

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380168

研究課題名（和文） ABO 式血液型をヒト型にリモデリングしたクローン豚を用いた免疫寛容誘導法の開発

研究課題名（英文） Development of tolerance induction method using clone pigs remodeled for expressing human ABO blood group antigen

研究代表者

小川 晴子 (OGAWA HARUKO)

帯広畜産大学・動物・食品衛生研究センター・准教授

研究者番号：10400079

研究成果の概要（和文）：本研究は、核移植により ABO 式血液型をヒト型に改変したクローン豚を作出し、それを用いて ABO 不適合移植の拒絶反応を制御するための新たな免疫寛容誘導法を確立する事を目的としている。その豚の作出に必用な 2 種類の糖転移酵素遺伝子のうちの 1 つを導入したクローン豚をまず作出し、次にそのブタの体細胞に 2 つ目の遺伝子を導入した。得られた細胞を用いた核移植によってヒトの A 型を発現するブタを作出したが、生後の生育及び組織への発現に改善が求められるため、遺伝子導入法等を改変して検討している。

研究成果の概要（英文）：This study aims to generate transgenic pigs expressing human ABO blood group antigens by using nuclear transfer method, and utilize the pigs to develop a novel tolerance induction method to control the rejection in ABO-incompatible transplantation. First, transgenic pig carrying one of the two glycosyltransferase genes to be transferred was produced, and then the second glycosyltransferase gene was transferred to the somatic cells of the transgenic pig. Using the genetically-engineered cells as a donor cell for nuclear transfer, purposed transgenic pig was produced. There has been seen some problems in the growth after birth and the expression of the purposed antigen, therefore additional studies are ongoing to solve the problems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	11,600,000	3,480,000	15,080,000

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：クローン家畜・核移植・移植・拒絶反応・免疫寛容・ABO 式血液型抗原

## 1. 研究開始当初の背景

近代医療において移植技術は目覚ましく発展して多くの人の命を救ってきたが、その一方、深刻な臓器不足の問題を抱え続けている。

この問題を解決する目的で、再生医療・人工臓器・異種移植等の研究が精力的に行われているが、現段階で臓器不足を解決するだけの手段は開発されていない。ABO 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 ABO 不適合臓器移植が行われている。技術の進歩により ABO 不適合腎移植における臓器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生じる拒絶反応への懸念は依然存在する。また、危険性の高さから心臓や肝臓の ABO 不適合移植は一般的に行われていない。もしも ABO 不適合移植を受ける前の患者に、不適合な血液型抗原に対する「免疫寛容」を誘導できるならば、ABO 不適合移植の安全性はより一層高まると考えられる。免疫寛容とはある抗原に対する免疫反応が起きない状態である。そもそも免疫系は「自己」の抗原に対して免疫寛容であるが、「非自己」の細胞や臓器に対しては拒絶反応を引き起こす。移植する細胞や臓器が非自己であっても、なんらの方法で免疫寛容を成立させる事ができれば拒絶反応は発生しないことになる。このように、免疫寛容はまさに移植における理想の状態であるため、この分野の研究には大きな期待が寄せられているが、研究に適する大動物実験モデルが存在しない事が研究推進の妨げとなっている。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、ABO 不適合移植に適用可能な免疫寛容誘導法の確立である。私達は、これまでの研究において、ABO 式血液型抗原に構造が類似する糖鎖抗原に対して、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きた。この方法を用いて人に ABO 式血液型抗原に対する免疫寛容を誘導できるか否かを見定める為には、まずは人に近い大型の実験動物を用いた実験が必要である。しかし、人以外の動物種では ABO 抗原の発現が低すぎるため適切な実験を行う事ができない。そこで、遺伝子改変技術を用いて、研究目的に合致した豚実験モデルを構築して研究を推進する事を目指した。豚は解剖学的・血液生化学的に人に近く、食用に供される事から動物愛護の面での問題も少なく、医学研究用の実験動物としての適性をもつと考えられる。本研究では、核移植技術を用いてヒト型の ABO 式血液型抗原を発現するクローン豚を作出する事を第 1 の目的とし、更にそのクローン豚を用いた研究により ABO 式血

液型抗原に対する免疫寛容法を確立することを第 2 の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) これに先立つ研究課題において、豚胎児由来の細胞にヒトの A 抗原生成酵素遺伝子を導入し、この細胞の核をブタの成熟卵子に移植する事によって A 抗原 (I 型:ブタ型) を発現するクローン豚を得る事ができた。本研究では、この豚の体細胞に更にヒトの O 抗原生成酵素遺伝子を導入し、その核の移植によって II 型の A 抗原 (ヒト型) を発現する A 型クローン豚の作出を目指した。また、豚胎児由来細胞にヒト O 抗原生成酵素遺伝子を導入し、O 型クローン豚の作出も行った。豚胎児由来細胞に O 抗原生成酵素遺伝子及び B 抗原生成酵素遺伝子を同時に導入する方法によって B 型クローン豚の作出も試みた。

(2) 本研究では、自己のリンパ球を用いた免疫寛容誘導法の開発を目指しているため、豚のリンパ球へ ABO 式血液型抗原を発現させるための遺伝子導入法について検討した。

## 4. 研究成果

(1) ブタ型 A 抗原を発現させた豚の体細胞へヒト O 抗原生成酵素遺伝子を導入し、この細胞の核を用いる事により、複数のクローン豚を産出させる事ができた。しかし、いずれも生後 1 ヶ月までに死亡し、直接の原因は不明であるが、生来やや虚弱であった可能性が考えられた。それらの豚の血管から分離した内皮細胞を培養してヒト型 A 抗原の発現について調べたところ、弱いながら発現が認められたが、腎臓の組織標本においては血管内皮細胞への発現が確認できなかった。

(2) 豚胎児由来細胞にヒト O 抗原生成酵素遺伝子を導入し、複数のクローン豚を産出させる事ができた。しかし、いずれも生後 6 ヶ月頃に死亡し、なんらかの感染による可能性が考えられた。これらの豚については、培養血管内皮細胞、腎臓組織のいずれにおいても、ヒト型 O 抗原の強い発現が認められた。

(3) 豚胎児由来細胞に O 抗原及び B 抗原の生成酵素遺伝子を同時に導入し、この細胞の核を用いてクローン豚の作出を試みたが、産子を得る事ができなかった。

以上(1)~(3)の結果より、クローン豚誕生後の生育に加え、組織への発現において改善が求められると考えられたため、核移植に用いるための細胞への遺伝子導入法等に改良・工夫を加えて研究を続行している。

(4) 豚のリンパ球への遺伝子導入法として、ウイルスベクターを用いる方法、遺伝子導入試薬を用いる方法、ヌクレオフェクション法、

*in vitro* 培養法等、様々な方法を用いて検討を行った。ABO 抗原の転移酵素遺伝子の導入によって一定のABO抗原の発現が得られたが、発現量を高めるための検討を続けている。

#### 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 12 件)

- ① Iwasaki K, Miwa Y, Ogawa H, Iwamoto M, Furusawa T, Onishi A, Kuzuya T, Haneda M, Watarai Y, Uchida K, Kobayashi T. Comparative study on signal transduction in endothelial cells after anti-A/B and HLA antibody reaction: implication of accommodation. *Transplantation* 93: 390-397, 2012. 査読有, DOI:10.1097/TP.0b013e3182424df3
- ② Yazaki S, Iwamoto M, Onishi A, Miwa Y, Hashimoto M, Oishi T, Suzuki S, Fuchimoto D, Sembon S, Furusawa T, Liu D, Nagasaka T, Kuzuya T, Ogawa H, Yamamoto K, Iwasaki K, Haneda M, Maruyama S, Kobayashi T. Production of cloned pigs expressing human thrombomodulin in endothelial cells. *Xenotransplantation* 19: 82-91, 2012. 査読有, DOI:10.1111/j.1399-3089.2012.00696.x
- ③ Yamamoto T, Kawaguchi T, Watarai Y, Tujita M, Hiramitsu T, Nanmoku K, Goto N, Katayama A, Kobayashi T, Uchida K. Potent immunosuppression for ABO-incompatible renal transplantation may not be a risk factor for malignancy. *Transplant Proc.* 44: 210-213, 2012. 査読有, DOI:10.1016/j.transproceed.2011.11.048
- ④ 小林孝彰. ABO 血液型糖鎖抗原の切断. *Organ Biology* 18: 116-120, 2011. 査読有, <http://mol.medicalonline.jp/archive/select?jo=ca3organ>
- ⑤ Miwa Y, Yamamoto K, Onishi A, Iwamoto M, Yazaki S, Haneda M, Iwasaki K, Liu D, Ogawa H, Nagasaka T, Uchida K, Nakao A, Kadomatsu K, Kobayashi T. Potential value of human thrombomodulin and DAF expression for coagulation control in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation* 17: 26-37, 2010. 査読有, DOI:10.1111/j.1399-3089.2009.00555.x
- ⑥ Yazaki S, Iwamoto M, Onishi A, Miwa Y, Suzuki S, Fuchimoto D, Sembon S, Furusawa T, Hashimoto M, Oishi T, Liu D, Nagasaka T, Kuzuya T, Maruyama S, Ogawa

H, Kadomatsu K, Uchida K, Nakao A, Kobayashi T. Successful cross-breeding of cloned pigs expressing endo- $\beta$ -galactosidase C and hDAF.

*Xenotransplantation* 16: 511-521, 2009. 査読有, DOI:10.1111/j.1399-3089.2009.00549.x

- ⑦ Kobayashi T, Liu D, Ogawa H, Miwa Y, Nagasaka T, Maruyama S, Li Y-T, 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- $\beta$ -galactosidase (ABase) for ABO-incompatible transplantation. *Transpl. Immunol.* 20: 132-138, 2009. 査読有, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2008.09.007>

[学会発表] (計 16 件)

- ① Iwamoto M, Yazaki S, Onishi A, Miwa Y, Hashimoto M, Oishi T, Suzuki S, Fuchimoto D, Sembon S, Nagasaka T, Liu D, Iwasaki K, Haneda M, Yamamoto K, Maruyama S, Kobayashi T. Successful production and breeding of cloned pigs expressing human thrombomodulin in endothelial cells. CTS-IXA 2011 Joint Congress, 2011/10/23-26, Miami (USA).
- ② Iwasaki K, Miwa Y, Haneda M, Kobayashi T. Difference in signal transduction between anti-A/B and anti-HLA antibody binding to endothelial cells. CTS-IXA 2011 Joint Congress, 2011/10/23-26, Miami (USA).
- ③ Iwasaki K, Miwa Y, Haneda M, Kobayashi T. Complement and thrombin block endothelial cell accommodation. CTS-IXA 2011 Joint Congress, 2011/10/23-26, Miami (USA).
- ④ 岩元正樹, 矢崎智子, 三輪祐子, 丸山彰一, 鈴木俊一, 橋本径子, 大石貴嗣, 劉大革, 長坂隆治, 小林孝彰, 大西彰. 異種移植における凝固系制御の試み: ヒトロンボモジュリン遺伝子導入クローンブタの作出. 第47回日本移植学会総会, 2011/10/4-6, 仙台.
- ⑤ 岩崎研太, 三輪祐子, 羽根田正隆, 矢崎智子, 岩元正樹, 大西彰, 小川晴子, 小林孝彰. ERK 活性化細胞外因子は Accommodation 誘導を阻害する. 第47回日本移植学会総会, 2011/10/4-6, 仙台.
- ⑥ 岩元正樹, 矢崎智子, 三輪祐子, 山本晃士, 丸山彰一, 鈴木俊一, 淵本大一郎, 千本正一郎, 鈴木美佐枝, 橋本径子, 大石貴嗣, 羽根田正隆, 岩崎研太, 中尾昭公, 小林孝彰, 大西彰. human thrombomodulin 高発現体細

胞クローンブタおよびその後代の作出。  
第16回日本病態プロテアーゼ学会、  
2011/8/26-27, 大阪。

- ⑦ 岩崎研太, 三輪祐子, 羽根田正隆, 矢崎智子, 岩本正樹, 大西彰, 小川晴子, 小林孝彰. ABO 不適合移植における抗体接着が誘導する細胞保護に関する研究. 第46回日本移植学会総会, 2010/10/21-22, 京都.
- ⑧ Iwasaki K, Miwa Y, Haneda M, Ogawa H, Uchida K, Takeda A, Nakao A, Kobayashi T. The reduction of RAF/MEK/ERK pathway by anti-ABO association may be the identity of accommodation in ABO-incompatible transplantation. 23rd International Congress of The Transplantation Society, 2010/8/15-19, Vancouver (Canada).
- ⑨ Miwa Y, Yazaki S, Iwamoto M, Onishi A, Yamamoto K, Iwasaki K, Haneda M, Maruyama S, Kadomatsu K, Uchida K, Kobayashi T. Effective suppression of direct prothrombinase activity in porcine endothelial cells by human thrombomodulin (hTM) gene transfer or its soluble form. American Transplant Congress 2010, 2010/5/1-5, San Diego (USA).
- ⑩ Miwa Y, Iwasaki K, Yamamoto K, Maruyama S, Onishi A, Iwamoto M, Yazaki S, Liu DG, Nagasaka T, Haneda M, Kadomatsu K, Kobayashi T. Human thrombomodulin plays an important role in coagulation control: engine braking is essential for physiological regulation. IPITA-IXA 2009, 2009/10/12-16, Venice (Italy).
- ⑪ 小川晴子, 大西彰, 岩本正樹, 羽根田正隆, 岩崎研太, 三輪祐子, 小林孝彰. ABO 式血液型抗原に対する免疫寛容の誘導に関する研究. (口演) 第45回日本移植学会総会, 2009/9/16-18, 東京.
- ⑫ Miwa Y, Yamamoto K, Onishi A, Iwamoto M, Maruyama S, Nakao A, Kadomatsu K, Kobayashi T. Potential impacts of human DAF and thrombomodulin on thrombin regulation. American transplant congress 2009, 2009/5/30-6/3, Boston (USA).

[図書] (計3件)

- ① 小林孝彰. 異種移植研究から臨床へ: 遺伝子組換えブタに対する期待と日本の役割. Techno Innovation 19: 54-60, 2010.
- ② 小林孝彰. 腎移植における免疫モニタリングの試み. 今日の移植. 22: 646-652, 2009.
- ③ 小林孝彰. ABO 血液型抗体の測定 腎移植

のすべて. メジカルレビュー社.  
232-234, 2009.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 晴子 (OGAWA HARUKO)  
帯広畜産大学・動物・食品衛生研究センター・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・医用モデルブタ研究開発ユニット・上級研究員

研究者番号: 30414890

小林 孝彰 (KOBAYASHI TAKAAKI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号: 70314010

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: