

201406035A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 花 園 豊

平成 27 年(2015 年)4 月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 花 園 豊

平成 27 年(2015 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 ----- 2

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 ----- 25

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 28

厚生労働科学研究費補助金
(再生医療実用化研究事業)
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、再生医療研究に役立つブタモデルやその飼育法を開発し、さらにブタの光分子イメージング技術を確立する。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。以ってブタモデルで次世代再生医療技術の POC (proof of concept)を取得する。

当該年度の成果:(1) ピッグセンターの整備・運用(花園): E 型肝炎ウイルスは幼豚にしばしばみられ、動物由来感染症の原因となる。自治医科大学先端医療技術開発センター(以下、ピッグセンター)内のブタに関して、E 型肝炎ウイルス(HEV)のフリー化を行った。

(2) 実験用ブタの作製(長嶋):実験用ブタの普及を図る上でミニブタ化は必須である。赤色蛍光タンパク質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に関して、平成 26 年度は、より小型化の進んだ第 2 世代ミニブタの作出に成功した。

(3) ブタ用イメージングデバイスの開発・設置(西村):ブタ用の一光子型生体光分子顕微鏡が平成 25 年度に稼働し、二光子型は平成 26 年度に試験稼働を開始している。平成 26 年度には、実際にブタ生体内の血管を流れる赤血球、白血球、血小板を単一細胞レベルで可視化し、血栓形成過程を観察することに成功した(世界初、平成 27 年度計画の前倒し実施)。

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

JST(平成 27 年度から AMED)が実施している CREST 事業で花園・長嶋らは、X 染色体性重症複合型免疫不全症(X-linked severe combined immunodeficiency, X-SCID、以下 SCID と略す)のクローンブタを作製した。さらに、繁殖可能な SCID ブタの産出に成功し(SCID 種ブタ、未発表、特

A. 研究目的

願 2014-078986、PCT/JP2014/076768)、SCID ブタ量産の目処がたった。すなわち、平成 27 年度キャリアブタ(健常メス)、平成 28 年度 SCID ブタ産出予定である。これら繁殖で得られる SCID ブタは、これまでのクローニングで得られた SCID ブタに比べてはるかに安価で丈夫になると期待される。

しかし、本 SCID ブタは肉豚ベースで作製されており、今後、応用展開を図る上ではミニブタ化が望まれる。本 SCID ブタだけではなく、我が国で作出されている疾患モデルブタのほとんどが肉豚ベースという現状を鑑みると、ミニブタ化技術は、実験用ブタの普及を図る上で必須の技術である。

一方、JST(平成 27 年度から AMED)再生医療実現拠点ネットワークプログラムでは、京都大学の江藤浩之教授らが CPC (GMP 基準)でのヒト iPS 細胞由来の人工血小板製造を開始した。我が国での臨床試験ではウサギモデルまでの要求であるものの、アメリカ FDA では血小板の機能試験をブタで行うことを推奨しており、今後ブタモデルでの POC (proof of concept)取得が海外展開上、重要かつ必須になる。現在ヒト iPS 由来細胞の機能を大型動物(ブタ)で評価する系は存在しないが、ブタ等の大型動物でイメージングシステムを構築できれば、直接的に生体で細胞機能の評価でき、再生医療への応用に際して安全性・有用性の担保が可能になる。

以上を踏まえ、本研究では、①SCID ブタ等の実験用ブタを医学・医療に役立たせるために、その飼育法やミニブタ化へ向けた開発研究を行いつつ、②ブタの光分子イメ

ージング技術確立する。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。以って次世代の再生医療技術をブタモデルで POC 取得できるようにする。

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:ブタ in vivo 研究、長嶋:ブタ発生研究、西村:ブタイメージング研究)。

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、ブタ無菌的管理技術およびブタ用イメージングデバイスの開発を行ったところである。平成 26 年度(本年度)は、ブタの微生物学的品質コントロール(HEV フリー化)、実験用ブタのミニブタ化、およびブタを用いて生体光分子イメージング法の開発を行った。平成 27 年度は、①ブタ SPF 飼育法の開発、②肉豚ベースで作出された実験用ブタのミニブタ化に加え、③ブタ生体内で、ヒト iPS 細胞由来の人工血小板血液細胞の可視化をめざす(図 1)。

B. 研究方法

(1) 実験用ブタの管理技術の開発

ブタ利用研究を推進するためには専用の施設が望まれる。自治医科大学は、そのための施設(先端医療技術開発センター、以下、ピッグセンター)を運営している。平成 26 年度は、ピッグセンター内のブタに関して、

特定病原体フリー(SPF)化を実施した。とくに E 型肝炎ウイルス(HEV)の感染状況を踏まえ、ブタの HEV フリー化を重点的に行った。研究代表者の花園が担当した。(研究協力者:自治医科大学教授・実験医学センター長 國田智、同大学教授 岡本宏明)

(2) 実験用ブタの作出

分担研究者の長嶋らによって、ゲノム編集技術(Znフィンガーヌクレアーゼ法によって、共通 γ 鎖遺伝子をノックアウトした、X 染色

体性重症複合型免疫不全症(X-linked severe combined immunodeficiency, X-SCID、以下、SCID と略す)のブタが作出された。平成 26 年度には SCID ブタのミニブタ化のために必要な、生殖工学技術の開発を進めた。研究分担者の明治大学教授・長嶋が担当した。

(3) 生体光子分子イメージング法の開発

ブタなどの大型動物における生体イメージ取得に際しては、顕微鏡のみならず、ステージまわり・支持装置などの周辺機器を開発

図1

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

研究の流れ

平成25年度

ブタ無菌ユニットの整備・運用
ブタ用イメージングデバイスの開発



平成26年度

ブタ用セルプロセッシングセンター(CPC)の整備・運用
ブタの微生物学的品質のコントロール(とくにHEVフリー化)
ブタを用いた生体光子分子イメージング法の開発



平成27年度

実験用ブタの開発(無菌的飼育法、ミニブタ化、血小板減少モデル)
ブタ生体内血液細胞、とくにヒトiPS細胞由来血小板の可視化

期待される効果

- ◇ 医療に役立つブタの開発：ブタの無菌管理、SCIDブタなど肉豚ベースの実験用ブタのミニブタ化、血小板減少ブタモデルの実現。
- ◇ ブタの生体光子分子イメージングの実現：ブタで実現できればヒトに応用可能。とくに、血小板・血栓の可視化へ。
- ◇ トランスレーショナル・リサーチおよびレギュラトリー・サイエンスの推進：ブタで有効性・安全性評価を行い、マウスからヒトへの橋渡し。とくに、ヒトiPS細胞由来血小板の前臨床。

する必要がある。顕微鏡メーカーとの協働連携のもと、大型動物に特化した顕微鏡デバイスを開発し、運用していく。また、その光学系としては、平成 25 年度に一光子型から開発を行ったが、平成 26 年度は、一光子法に加え、二光子法の開発を進めた。研究分担者の自治医科大学教授・西村が担当した。

(4) 倫理面の配慮

本研究では動物実験が含まれる。動物愛護には最大限の配慮を払った。動物実験プロトコールは機関内承認を得た(自治医科大学 H26 年 3 月 26 日承認番号第 14172 号および H26 年 4 月 18 日承認番号 14227 号、明治大学 H26 年 6 月 6 日 IACUC14-0008 および H24 年 5 月 10 日 IACUC12-0008)。

C. 研究結果

(1) ピッグセンターの整備・運用

(a) HEV フリー化

ブタを安全に実験利用するために、本センター内ブタの E 型肝炎ウイルス(HEV)フリー化を実施した。具体的には、HEV-genotype3 の ORF2 タンパク質を抗原とした ELISA 法により、ブタ抗体検査系を実用化した。この検査系を用いて、学内で実験使用したブタ全個体を対象に手術時または犠牲死時に血清を採集し、HEV 抗体検査を実施した。表 1 にこれまでの HEV フリー化の実績を示す。実験用ブタの HEV フリー化はわが国初の試みである。

抗体陽性ブタが発見された場合は、血清中 HEV RNA の ORF2 領域をターゲットにした RT-PCR 法により検出する方法も開発した。

(表 1) 先端医療技術開発センター
実験使用ブタのHEV-free実績

	平成25年度		平成26年度(4月～12月)	
	実験使用 個体数	Anit-HEV Swine IgG (陽性個体数)	実験使用 個体数	Anit-HEV Swine IgG (陽性個体数)
メキシカンヘアレスミニブタ	43頭	0/43	24頭	0/24
三元雑種ミニブタ	29頭	0/29	20頭	0/20
マイクロミニブタ	38頭	0/38	59頭	0/59
ゲッチンゲンミニブタ	1頭	0/1	0頭	—
畜産ブタ	14頭	0/14	11頭	0/11
使用総数	125頭	0/125	114頭	0/114

(b) ブタ用セルプロセッシングセンター

ブタ用セルプロセッシングセンター(CPC)は、予定通り平成 25 年度に完成し、平成 26 年度から運用を開始した。本 CPC は、ブタ用手術室に近接しており、今まで別棟で実施していたブタへの移植細胞の調整やブタのサンプル処理を円滑・効率的に行えるようになった。

本ブタ用 CPC は、他大学の再生医療研究支援にも貢献している。具体的には、本学と慶應大学の間で共同研究契約を交わし(平成 26 年 4 月 1 日付)、JST 再生医療実現化ハイウェイ「iPS 細胞を用いた再生心筋細胞移植による重症心不全治療法の確立」(代表研究者：福田恵一教授)のグループがヒト iPS 細胞由来心筋細胞のブタへの移植実験を実施するために本 CPC を使用している。

(2) 実験用ブタの作出

(a) ミニブタ化

昨年度(平成 25 年度)、赤色蛍光タンパク質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。本年度(平成 26 年度)、より小型化の進んだ第

2 世代ミニブタの作出に成功した(分担研究者長嶋ら)。

ミニブタの人工生殖技術の開発を目的として、2 系統のミニブタに対して発情同期化および排卵誘起法をほぼ確定し、GIFT 法(配偶子卵管内移植法)が安定的に実施可能となった。赤色蛍光遺伝子(Kusabira-Orange, KuO)導入精子、糖尿病遺伝子(ヒト変異 HFN1 α)導入精子による受胎例を得た。

さらに、これらの凍結精子による体外受精条件を決定し、KuO ブタでは産仔を得て、本研究のイメージング実験に供給した。

(b) 血小板減少ブタ

血小板減少のブタモデル作製に関しては、予定より早く平成 26 年度に着手した。具体的には、ブタに血小板減少を来すためにアルキル化剤(ブスルファン)の投与実験を開始した。具体的には、ブスルファンの至適投与量を検討した(表 2)。

(3) ブタの光イメージング法の開発

昨年度(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

表 2 ブスルファン投与による血小板減少ブタモデル

ブスルファン 投与量	頭数	血小板最低値 (万/ μ l)	最低値までの 日数
4 mg/kg	1	7.6	12
6 mg/kg	3	1.1 ($\pm$ 0.8)	13 ($\pm$ 2)
8 mg/kg	1	0.1	10

デバイスを開発した。そこで本年度(平成 26 年度)は、実際に KuO ブタおよび GFP ブタを用いたイメージングを行い、一光子・二光子ともに回折限界・ビデオレートを達成した。従来の一光子共焦点・二光子顕微鏡を用いた生体観察はマウスに限定されていたが、顕微鏡および周辺機器、制御・解析ソフトウェアの開発によりブタでも良好な画像が得られた(分担研究者西村ら)。

特に二光子顕微鏡は、大型動物においては圧倒的なアドバンテージがあり、生体深部においても単一血小板・単一細胞を同定できた。これは当初、平成 27 年度達成を予定していたが、平成 26 年度に達成できた。

以上の結果、平成 27 年度にはヒト iPS 由来細胞についてブタ体内で分化・機能獲得過程を可視化できる目処が立ち、その医療応用実現を加速させると考える。

(4) ブタ体内の血液細胞の可視化 (平成 27 年度予定の前倒し)

今までヒト iPS 細胞由来の人工血小板の機能に関して NOG マウスを用いて解析していたが、当初予定を前倒して平成 26 年度にヒト血小板をブタに投与・観察し、血栓形成機能を評価した(分担研究者西村ら)。ブタはサイズがヒトに近いこと、血小板凝集に必要な von Willebrand 因子と CD42b の結合がマウス・ヒト間では低いことなどから、人工血小板の安全性は言うに及ばず、有効性評価にも(マウスではなく)ブタは有効と考えられた。

以上の通り、平成 26 年度当初の予定通り順調に進んだ。とくに、ブタのイメージングに関しては平成 27 年度実施予定一部を平成 26 年度に前倒し実施できた。

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。

一方、我が国で作られる遺伝子改変ブタや疾患モデルブタは、ほとんどが家畜ブタをベースにしている。これらのブタをミニブタ化できれば、ブタ利用研究のいっそうの推進が期待できる。

ブタの特定抗原のフリー化(SPF)化も必須である。とくに人畜共通感染症である E 型肝炎は、幼豚に感染例が散見される。肉豚として出荷される生後半年以降の時期には、このウイルスは陰性化するので、食肉衛生上は問題にならないが、幼豚をしばしば利用する実験用ブタでは大きな問題になりうる。E 型肝炎を含めて SPF が実現できたので、このプロトコルを他施設にも普及させれば、ブタ利用研究を安全に進めることができる。

(2) 大型動物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(ハード・ソフトウェアの開発環境を含む)を生かし、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モダリティを確立する。本手法は、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だけでなく、ヒトにおける診断デバイスとしての展開も期待される。

生体親和性の高い光イメージングにより、生体内部での血液細胞、たとえば血小板の機能的解析が可能になれば、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も役立つと考えられる。あるいは、細胞療法後の治療効果判定(細胞の生着・分化等の評価)にも大きく寄与する可能性がある。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、病態解明を目指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。

(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

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。我が国では、京都大学江藤浩之教授らが GMP 基準でヒト iPS 細胞由来人工血小板の製造を開始している。我が国での臨床試験ではウサギモデルまでの要求であるものの、アメリカ FDA では血小板の機能試験をブタで行うことを推奨しており、今後ブタモデルでの POC 取得が海外展開上、重要かつ必須になる。ブタ等の大型動物でイメージングシステムを構築できれば、直接的に生体で細胞機能を評価でき、再生医療への応用に際して安全性・有用性の担保が可能になる。

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。

E. 結論

本研究は、当初の計画通り進捗している。

(1) E 型肝炎ウイルスは幼豚にしばしばみられ、動物由来感染症の原因となる。自治医科大学ピッグセンター内のブタに関して、E 型肝炎ウイルス(HEV)フリー化を行った。

(2) 実験用ブタの普及を図る上でミニブタ化は必須である。赤色蛍光タンパク質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に関して、より小型化の進んだ第 2 世代の作出に成功した。

(3) 一光子型および二光子型の生体光分子顕微鏡によって、実際にブタ生体内の血管を流れる赤血球、白血球、血小板を単一細胞レベルで可視化し、血栓形成過程を観察することに成功した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Abe, T., Hanazono, Y., and Nagao, Y.: A long-term follow-up study on the engraftment of human hematopoietic stem cells in sheep. *Exp Anim* 2014; 63(4):475-481.
2. Mizukami, Y., Abe, T., Shibata, H., Makimura, Y., Fujishiro, S.H., Yanase, K., Hishikawa, S., Kobayashi, E., and Hanazono, Y.: MHC-matched induced pluripotent stem cells can attenuate cellular and humoral immune responses but are still susceptible to innate immunity. *PLoS One* 2014 Jun 13; 9(6):e98319.
3. Matsunari, H., Kobayashi, T., Watanabe, M., Umeyama, K., Nakano, K., Kanai, T., Matsuda, T., Nagaya, M., Hara, M., Nakauchi, H., and Nagashima, H.: Transgenic pigs with pancreas specific expression of green fluorescent protein. *J. Reprod. Dev.* 2014; 60(3):230-237.
4. Hoang, D.-T., Matsunari, H., Nagaya, M., Nagashima, H., Millis, J.M., Witkowski, P., Periwai, V., Hara, M., and Jo, J.: A conserved rule for pancreatic islet rganization. *PLoS One* 2014; 9(10):e110384.
5. Hara, S., Umeyama, K., Yokoo, T., Nagashima, H., and 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* 2014; 9(3):e92219.
6. Sekijima, M., Waki, S., Sahara, H., Tasaki, M., Wilkinson, R.A., Villani, V., Shimatsu, Y., Nakano, K., Matsunari, H., Nagashima, H., Fishman, J.A., Shimizu, A., and Yamada, K.: Results of life-supporting galactosyltransferase knockout kidneys in cynomolgus monkeys using two different sources of galactosyltransferase knockout Swine. *Transplantation* 2014; 98:419-426.
7. Miyagawa, S., Maeda, A., Kawamura, T., Ueno, T., Usui, N., Kondo, S., Matsumoto, S., Okitsu, T., Goto, M., and Nagashima, H.: A comparison of the main structures of N-glycans of porcine islets with those from humans. *Glycobiology* 2014; 24:25-38.
8. Nakamura, S., Takayama, N., Hirata, S., Seo, H., Endo, H., Ochi, K., Fujita, K., Koike, T., Harimoto, K., Dohda, T., Watanabe, A., Okita, K., Takahasi, N., Sawaguchi, A., Yamanaka, S., Nakauchi, H., Nishimura, S., and Eto, K.: Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable

- generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2014; 14(4):535–548.
9. **Nishimura, S.**, Nagasaki, M., Okudaira, S., Aoki, J., Ohmori, T., Ohkawa, R., Nakamura, K., Igarashi, K., Yamashita, H., Eto, K., Uno, K., Hayashi, N., Kadowaki, T., Komuro, I., Yatomi, Y., and Nagai, R.: ENPP2 contributes to adipose Tissue expansion and insulin resistance in diet-induced obesity. *Diabetes* 2014; 63(12):4154–4164.
 10. Tanaka, M., Ikeda, K., Suganami, T., Komiya, C., Ochi, K., Shirakawa, I., Hamaguchi, M., **Nishimura, S.**, Manabe, I., Matsuda, T., Kimura, K., Inoue, H., Inagaki, Y., Aoe, S., Yamasaki, S., and Ogawa, Y.: Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nat. Communications* 2014; 5:4982.
 11. Kunishima, S., **Nishimura, S.**, Suzuki, H., Imaizumi, M., and Saito, H.: TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur. J. Haematol.* 2014 Apr.; 92(4): 276-282.
 12. Sakata, A., Ohmori, T., **Nishimura, S.**, Suzuki, H., Madoiwa, S., Mimuro, J., Kario, K., and Sakata, Y.: Paxillin is an intrinsic negative regulator of platelet activation in mice. *Thromb. J.* 2014 12(1):1.
- 学会発表**
(分担研究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. 阿部朋行, 長尾慶和, 原明日香, スブド・ビャンバー, 柳瀬公秀, ボラジギン・サラントラガ, 緒方和子, 山口美緒, 福森理加, **花園豊**: ヒツジ子宮内移植系におけるヒト造血細胞の生着促進・増幅技術の開発. 第 17 回日本異種移植研究会, 栃木, 2014 年 3 月 14 日.
 2. **花園豊**: ブタを利用する iPS 細胞研究: マウスからヒトへの橋渡し. 第 3 回実験動物科学シンポジウム, 山形, 2014 年 12 月 12 日.
 3. **花園豊**: ブタ体内でヒト血液・臓器を育てる研究について. 第 2 回日本先進医工ブタ研究会, 静岡, 2014 年 10 月 24-25 日. (抄録集 p. 22)
 4. 水上喜久, 阿部朋行, 柴田宏昭, 牧村幸敏, 藤城修平, 柳瀬公秀, 菱川修司, 小林英司, **花園豊**: クラウン系ミニブタにおける MHC を合致させた iPS 細胞移植後の免疫反応の解析. 第 2 回日本先進医工学ブタ研究会, 静岡, 2014 年 10 月 24-25 日. (抄録集 p. 26)
 5. Mizukami, Y., Abe, T., Shibata, H., Makimura, Y., Fujishiro, S., Yanase, K., Hishikawa, S., Kobayashi, E., **Hanazono, Y.**: Immune responses against induced pluripotent stem cells in porcine MHC-matched allogeneic setting. 5th Swine in

Biomedical Research Conference
2014, Raleigh, NC, USA, July 6-8,
2014. (Conference Proceedings p.
65)

6. 阿部朋行, 長尾慶和, 柳瀬公秀, 原明日香, ボラジギン・サラントラガ, 緒方和子, 山口美緒, 花園豊:ヒツジ子宮内移植系におけるヒト造血細胞の生着・増幅技術の開発. 第 61 回日本実験動物学会総会, 札幌, 2014 年 5 月 15-17 日. (抄録集 p. 153)
7. 花園豊:動物を用いたヒト血液細胞の作出. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会, 奈良, 2014 年 5 月 16 日. (抄録集 p. 238)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許

1. 発明者:花園豊, 渡邊將人, 長嶋比呂志

発明の名称:遺伝子ノックアウトブタ

出願日:平成 26 年 4 月 7 日

出願番号:特願 2014-078986、

PCT/JP2014/076768

2. 発明者:遠藤仁司、長尾恭光、花園豊、富永薫、大森司

発明の名称:異種間での多能性幹細胞再樹立法

出願日:平成 26 年 10 月 2 日

出願番号:特願 2014-203679

3. 特願 2014-027655「免疫抑制剤の評価方法、及び免疫抑制剤評価キット」

特許権者:学校法人明治大学

発明者:長屋昌樹, 長嶋比呂志

4. 西村智「血小板解析方法及び血小板解析システム」特願 2010-125869 (H22 年 6 月 1 日申請、平成 26 年 9 月 12 日許諾)

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業
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

我が国で作られる遺伝子改変ブタや疾患モデルブタは、ほとんどが家畜ブタをベースにしている。これらのブタをミニブタ化できれば、ブタ利用研究のいっそうの推進が期待できる。平成 26 年度、赤色蛍光タンパク質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に関して、より小型化の進んだ第 2 世代ミニブタの作出に成功した。こららは、ミニブタとほぼ同等の体格まで小型化された。さらに、糖尿病モデルブタのミニブタ化(第 1 世代)にも成功した。遺伝子改変ブタのミニブタ化は、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できるであろう。

A. 研究目的

我々は、IL2 受容体共通 γ 鎖遺伝子をノックアウトした、X 染色体性重症複合型免疫不全症 (X-linked severe combined immunodeficiency, X-SCID, 以下, SCID と略す)のブタを開発した。しかし、これは肉豚ベースで作られている。SCID ブタだけではなく、他の疾患モデルブタのほとんどが肉豚ベースで作出されている現状を鑑みると、ミニブタ化技術は、実験用ブタの普及を図る上で必須の技術である。そこで、既存の遺伝子改変ブタの凍結精子を用いてミニブタを受胎させる人工生殖技術の開発を行い、

また、ミニブタ化した個体の人工哺育・育成等のシステムを確立することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 実験用ブタのミニブタ化

ゲノム編集技術(Znフィンガーヌクレアーゼ法)によって、IL2 受容体共通 γ 鎖遺伝子をノックアウトした SCID ブタを作出し得ることが確認されている。しかし、前述のとおり、SCID ブタは肉豚ベースで作出されている。平成 26 年度には SCID ブタのミニブタ化に先立ち、赤色蛍光タンパク発現ブタと糖尿

病モデルブタのミニブタ化を進めた。具体的には、平成 25 年度に作製した F1 ミニブタ(第1世代)を再度ミニブタと交配し F2(第2世代)を作出した。さらに、SCID ブタと糖尿病モデル(変異 HNF1 α 遺伝子導入)ブタの凍結精子を用いて、GIFT 法(Gamete Intra-Fallopian tube Transfer)による F1 ミニブタの作出を行った。

(2) 倫理面の配慮

本研究では動物実験が含まれる。動物愛護には最大限の配慮を払った。動物実験プロトコルは機関内承認を得た(明治大学 H26 年 6 月 6 日 IACUC14-0008, および H24 年 5 月 10 日 IACUC12-0008)。

C. 研究結果

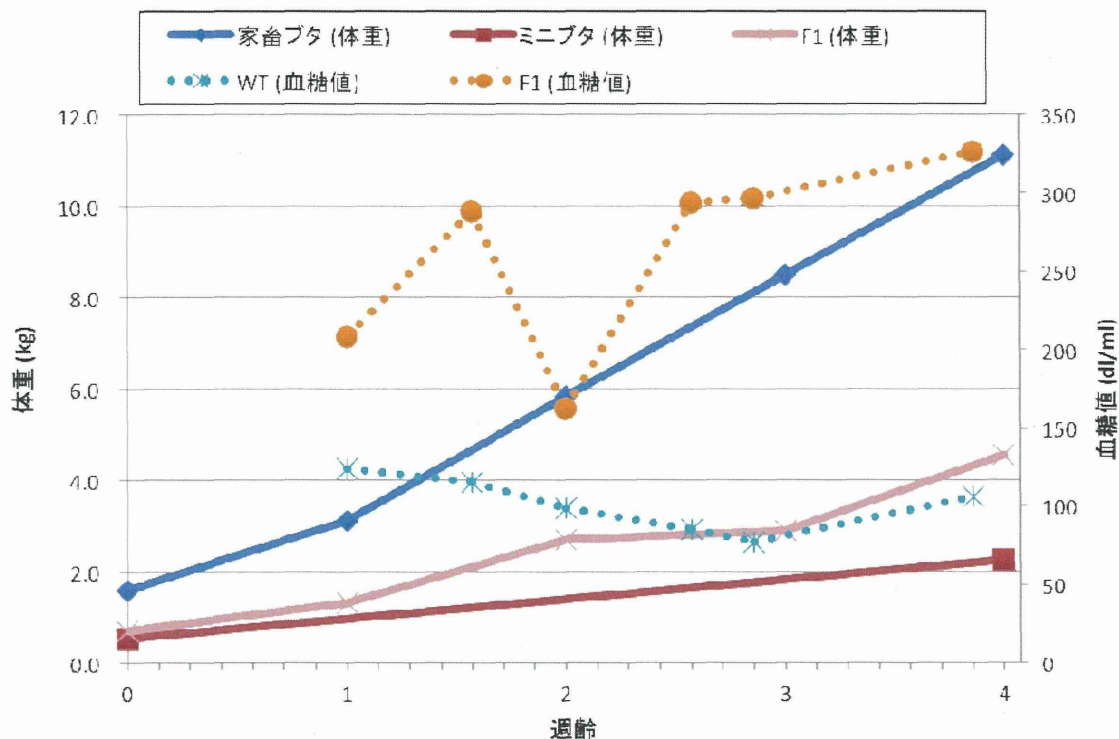
(1) 遺伝子改変ブタの作出

糖尿病モデルブタの凍結精子を用いた GIFT 法を実施した結果、2例中2例が受胎し、既に一頭からは帝王切開により F1 産仔を得た。F1 産仔の体格は顕著に小型化した(図1)。定常的な高血糖など、糖尿病モデルとしての特徴は F1 産仔に伝達された。SCID ブタ精子による GIFT 法実施例は、今後妊娠診断の予定である。

(2) ミニブタ化

図2に示す様に、クサビラオレンジ発現ブタの F2 産仔は、F1 個体よりさらに小型化し、ほぼミニブタの体格と同等となった。これによりミニブタ化が完成した。

図1 ミニブタ化糖尿病モデルブタ (F1)の成長と随時血糖値



D. 考察

体格の小さいミニブタを、家畜ブタと交配させることは出来ない。GIFT 法は、ミニブタを受胎させる方法として、確実であるばかりでなく、遺伝子改変ブタの貴重な凍結精子を有効に利用する点でも優れている。すなわち、通常の人工授精には 10~50 億の精子が必要なのにに対して、GIFT 法では約 1 千万の精子で受胎可能である。

E. 結論

本年度研究により、クサビラオレンジ発現ブタのミニブタ化が完成した。GIFT 法は、遺伝子改変ブタの凍結精子の有効利用に非常に効果的である。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

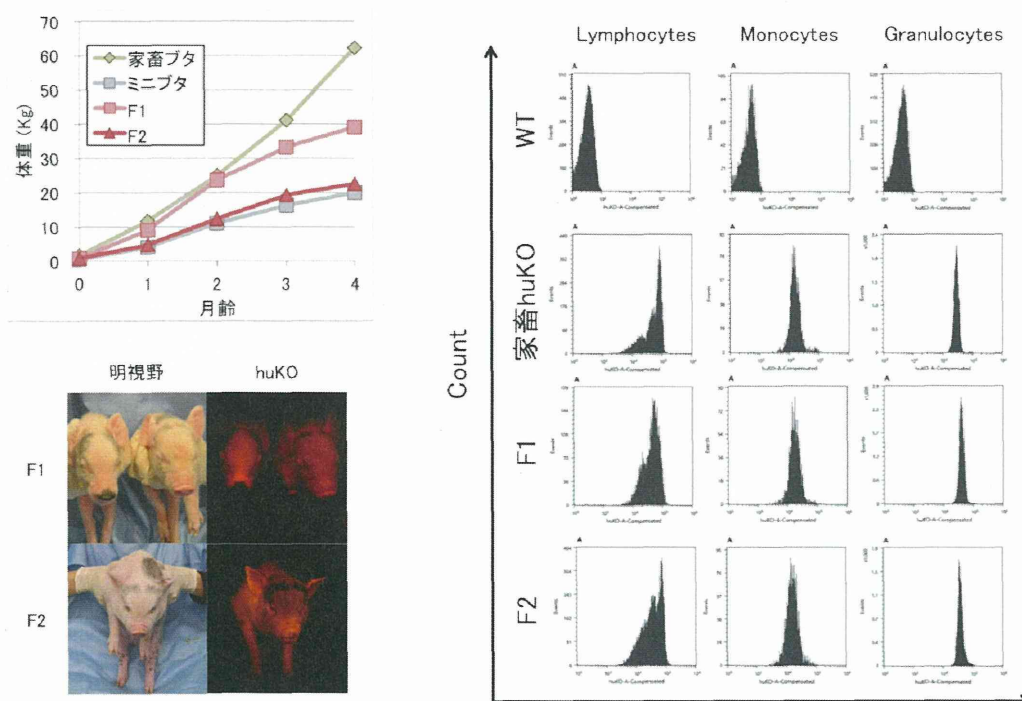
(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入した。)

G. 研究発表

論文発表

1. Matsunari, H., Kobayashi, T., Watanabe, M., Umeyama, K., Nakano, K., Kanai, T., Matsuda, T., Nagaya, M., Hara, M., Nakauchi, H., and **Nagashima, H.**: Transgenic pigs with pancreas specific expression of green fluorescent protein. *J. Reprod. Dev.* 2014; 60(3):230–237.
2. Watanabe M, Kobayashi M, Nagaya M, Matsunari H, Nakano K, Maehara M, Hayashida G, Takayanagi S, Sakai R, Umeyama

図2 ミニブタ化クサビラオレンジ発現ブタ (F1/F2)の成長と蛍光発現



- K, Watanabe N, Onodera M, Nagashima H: Production of transgenic cloned pigs expressing the far-red fluorescent protein monomeric Plum. *Journal of Reproduction and Development* 61: online Feb. 20, 2015
3. Hoang, D.-T., Matsunari, H., Nagaya, M., Nagashima, H., Millis, J.M., Witkowski, P., Periwai, V., Hara, M., and Jo, J.: A conserved rule for pancreatic islet rganization. *PLoS One* 2014; 9(10):e110384.
 4. Hara, S., Umeyama, K., Yokoo, T., Nagashima, H., and 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* 2014; 9(3):e92219.
 5. Sekijima, M., Waki, S., Sahara, H., Tasaki, M., Wilkinson, R.A., Villani, V., Shimatsu, Y., Nakano, K., Matsunari, H., Nagashima, H., and Fishman, J.A., Shimizu, A., Yamada, K.: Results of life-supporting galactosyltransferase knockout kidneys in cynomolgus monkeys using two different sources of galactosyltransferase knockout Swine. *Transplantation* 2014; 98:419–426.
 6. Miyagawa, S., Maeda, A., Kawamura, T., Ueno, T., Usui, N., Kondo, S., Matsumoto, S., Okitsu, T., Goto, M., and Nagashima, H.: A comparison of the main structures of N-glycans of porcine islets with those from humans. *Glycobiology* 2014; 24:25–38.
- 学会発表
1. 長嶋比呂志: ヒト幹細胞研究のプラットフォームとしての遺伝子改変ブタ. In: 第14回日本再生医療学会総会: 19-21 Mar 2015; 横浜.
 2. 長嶋比呂志: ヒト幹細胞研究のプラットフォームとしての遺伝子改変ブタ. In: SKIP Symposium 2014: 22 Dec 2014; 東京.
 3. 長嶋比呂志: ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変ブタの作製. In: 第3回実験動物科学シンポジウム: 12 Dec 2014; 山形.
 4. 長嶋比呂志: ブタのゲノム編集と疾患モデル開発への応用. In: 明治大学バイオリソース研究国際インスティテュートシンポジウム: 13 Mar 2015; 東京.
 5. 武石透輝, 中野和明, 松成ひとみ, 林田豪太, 浅野吉則, 内倉鮎子, 畑江将太, 大海原雅人, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: 全身性にクサビラオレンジを発現するミニブタ交雑種の開発. In: 第107回日本繁殖生物学会大会: 21-24 Aug 2014; 帯広.
 6. 中野和明, 渡邊将人, 松成ひとみ, 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, 内倉鮎子, 梅山一大, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: ゲノム編集と体細胞クローニングによる免疫不全ブタの作出. In: 第107回日本繁殖生物学会大会: 21-24 Aug 2014; 帯広.
7. 倉本桃子, 小林美里奈, 林田豪太, 松村幸奈, 松成ひとみ, 中野和明, 鞍本友香, 一山琴世, 浅野吉則, 内倉鮎子, 渡邊將人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: 糖尿病発症トランスジェニックブタ凍結精子の体外受精能の評価. In: 第107回日本繁殖生物学会大会: 21-24 Aug 2014; 帯広.
8. Matsunari H, Watanabe M, Nakano K, Uchikura A, Asano Y, Hatae S, Takeishi T, Umeyama K, Nagaya M, Miyagawa S, Hanazono Y, Nakauchi H, Nagashima H: Production efficiency of gene knockout pigs using genome editing and somatic cell cloning. In: 41th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 10-13 Jan 2015; Versailles, France.
9. Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Uchikura A, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H: Generation of X-linked SCID pigs by genome editing and somatic cell cloning. In: Swine in Biomedical Research International Conference 2014: 6-8 Jul 2014; Raleigh, USA.
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- 特許**
1. 発明者: 花園豊, 渡邊將人, 長嶋比呂志
 発明の名称: 遺伝子ノックアウトブタ
 出願日: 平成 26 年 4 月 7 日
 出願番号: 特願 2014-078986、PCT/JP2014/076768
2. 特願 2014-027655「免疫抑制剤の評価方法、及び免疫抑制剤評価キット」
 特許権者: 学校法人明治大学
 発明者: 長屋昌樹, 長嶋比呂志

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業
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

ブタ生体光分子イメージングのために、一光子型生体光分子顕微鏡が平成 25 年度に稼働し、二光子型は平成 26 年度に試験稼働を開始させた。すでにブタのなかで高解像度・高速イメージングを達成している。解像度 300nm、秒 30 コマ、マルチカラーでの二光子画像であり、優に単一血小板を同定できる。今まで、ラット以上の大型動物を用いた高解像度生体イメージングの実用例は国内・国外ともに存在せず、ハード・ソフトともに開発を行っている我々のブタ用システムはすでに大きなアドバンテージがあるといえる。平成 26 年度には実際にブタ生体内の血管を流れる赤血球、白血球、血小板を単一細胞レベルで可視化し、血栓形成過程を観察することに成功した(世界初、平成 27 年度計画の前倒し実施)。平成 27 年度は、ブタ生体内で、ヒト iPS 細胞由来の人工血小板血液細胞の可視化が実施できる見込みである。

A. 研究目的

我々は、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。画像取得に際しては、二次元ではなく、三次元、さらには、時間軸を有した四次元イメージングが可能になっている。また、取得した画像は、専用に開発し、再現性が高く、標準化可能で、ロバスト性の高い

ソフトウェアを用いて定量を行えるようになっている。

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ている。

今後、ヒトでの再生医療への安全性・有効性の担保のためには、ブタを用いたイメージングと定量解析は非常に有用である。

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、血小板が血栓を形成する瞬間の可視化である。あるいは、血管内皮が傷害されたときの、組織修復・再生過程のすべてを光で捉える。

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。また、光そのものを用いた診断・治療技術開発を視野に入れている。生体外の光診断デバイスとしてだけでなく、生体内でも光を用いた特異的細胞治療を行える可能性が高い。今後の、光医療を目指し、ヒト病態モデルの作出、診断・治療技術の開発、薬効評価を通じて医療に役立てる。

B. 研究方法

(1) ブタ生体光イメージングシステムの開発

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した。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)の開発を行った。

特に、多次元高速イメージングのために、高速レゾナンススキャン、ガルバノスキャン、と、ピエゾ及びモータードライブステージを組み合わせた。さらに、長波長フェムト秒レーザー、GaAs 高感度検出器を併用し、高速・高解像度・マルチカラーイメージングを目指した。関連特許の取得および製品開発を行った。デバイスは本学ビッグセンターと分子病態研究部に設置した。

得られた画像は大容量データとなるため、

図3 二光子イメージングによるブタ腸管血管像

