

平成 21 年 5 月 5 日現在

研究種目：	基盤研究(B)
研究期間：	2006～2008
課題番号：	18380162
研究課題名（和文）	血液型抗原発現クローン豚の作出—免疫寛容誘導法の確立—
研究課題名（英文）	The generation of clone pigs expressing blood group antigens -developing a tolerance induction method -
研究代表者	
	小川 晴子 (OGAWA HARUKO)
	国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授
	研究者番号：10400079

研究成果の概要： 本研究の目標は、A B O不適合移植の患者における拒絶反応のリスクを低減するために、免疫寛容誘導法を確立する事である。マウス実験で得られた結果を、ヒトにより近い実験動物を用いて確認するために、ヒトのA B O式血液型を発現するブタ実験モデルを用いた研究の推進を目指している。現在、ヒトの血液型抗原を生成する酵素遺伝子を導入したブタ細胞の核を用いて、ヒトのA B O式血液型を発現する遺伝子改変クローンブタを作出している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	9,300,000	2,790,000	12,090,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：移植・拒絶反応・免疫寛容・血液型抗原・クローン動物・核移植・リンパ球・ABO

1. 研究開始当初の背景

移植医療は過去約 30 年間に目覚ましく発展し多くの人の命を救ってきたが、一方、深刻な臓器不足の問題を抱えている。A B O式血液型の不適合は移植における主要な危険因子の一つであるが、慢性的な臓器不足を背景にA B O不適合腎移植が行われている。同移植における技術進歩は目覚ましく、移植腎の生着率は著しく向上したが、不適合抗原に対する抗体が産生される結果引き起こされる拒絶反応への懸念は依然存在する。危険性の高さから心臓や肝臓のA B O不適合移植は

一般的に行われていない。もしも移植前の患者に不適合血液型抗原に対する免疫寛容を誘導できるならば、A B O不適合移植の安全性はより一層高まると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、A B O不適合移植に応用可能な免疫寛容誘導法の確立を目的としている。A B O式血液型抗原に構造が類似する糖鎖抗原に関する研究において、マウスでは免疫寛容を誘導できる事を既に明らかにしており、研究の次なる段階としてより大型の動物を用

いる実験が必要である。しかしながら、ヒト以外の動物種では霊長類動物を含めてA B O抗原の発現が低く、本研究に適する大動物モデルが存在しないことが問題となった。そこで、遺伝子改変技術と用いて、研究目的に合致したブタ実験モデルを構築して研究を推進する事を目指した。

3. 研究の方法

ブタ胎児由来の細胞にヒトのA B O式血液型抗原を生成する酵素の遺伝子を導入し、この細胞の核をブタの成熟卵子に移植する事によって、ヒトのA B O式血液型抗原を発現するクローンブタを作出する。A・B・Oの血液型のクローンブタを作出する事によって、ヒトのA B O不適合移植に類似する実験モデルを構築する。不適合移植を想定するブタにおいて、問題となる血液型抗原を自己のリンパ球に発現させ、そのリンパ球を用いることによって免疫寛容を誘導する。その後A B O不適合移植を行い、免疫寛容の成立について評価する。

4. 研究成果

核移植の手法を用いて、ヒトのA型抗原の生成酵素遺伝子を導入した遺伝子改変クローンブタを作出し、そのブタの細胞の一部にA型抗原が発現している事を確認した。しかしながら、本研究の目的に合致するブタ実験モデルを構築するためには更なる遺伝子導入が必要である事が明らかとなり、研究を続行している。一方、マウス実験では、ヒトのA B O抗原に対して免疫寛容を誘導できる事を確認した。本研究における免疫寛容の誘導には、リンパ球へのA B O抗原の安定発現が重要であるため、ウイルスベクターあるいはそれ以外の方法を用いて検討を重ねた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Kobayashi T, Liu D, Ogawa H, Miwa Y, Nagasaka T, Maruyama S, Li YT, Onishi A, Iwamoto M, Kuzuya T, Kadomatsu K, Uchida K, Nakao A. Removal of blood group A/B antigen in organs by ex vivo and in vivo administration of endo- β -galactosidase (ABase) for ABO incompatible transplantation. *Transplant Immunology* 20, 132-138, (2009) 査読有

- ② Kobayashi T, Liu DG, Ogawa H, Miwa Y, Nagasaka T, Maruyama S, Li YT, Onishi A, Kuzuya T, Kadomatsu K, Uchida K, Nakao A. Alternative strategy for overcoming ABO incompatibility. *Transplantation* 83, 1284-1286, (2007) 査読有
- ③ Ogawa H, Galili U. Profiling terminal *N*-acetyllactosamines of glycans on mammalian cells by an immuno-enzymatic assay. *Glycoconjugate J.* 23, 663-674, (2006) 査読有
- ④ Kobayashi T, Saito K. A series of surveys on assay for anti-A/B antibody by Japanese Society for ABO incompatible transplantation. *Xenotransplantation* 13, 136-140, (2006) 査読有
- ⑤ Takeda K, Tasai M, Iwamoto M, Akita T, Tagami T, Nirasawa K, Hanada H, Onishi A. Transmission of mitochondrial DNA in pigs and progeny derived from nuclear transfer of Meishan pig fibroblast cells. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 306-312, (2006) 査読有
- ⑥ 小林孝彰, ABO血液型不適合移植攻略のための新補助療法, 移植, 41, 573-576 (2006) 査読無

[学会発表] (計 20 件)

- ① Ogawa H, Tolerance Induction to ABO blood group antigens by using autologous lymphocytes engineered to express the cognate antigen. XXII International Congress of the Transplantation Society. 2008.8.10-14, Sydney (Australia)
- ② Ogawa H, Induction of B cell tolerance to incompatible ABO Blood group antigens in transplantation. IPTA-IXA 2007 Joint conference, 2007.9.15-20, Minneapolis (USA)
- ③ Kobayashi T, Successful removal of blood group A/B antigen in organs by ex vivo and in vivo administration of endo-beta-galactosidase (ABase). IPTA-IXA 2007 Joint conference, 2007.9.15-20, Minneapolis (USA).
- ④ Kobayashi T, Reduction of Blood Group A/B Antigen Expression in Organ by In Vivo Infusion of endo- β -Galactosidase. American Transplant Congress 2007, 2007.5.22-27, San Francisco (USA)

- ⑤ Ogawa H, Induction of B cell tolerance to incompatible ABO blood group antigens in transplantation. Keystone Symposium for Biology of B cells in Health and Diseases, 2007. 2. 6-12, Banff (Canada)
- ⑥ 小林孝彰, ABO血液型不適合移植戦略のための新補助療法, 第42回日本移植学会総会、2006. 9. 7-9,

[図書] (計 3 件)

- ① 小林孝彰, 齋藤和英, 日本医学館, ABO血液型不適合移植の新戦略-2008-, (2008) 24-29.
- ② 小林孝彰, 齋藤和英, 日本医学館, ABO血液型不適合移植の新戦略-2007-, (2007) 81-86.
- ③ 小林孝彰, 齋藤和英, 日本医学館, ABO血液型不適合移植の新戦略-2006-, (2006) 19-23.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
-
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 晴子 (OGAWA HARUKO)
国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授
研究者番号：10400079

(2) 研究分担者

大西 彰 (OHNISHI AKIRA)
独立行政法人農業生物資源研究所・
遺伝子組換え家畜研究センター・上級研究員
研究者番号：30414890

小林 孝彰 (KOBAYASHI TAKAAKI)
名古屋大学・医学部・教授
研究者番号：70314010

(3) 連携研究者

上記の研究分担者は、2008年度は連携研究者として参加