な飼育環境下において共通  $\gamma$  鎖遺伝子ノックアウトブタの飼育・維持が可能であると予想される。

本年度、クサビラ・オレンジ遺伝子を導入したミニブタ交雑種の作出に成功した。この研究により、発情同期化・排卵誘起したミニブタへの、卵管内精子注入プロトコールが確立された。得られたミニブタ交雑種は雌であるので、性成熟後に再度ミニブタ精子による人工授精を行い、さらなる体格の小型化を図る予定である。得られる次世代産仔を用いて、クサビラ・オレンジを発現する血球や細胞を、同腹兄弟に移植し、追跡する実験系が可能になる。本研究のメインテーマである、ブタの光分子イメージングの開発に有用な、遺伝子改変ミニブタの確立に近づいている。

ジストロフィン遺伝子ノックアウトブタ等、他の遺伝子改変ブタについても、同様にミニブタ化することが可能であると考えられる。

#### E. 結論

ブタ利用研究の推進のためには、遺伝子改変ブタのミニブタ化が必要である。これは、技術的に十分可能であり、今後、多様な遺伝子改変形質をもつミニブタが作出される可能性がある。

## F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入した。)

## G. 研究発表

### 論文発表

1. 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* 2013 Oct. 9; 8(10): e76478. (doi:10.1371/journal.pone.0076478)
2. Arai, Y., Ohgane, J., Fujishiro, S.-H., 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* 2013 Nov.; 51(11): 763–776. (doi:10.1002/dvg.22423) Epub 2013 Aug. 30.
3. 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. *Human Molecular Genetics* 2013 Nov.1; 22(21): 4368–4382. (doi: 10.1093/hmg/ddt287.) Epub 2013 Jun. 19.
4. Nakano, K., Watanabe, M., Matsunari, H., Matsuda, T., Honda, K., Maehara, M., Kanai, T., Hayashida, G., Kobayashi, M., Kuramoto, M., Arai, Y., Umeyama, K., Fujishiro, S.-H., Mizukami, Y., Nagaya, M., **Hanazono, Y., Nagashima, H.**: Generating porcine chimeras using inner cell mass cells and parthenogenetic preimplantation embryos. *PLOS ONE* 2013 Apr. 23; 8(4): e61900. (doi:10.1371/journal.pone.0061900)

## 学会発表

1. 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. 第36回日本分子生物学会, 神戸, December 3–6, 2013.
2. 渡邊將人, 中野和明, 松成ひとみ, 松田泰輔, 金井貴博, 小林美里奈, 松村幸奈, 坂井理恵子, 倉本桃子, 林田豪太, 浅野吉則, 高柳就子, 新井良和, 梅山一大, 長屋昌樹, **花園豊, 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. 第36回日本分子生物学会, 神戸, December 3–6, 2013.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(再生医療関係研究分野))  
分担研究報告書

ブタ生体分子イメージングの開発と応用研究

研究分担者 西村 智  
自治医科大学 分子病態治療研究センター 分子病態研究部・教授

研究要旨

ヒト臨床での新規薬剤や再生医療において、安全性・有効性の担保は必要不可欠であるが、評価系がまだ定まっているとは言えない。マウスよりもはるかにヒトに生理学的特徴の近いブタを用いて、単一細胞レベルで分子イメージングを行うことで、創薬・再生医療に使える、新たな評価系を目的とする。平成25年度、西村らはブタに応用する分子イメージングシステムを開発した。また、大型動物への予備検討として、平成25年度にはマウスを用いた生体光分子イメージング法を確立した。具体的には、骨髄・末梢血管・代謝臓器におけるイメージングを行い、生活習慣病・血液疾患をはじめとする病態の基礎的・応用的知見を得た。たとえば、動脈硬化を基盤とした心筋梗塞・脳卒中のモデルとなる、レーザー傷害による血栓形成モデルを確立し、血栓形成過程の詳細を明らかにした。さらに、ヒトiPS細胞由来人工血小板の生体内での機能解析を行った。

A. 研究目的

現在、マウスからヒトにいたるまで全遺伝子が同定されたにもかかわらず、生体機能の多くは依然として不明であり、遺伝子・細胞治療、再生医療の実用化にも多くの障壁がある。その原因として、多くの研究者が、試験管内で生ずる事象と、生体の間には、大きな乖離があることを感じている。さらに、マウスとヒトでは多くの遺伝子機能や細胞ネット

ワークが異なることが近年明らかになっており、ノックアウトマウスの解析を主としてマウスを用いた従来型の研究には限界が指摘されている。今後、ヒトレベルでの生体システムのさらなる理解のみならず、遺伝子・細胞レベルを標的とした臨床治療技術の開発、あるいは低侵襲テイラーメイド治療の開発のためにも、大型動物を用いて生体内での事象について再評価する必要があると考えた。