

平成22年 4月 13日現在

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19209043

研究課題名(和文) 信頼性の確立した Gal 完全ノックアウトブタを用いたブタ・サル間
異種腎・膵島移植

研究課題名(英文) GalT-knockout pig to monkey xenogeneic kidney and islet transplantation

研究代表者

山田 和彦 (YAMADA KAZUHIKO)

鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進センター・教授

研究者番号：40241103

研究代表者の専門分野：移植免疫学、移植外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：異種移植、ブタ・サル間移植、腎移植、膵島移植、GalKO ブタ、遺伝子導入

1. 研究計画の概要

本課題は、以下の3つの目的から成る。

目的 1) 既に米国で確立され、信頼性のある Gal-KO ブタ体細胞核(背景および目的の項参照)を用いた、日本国内における Gal-KO ブタの早期作製

目的 2) Gal-KO 核を用いてより移植に適した独自の Gal-KO トランスジェニック (Tg) ブタ(ヒト CD47/Gal-KO)の作製、および Gal+ 核へのヒト CD47 を導入したブタの作製

目的 3) Gal-KO, ヒト CD47/Gal-KO, ヒト CD47/Gal+ブタをドナーとしたブタ・サル異種腎・膵ラ氏島移植実験

2. 研究の進捗状況

・ブタ細胞を用いた RI を用いない細胞免疫試験を確立し、報告した (Transplant Immunol 2008)。

・Harvard 大学 TBRC から搬入した Gal ノックアウトブタ細胞核を用い、国内で核移植を行い GalKO ブタの作出に成功した(論文作成中)。

・上記の国内で誕生した GalKO ブタをドナーとし、国内で初めて GalKO ブタ腎のサルへの移植を行い、15日間全く拒絶のなく経過するに至った。

・異種移植において Gal 抗原とともに NonGal 抗原への検討も重要であり、GalKO ブタを用い、Accommodation の成立に CD59 の関与が示唆される成果を得、報告した (Transplantation 2009)。

・膵島移植において、成豚膵島 Gal の発現が乏しいことに着目し、GalKO ではないミニブ

タ膵島のサルへの移植を行い、当研究室で確立した新規免疫抑制療法を用いて、国内初となる大動物異種間膵島移植により2カ月間正常血糖が維持されることを確認した(論文作成中。南日本新聞、朝日新聞掲載)。

・分担者(大段ら)により、ヒト CD47 により、マクロファージによる異種間貪食作用が抑制されるとともに、異種間 T 細胞反応の軽減が確認された(日本異種移植研究会)。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している

・Harvard 大学 TBRC から搬入した Gal ノックアウトブタ細胞を用いた国内での核移植による GalKO ブタの作出は、当初予定の18カ月を9カ月ほど遅延したものの、H21年度にその作出に至り、また、国内初の GalKO ブタ腎のサルへの移植で15日間全く拒絶ない状況に至っている。更に、ブタ・サル間異種膵島移植においても、2ヶ月間正常血糖を維持するに至っている。これら In vivo モデルは国内初の結果であり、in vitro 細胞試験の確立と合わせ達成度は70%以上と考えている。

・未達成30%は、GalKO に加え他の遺伝子導入をした GalKO/Tg ブタの作出の遅延である。GalKO/hDAF に関しては誕生にまで至っているものの移植臓器ドナーとして用いるまでの生育に至らず、実際の臓器移植は H22 年度に行うことになる。CD47Tg 細胞からの核移植は、発現効率を上げ、H22 年度に作出を目指す。

4. 今後の研究の推進方策

・核移植 GalKO ブタの作出を増加させ、in vivo 異種移植件数を増やし、異種間腎・膵島移植成績の更なる向上を目指す。

・CD47Tg 細胞を用いた核移植からの GalKOTg ブタおよび GalKO/HDAF Tg ブタの作出を急ぎ、異種移植まで進める。

・大動物実験は、実験経過の長さから、研究成果を得るまでに期間を要する。本課題においても第3年度になって、GalKO ブタの作成および日本発の GalKO ブタ・サル間異種移植に至った。最終年度はその成果の論文報告を推進する。

5. 代表的な研究成果 (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 26 件)

*Corresponding author

1. 長嶋比呂志. クローン動物とクローニング技術の医学・医療への利用. 日本畜産学会報 2010; 81: 53-64

2. Results of gal-knockout porcine thymokidney xenografts.

Griesemer AD, Hirakata A, Shimizu A, Moran S, Tena A, Iwaki H, Ishikawa Y, Schule P, Arn JS, Robson SC, Fishman JA, Sykes M, Sachs DH, Yamada K*. Am J Transplant. 2009 Dec;9(12):2669-78.

3. Upregulation of CD59: potential mechanism of accommodation in a large animal model. Griesemer AD, Okumi M, Shimizu A, Moran S, Ishikawa Y, Iorio J, Arn JS, Yamada K*. Transplantation. 2009 May 15;87(9):1308-17.

4. Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1alpha induces diabetes in transgenic-cloned pigs. Umeyama K, Watanabe M, Saito H, Kurome M, Tohi S, Matsunari H, Miki K, Nagashima H*. Transgenic Res 2009; 18: 697-706

5. Porcine CFSE mixed lymphocyte reaction and PKH-26 cell-mediated lympholysis assays. Oku M, Okumi M, Sahara H, Hirakata A, Onoe T, Griesemer AD, Yamada K*. Transplant Immunology 2008. 20. 78-82

[学会発表] (計 54 件)

1 山田和彦: 日本異種移植研究会 H22 3/14 国内初のミニブタ (NIBS 系) をクローン胚移植用レシピエントとした GalT-KO ミニブタの作出とそのブタ腎を用いた GalT-KO ブタ・サル異種間腎移植

2 山田和彦: 日本膵・膵島移植研究会

H22 3/12 ブタ・サル異種間膵島移植: クラウン系ミニブタ膵島移植後 2 ヶ月間の正常血糖維持

3. Kazuhiko Yamada: IPITA-IXA Joint Congress 国際膵臓・膵島移植・異種移植合同学会 H21 10/14 Venice, Italy

Life Supporting Xenogeneic Islet Transplantation with a Regimen Including Hepatocyte Growth Factor in a CLAWN Miniature Swine-to-Cynomologous Monkey Model

4. Nagashima H: International Symposium Xenotransplantation H21 7/4 Berlin, Germany

Recent advances in production of genetically modified pigs for xenotransplantation

5. 田原 裕之、大段秀樹: 第 44 回日本移植学会総会 H20 9/21

CD47-SIRP システムを介した異種 T 細胞性拒絶反応制御の可能性

6. Kazuhiko Yamada: XXII International Congress of The Transplantation Society H20 8/13 Sydney, Australia

Life-Supporting GalT-KO Swine Kidney Xenografts

7. Kazuhiko Yamada: CTS-IPITA-IXA 2007 Joint Conference H19 9/18 Minneapolis, USA

Vascularized thymic grafts induce transplantation tolerance in large animal models

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

— 新聞報道

国内初のブタ・サル間異種膵島移植による 2 ヶ月間正常血糖の維持

南日本新聞 H21 8/27

朝日新聞 H21 10/7

ハーバード大学との共同研究による遺伝子改変異種間腎移植

読売新聞 H20 8/25

朝日新聞 H20 9/13

— シンポジウム開催 H21 2/23

先進医用ミニブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクトシンポジウム