

機関番号：17701

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

研究成果の概要(和文)：移植医療が定着する欧米でも臓器不足は大きな問題であり、医用動物臓器をドナーに用いる異種移植は有力な解決策である。前臨床研究としてブタをドナーとしたサルへの異種移植を行い、(1) Gal ノックアウト(KO) MHC 確立ミニブタ細胞核を用いた核移植による国内での GalKO ブタ作出、(2) 国内作出 GalKO ブタ腎のサルへの国内初の移植で 15 日間拒絶が皆無、(3) 当研究室確立の新規免疫抑制療法で、国内初となる異種間膵島移植での 2 カ月間正常血糖維持という成果を得た。更に、(4) RI を用いない移植後細胞性免疫反応評価法の確立、(5) ヒト CD47 による、異種間マクロファージ貪食作用抑制と T 細胞反応軽減、(6) Non-Gal 抗原に対する Accommodation 成立に対する CD59 関与の示唆という結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Due largely to improvements in immunosuppressive therapies, organ transplantation has become the primary cure for end-stage organ failure in the United States, Europe, as well as Japan. However, the current shortage of donor organs is a critical problem. One attractive solution is xenotransplantation utilizing miniature swine donor organs. However, because human blood contains native antibodies (NAb) directed toward a constitutively expressed pig cell surface carbohydrate called galactose- α -1,3-galactose (Gal), pig-to-human xenotransplantation initially resulted in hyper-acute (graft loss in < 1day) humoral rejection. With this grant support in the past four years, we have made two major achievements, neither of which had previously been accomplished in Japan. Achievement 1 (first domestic success): Using nuclear transfer from somatic nuclei of GalT-KO miniature swine, obtained from the TBRC at Harvard Medical School, we and our colleagues, as a collaborative effort, succeeded in producing GalT-KO miniature swine. We then transplanted GalT-KO kidneys from those pigs into cynomolgous monkeys to confirm that hyperacute rejection was avoidable. Rejection did not occur for 15 days after xenotransplantation. Achievement 2 (first domestic success): We successfully isolated islets from miniature swine and, following xenogeneic transplantation of these islets, we observed maintenance of normal blood glucose levels up to two months in monkeys. In addition, we have explored the mechanisms of rejection in xenotransplantation. In particular, our results utilizing GalT-KO swine suggested that CD59 is involved in development of accommodation. Moreover, our studies have suggested immune-regulatory/protective effects by (1) transgene human CD47 onto porcine cells and (2) administration of soluble thrombomodulin or hepatocyte growth factor. Using the support of this grant, we have developed new immunosuppressive regimens for renal/islet xenotransplantation, including these reagents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2008年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2009年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2010年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
総計	38,000,000	11,400,000	49,400,000

研究分野：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. 研究開始当初の背景

臓器移植は、免疫抑制剤の開発や医療技術の向上により、欧米のみならず、我国においてもすでに末期臓器不全の根治治療として確立した医療である。しかし一方で、脳死ドナーからの移植医療が日常的に行われている欧米においても、ドナー臓器不足が深刻な問題である。近年、再生医療に注目が集められているが、細胞移植としての可能性は大きいものの、3次元構造を持つ臓器を作製し、その臓器で生命を維持したという報告は皆無である。ドナー臓器不足の究極的解決策として、ヒトとの生理学的・解剖学的類似性の点から、ブタをドナーとした異種移植は有力な戦略と考えられる。しかし、ヒト血中には、ブタ細胞表面に発現している galactose- α 1.3-galactose (Gal) と呼ばれる糖鎖抗原に対する自然抗体が存在するため、異種臓器移植直後から超急性液性拒絶反応が引き起こされる。これまでに日本を含め世界の異種移植研究施設で、Gal 抗原発現の抑制や補体制御因子の遺伝子導入などが試みられたが移植臓器は早期に拒絶され、Gal 合成酵素遺伝子を完全にノックアウト (KO) した Gal-KO ブタの誕生が異種臓器移植の臨床応用への道を開く鍵と考えられてきた。本課題研究代表者山田の共同研究施設である米国 Immerge BioTherapeutics は、2002年11月に体細胞核移植法により Gal 抗原が完全に KO された世界初のホモ Gal-KO ブタの作製に成功した。山田は、ハーバード大学・移植生物学研究センター異種移植プロジェクトリーダーとして、Gal-KO ブタを用いて世界初のヒヒ (Baboon) への異種腎臓移植を行い、超急性拒絶反応が回避され、腎機能が維持されることを報告しているが (Yamada K. et al. Nat Med. 2005; 11(1) 32-4)、この結果は異種移植の臨床応用への道を大きく前

進させ、臓器不足を解消する Breakthrough として欧米で大きな注目を集めた。

2. 研究の目的

日本でも数施設で国産 Gal-KO の作製が試みられてきたものの、本研究申請当時は、ヘテロ Gal-KO ブタは誕生しているものの、Gal 合成酵素遺伝子が完全に KO されたホモ Gal-KO ブタ体細胞核の作製や、ヘテロ Gal-KO ブタ間の繁殖によるホモ Gal-KO ブタの誕生には至っていなかった。更に、今後、移植療の定着によって欧米のように臓器不足が大きな問題となることが予想される日本であるが、異種移植実験を系統立てて構成する指導的立場としての実験経験者が不足し、国際的に通用する in vivo 異種移植実験は行われてこなかった。本課題研究の主たる目的は、(1) 日本において完全ホモ Gal-KO ブタを作製し、更に、遺伝子を導入した改良型 Gal-KO ブタ作製を試みることで、それとともに (2) 臨床応用が近づきつつある異種移植に対し、日本の独創性を取り入れた系統立てた異種移植実験 (腎臓・膵島) を行うことによって臨床応用を目指すことである。また、(3) 超急性拒絶反応が回避された後に生じる異種間細胞性免疫反応や移植後血管病変、過度の免疫抑制療法に起因する感染症などを回避する最適な免疫抑制療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 目的1：既に米国で確立され、信頼性のある Gal-KO ブタ体細胞核を用いて、日本国内で18ヶ月以内に Gal-KO ブタを作製する。

研究計画は以下の3つのステップに分けられる。

ステップ1 米国で飼育されている Gal-KO

ブタから体細胞および内皮細胞を分離・培養し、その凍結細胞の日本への空輸：

米国 Harvard 大学 Transplantation Biology Research Center (TBRC)、American Xeno Inc.で飼育される完全 (ホモ) Gal-KO ブタ (月齢 6 ヶ月) の耳介皮膚、肺、腎生検組織細胞を初代培養 (Primary Culture) 後に凍結し、凍結細胞

(3×10^5 /tube) 10 個を航空便で日本に搬入する。

ステップ 2 Gal-KO 細胞の核移植による Gal-KO クローンブタ作製と繁殖：

①Gal-KO ブタ線維芽細胞 (皮膚・肺・腎) の細胞周期を同調させるため、血清飢餓培養処理を 2 日間行ない、核ドナー細胞とする。レシピエント卵の調整として、屠畜場で採取した卵巣から卵を取り出し、NCSU23 により体外成熟させる。成熟後除核し、核ドナー細胞核 (ホモ Gal-KO) を電気融合法で移植し、さらに電氣的活性化を加える。作製した核移植胚を培養し、発情同期化したレシピエントミニブタ雌の子宮角に移植する。

②誕生した Gal-KO クローンブタの雌雄をバリアシステム化の動物飼育室に搬入し、自然交配あるいは人工授精により Gal-KO ブタの F1 を得て Gal-KO ブタを繁殖する。

ステップ 3 異種移植に備えた Gal-KO ブタの組織学および免疫学的検討と移植実験 (目的 3 に続く)

(2) 目的 2 : Gal-KO 細胞核および Gal+ ブタ細胞へのヒト CD47 遺伝子導入

マクロファージによる異種細胞傷害機構は、抗体依存性と非依存性に分けられる。抗体依存性傷害機構では、ブタ細胞に抗体が結合し、Fc 受容体を介したマクロファージの直接傷害機構が作動する。また古典経路からの補体活性化がマクロファージを動員する。これらの抗 Gal 抗体依存性応答は、Gal-KO ブタの使用によって回避される。しかし近年、分担研究者 (大段) は、ヒトマクロファージが Gal 抗原を除去したブタ細胞に対しても、抗体補体非依存性の細胞傷害性を示すことを解明した。この結果は Gal-KO ブタの使用によってもマクロファージ性拒絶反応は回避し得ない可能性を示唆する。

マクロファージの自己寛容機構は、赤脾髄マクロファージの阻害受容体シグナル制御蛋白 α (SIRP α) が赤血球上の CD47 (インテグリン関連蛋白質) を認識し非特異的活性化を抑制することによる。そこでブタ細胞 (臍島または骨髄細胞) にヒト CD47 遺伝子を導入し、移植後の効果を検討する (目的 3 に続く)。同時に、Gal+ ブタ細胞にヒト CD47 遺伝子を導入し、ヒト CD47 遺伝子導入ブタの作製に取り掛かる。

(3) 目的 3 : 種々のブタをドナーとする、臨床応用を目指した系統立てたブタ・サル間異種移植実験

Gal+, Gal-KO, Gal+/KO plus ヒト CD47 遺伝子導入 (ヒト CD47Tg) ブタをドナーとしたブタ・サル間での異種腎・臍ラ氏島移植実験を行い、更に異種移植後に生じる細胞性免疫反応や移植後血管病変、過度の免疫抑制療法に起因する感染症などを回避する最適な免疫抑制療法の開発を目指す。

実験動物は、ドナーとして Gal-KO または Gal+ ブタ、レシピエントとしてサルを用いる。

ブタ臍島移植レシピエントの IDDM 誘導 (B 細胞の破壊) は、移植前に Streptozotocin (STZ) を経静脈投与することにより行い、STZ により IDDM が完全に誘導できない場合は臍臓全摘出を行う。臍島移植用ブタ臍臓は、鹿児島大学山田教室で全身麻酔下に摘出し、定期航空便により京都大学興津研究室 (分担者) へ輸送し、臍島分離を行う。分離臍島を一日培養した後、鹿児島大学山田研究室でサル門脈内へ投与する。

異種腎臓移植は、小児腎移植と同様の術式を用いて行う。

免疫抑制のコンセプトは、T 細胞を導入期に一過性に減少させ、また Costimulatory Blockade による Indirect Pathway での抗原提示細胞と T 細胞の interaction 抑制を柱とする。更に独自の免疫抑制戦略として、同種移植実験で確認された免疫抑制効果と既知の血管再生能から、移植臍島の生着促進・維持が期待される Hepatocyte Growth Factor (HGF) を臍島移植レシピエントに投与する。

4. 研究成果

平成 19-20 年度は、(1) Harvard 大学 TBRC から搬入した Gal-KO ブタ細胞核を用い、国内でミニブタを核移植レシピエントとした GalT-KO ブタの作出、(2) ブタをドナーとした細胞アッセイの確立、および(3) ブタ・サル間異種移植実験システムの確立を行い、特に *in vitro* を中心とした成果を得た。

(1) Gal-KO ブタから内皮・体細胞を分離・培養し、国内での Gal-KO ブタの作出を進めた (後述のように、平成 21 年度に国内で核移植を行い Gal-KO ブタの作出に成功)。

(2) 移植後細胞検査として RI を用いない細胞免疫試験および ELISA 法を確立し、学術誌に報告した (Transplant Immunol 2008)。

(3) ブタ・サル間移植実験システムの整備 (後述のように平成 21-22 年度にブタ・サル間異種移植での国内初の成果)。

(4) ヒト CD47 遺伝子のブタ細胞への導入および *in vitro* 試験においてヒト CD47 導入による異種免疫制御の確認： 分担者大段らは、ブタ-霊長類間では CD47-SIRP α によるシグナル伝達が作動せず、非特異的傷害活性が抑制

されないことを確認した。そこで、ヒト CD47 分子を遺伝子導入によりブタ細胞上に表出させることでマクロファージによる抗体非依存性傷害を制御できる可能性を証明した。更にヒト CD47 により、マクロファージによる異種間食食作用が抑制されるとともに、異種間 T 細胞反応が軽減されることを確認した。

平成21-22年度は、平成19-20年度からの実験の積み重ねにより、*in vivo*実験で明確な成果として現れた。更に平成21年度は、サル・ブタ間異種移植実験によって、国内初となる3つの成果を得た。

(1) Harvard大学TBRCから搬入したGal-KOブタ細胞核を用い、国内で核移植を行い、Gal-KOブタの作出に成功した。

(2) 誕生したGal-KOブタをドナーとし、国内で初めてGal-KOブタ腎のサルへの異種移植を行い、15日間全く拒絶なく経過するという成果を得た。

(3) 異種膵島移植において、成豚では膵島でのGal抗原の発現が乏しいことに着目し、Gal-KOではない鹿児島クラウンミニブタから得た膵島をサルへ移植した。異種膵島移植後2-10病日の肝臓生検により、インスリン染色陽性ブタ細胞を確認し、異種間移植ブタ膵島がサル肝臓内に生着したことを確認した。更に当研究室で確立したHGFを中心とする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という成果を得た(南日本新聞、朝日新聞掲載)。

またGal抗原とともにNon-Gal抗原の検討も進め、Gal-KOブタを用い、Accommodationの成立に対してCD59の関与が示唆される成果を得、国際移植学会学術誌に報告した(Transplantation 2009)。

平成22年度はブタ・サル間異種移植で、Gal-KOブタをドナーとした腎移植、クラウンミニブタをドナーとした膵島移植症例を重ね、更にHarvard大と協力しhCD47導入ブタ骨髄細胞移植を行った。

ブタ・サル間腎移植では、Harvard大Gal-KOブタに加え、分担者長嶋が作出したGal-KOブタをドナーとする実験を促進し、(1)長嶋のGal-KOブタ腎、胸腺にGal抗原の発現がないことをIB4染色で組織学的に確認、(2)可溶性thrombomodulinを併用した免疫抑制療法により、移植後の蛋白尿が軽減されることを示唆する結果、(3)移植腎の生着延長に対する移植後導入期のT細胞除去の重要性を確認した。

異種間膵島移植では、平成21年度に成豚膵島でGal発現が乏しい点に着目したGal+クラウンミニブタ膵島移植で、当研究室で確立したHGFを中心とする新規免疫抑制療法を用い、大動物異種間膵島移植で国内初となる2カ月間の正常血糖維持という結果を得たが、更に3症例を加え同様の成績を得た。

ヒト CD47 遺伝子導入によるブタ・霊長類間免

疫制御においては、上記のごとく分担者大段らにより、ヒト CD47 分子を遺伝子導入することでマクロファージによる異種間食食作用が抑制されるとともに、異種間 T 細胞反応が軽減されることを確認しているが、本助成期間内でヒト CD47 遺伝子導入 (hCD47Tg) 細胞を用いた hCD47Tg ブタの作出には至らなかった。しかし代替手段として、骨髄細胞に hCD47 を導入したブタ骨髄をサルへ異種移植し、移植後 30 日の骨髄生検でブタ骨髄細胞生着 (ブタ CFU+) および移植後に抗ブタ抗体の産生を認めないことを確認した。

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 39 件) 10 編選択 (論文 2 の他は全て査読有)

*責任著者

(1) Wang C, Ohdan H*, et al. Human CD47 expression permits survival of porcine cells in immunodeficient mice that express SIRPα capable of binding to human CD47. *Cell Transplantation*, 2011 in press

(2) 山田和彦*、佐原寿史 異種移植
医学のあゆみ 237; 559-566, 2011

(3) Shimizu A*, Yamada K. Histopathology of xenografts in pig to non-human primate discordant xenotransplantation. *Clin Transplant*. 24; 11-15, 2010

(4) Hirakata A, Okumi M, Shimizu A, Yamada K* et al. Reversal of age-related thymic involution by an LHRH agonist in miniature swine. *Transpl Immunol* 24; 76-81, 2010

(5) Nagashima H*, Matsunari H, Umeyama K. Recent advances in production of genetically modified pigs for xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 17; 94-120, 2010

(6) Basnet NB, Ohdan H*, et al. Deficiency of N-glycolylneuraminic acid and Galα1-3Galβ1-4GlcNAc epitopes in xenogeneic cells attenuates cytotoxicity of human natural antibodies. *Xenotransplantation*. 17; 440-448, 2010

(7) Griesemer AD, Okumi M, Shimizu A, Yamada K*. Upregulation of CD59: Potential mechanism of accommodation in a large animal model. *Transplantation* 87; 1308-1317, 2009

(8) Matsunari H, Nagashima H*. Application of genetically modified and cloned pigs in translational research. *Journal of Reproduction and Development*.

55; 225-230, 2009

(9) Tahara H, Ide K, Basnet N.B, Ohdan H* et al. Immunological property of antibodies against N-glycolylneuraminic acid epitopes in cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-deficient mice. *Journal of Immunology*;184; 3269-3275, 2009

(10) Oku M, Okumi M, Sahara H, Yamada K* et al. Porcine CFSE mixed lymphocyte reaction and PKH-26 cell-mediated lympholysis assays. *Transplant Immunology*; 20; 78-82, 2008

〔学会発表〕(計 76 件) 10 件選択

(1) Yamada K. Life-Supporting GalTKO Swine Kidney Xenografts. 2010 Seoul Forum on Xenotransplantation 2010.11.20. Seoul, South Korea

(2) 山田和彦 遺伝子組換え異種臓器：独自の免疫寛容誘導療法による異種移植の臨床応用への試み 第 62 回日本泌尿器科学会西日本総会 2010.11.05. 鹿児島

(3) 山田和彦 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 第 46 回日本移植学会総会 2010.10.21. 京都

(4) Yamada K, Nishimura H, Sahara H. et al Hepatocyte Growth Factor regimen in a life supporting xenogeneic islet transplantation CLAWN miniature swine-to -cynomologous monkey model. XXIII International Congress of Transplantation Society 2010.08.19, Vancouver, Canada

(5) 山田和彦 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. 日本膵・膵島移植研究会 2010.03.12. 宇都宮

(6) Yamada K. Strategies to resolve the organ shortage: Xenotransplantation using transgenic/gene knockout technology ATC (American Transplantation Society) 2010. 2010.01.12 San Francisco

(7) Yamada K. Life Supporting Xenogeneic Islet Transplantation with a Regimen Including Hepatocyte Growth Factor in a CLAWN Miniature Swine-to-Cynomologous Monkey Model IPITA-IXA Joint Congress 2009.10.14 Venice, Italy

(8) 山田和彦. 異種移植. 第 44 回日本移植学会総会 2008.09.21 大阪市

(9) Yamada K. Life-Supporting GalTKO Swine Kidney Xenografts. XXII International Congress of The

Transplantation Society 2008.08.13. Sydney, Australia

(10) Kentaro I, Hideki O et al. Human CD47 on porcine antigen presenting cells have possibility of preventing T cell-mediated xenograft rejection through inhibitory signaling to SIRPα. XXII International Congress of The Transplantation Society. 2008.08.13. Sydney, Australia

〔図書〕(計 1 件)

Yamada K.

Living Donor Organ Transplantation (Editors: Rainer Gruessner, Enrico Benedetti) McGraw Hill, Medical 全 791 頁 分担 Chapter: Xenotransplantation 分担 748-759, 2007

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

大段 秀樹 (ODAN HIDEKI)
広島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：10363061

興津 輝 (OKITSU TERU)
京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号：10378672

長嶋 比呂志 (NAGASHIMA HIROSHI)
明治大学・農学部・教授
研究者番号：50318664
(H21-22 年度)

斎藤 敏樹 (SAITO TOSHIKI)
日本生物科学研究所附属実験動物研究所・主任研究員
研究者番号：00162214
(H20 年度)

佐藤 正宏 (SATO MASAHIRO)
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：30287099
(H19、H21 年度)

上村 亮三 (KAMIMURA RYOZO)

鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進センター・
准教授
研究者番号：30253884
(H19、H21 年度)

(3) 連携研究者

清水 章 (SHIMIZU AKIRA)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00256942

佐藤 正宏(SATO MASAHIRO)
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：30287099
(H20 年度)

上村 亮三 (KAMIMURA RYOZO)
鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進センター・
准教授
研究者番号：30253884
(H20 年度)

斎藤 敏樹 (SAITO TOSHIKI)
日本生物科学研究所附属実験動物研究所・
主任研究員
研究者番号：00162214
(H21 年度)