

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580411

研究課題名(和文) 選択用薬剤に依存しない遺伝子高発現細胞取得に基づく異種移植用クローンブタの作製

研究課題名(英文) Production of cloned genetically modified pigs by a new drug-free gene-modified cell isolation system

研究代表者

佐藤 正宏 (Sato, Masahiro)

鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・教授

研究者番号：30287099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：異種移植を可能とする遺伝子改変クローンブタを独自の手法を用いて作製することを目指し、移植関連遺伝子として  $\alpha$ -GalT、DAFやTMなどがあるが、 $\alpha$ -GalTは発現が無い方が望ましく、後者2つは過剰発現が望ましい。 $\alpha$ -GalTについては、 $\alpha$ -GalT遺伝子をKOしたブタ細胞株CRISPR-2-1(2-1)の作製に成功した。DAFやTMの過剰発現系については、独自に考案した選択用薬剤に依存しないpiggyBacを基本とした多遺伝子遺伝子導入系を用い、2-1に遺伝子導入を進めている。2-1の核移植によるブタ胚盤胞作製に成功しているため、遺伝子改変クローンブタ作製には後一歩のところまで来ている。

研究成果の概要(英文)：Our purpose of this study is to produce genetically modified piglets that are used for xenotransplantation.  $\alpha$ -GalT is known to synthesize  $\alpha$ -Gal epitope ( $\alpha$ -Gal), which is a causative for hyperacute rejection of pig grafts. We first disrupted the  $\alpha$ -GalT gene in porcine cells using a recently developed technology that allows efficient ablation of a target gene, and finally obtained a cell line called CRISPR-2-1 (2-1). DAF and TM are also known as key factors suppressing graft rejection. In order to deliver genes for these two factors into 2-1, we developed a novel system that does not require drug selection and also employed a piggyBac-based system that permits introduction of multiple transgenes. We are now constructing 2-1-based new cell lines that are able to express both DAF and TM in the absence of  $\alpha$ -Gal. The resulting cell line will be used for SCNT as donors to produce cloned piglets capable of expressing DAF and TM, but unable to express  $\alpha$ -Gal.

研究分野：発生工学、分子生物学分野

キーワード：クローンブタ 遺伝子導入 KO 遺伝子改変

### 1. 研究開始当初の背景

ブタは生理的にも臓器重量などの面からヒトに酷似するため、ブタからヒトへの異種移植用のブタの開発が世界規模で推進されている。その多くは、ブタ組織のヒトへの移植直後に起こる超急性移植拒絶 (HAR) を回避するための遺伝子改変ブタの開発である。即ち、ブタ細胞表面に発現される糖鎖 $\alpha$ -Gal エピトープ (HAR を引き起こす原因分子) が除かれた遺伝子改変ブタの開発である。これは、 $\alpha$ -Gal エピトープ合成酵素 $\alpha$ -GalT ( $\alpha$ -1,3-ガラクトース転移酵素) 遺伝子を KO (ノックアウト) するか、 $\alpha$ -Gal エピトープを消化するエンド $\beta$ ガラクトシダーゼ C (EndoGalC) 遺伝子を過剰発現させることにより達成される。一旦これら $\alpha$ -Gal エピトープ発現の無い遺伝子改変細胞が得られれば、その細胞をドナーとする体細胞核移植 (SCNT) により、異種移植用の遺伝子改変クローンブタ個体を作製することが出来る。しかしながら、古典的な gene targeting 法に基づく KO 法では、その種となる KO 細胞取得に相当な労苦 (長期間の培養、クローンの採取・拡大、細胞の特性解析など) が求められ、且つ、選択用薬剤使用による副作用 (具体的な機構は不明) も懸念される。

我々は EndoGalC を過剰発現する細胞から SCNT を通じ、異種移植対応の遺伝子改変クローンブタを作成しようと試みたが、薬剤で選別された遺伝子導入細胞は親株に比べ、増殖性が悪く、SCNT 後の胚の発生率も低い。選択用薬剤の細胞のポテンシャル (細胞が SCNT 後に個体までの発生を支える能力) に関してはまだ不明点があるが、長期間の薬剤処理による悪影響は十分考えられる。「できれば、選択用薬剤を用いず、遺伝子高発現細胞を取得すること」が望ましい。こにより、SCNT 胚の生存率が上がり、結果として、クローンブタの効率的生産が期待される。

### 2. 研究の目的

我々は過去の実験から、EndoGalC 遺伝子をブタ細胞内で過剰発現させると、非遺伝子導入細胞、遺伝子発現の低い細胞は、 $\alpha$ -Gal エピトープを特異的に識別するレクチン BS-I-B<sub>4</sub> (IB4) で染色されるが、遺伝子発現の強い細胞 (遺伝子高発現細胞) は IB4 による染色では非染であることを知った。即ち、EndoGalC の発現と $\alpha$ -Gal エピトープ発現は逆相関を示した (Akasaka et al., Xenotransplantation 17, 81-89, 2010)。そこで、 $\alpha$ -Gal エピトープ発現のない EndoGalC 高発現細胞のみを濃縮すべく、IB4 に毒素を結合させた市販の IB4SAP を EndoGalC 遺伝子導入後の細胞群に作用させた。 $\alpha$ -Gal エピトープ発現細胞は IB4 と結合するため、毒素を細胞内に取り込み、細胞は死滅したが、EndoGalC 発現の強い細胞 ( $\alpha$ -Gal エピトープ陰性) は IB4-SAP と結合せず、生存した。即ち、「IB4SAP を用いれば、選択用薬剤は用いずに外来遺伝子 (EndoGalC) を高発現する細胞を得ることが出来る」ことが判った。

この系 (targeted toxin-based negative

selection) をさらに延長し、多種遺伝子の同時導入、同時高発現を可能ならしめる新規の系を考えた。ブタ組織のヒトへの異種移植には、HAR 回避以外にも様々な移植関連遺伝子の発現が必要とされるからである。

今回、targeted toxin-based negative selection を用いた目的遺伝子高発現ブタ細胞の取得法の開発、次世代型 KO システムである CRISPR/Cas9 系と targeted toxin-based negative selection との組み合わせによる選択用薬剤を用いない簡便な $\alpha$ -GalT 遺伝子 KO ブタ細胞取得法の開発、トランスポゾンの一つ piggyBac 系と targeted toxin-based negative selection との組み合わせによる選択用薬剤を用いない簡便な多遺伝子導入ブタ細胞取得法の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

#### targeted toxin-based negative selection を用いた目的遺伝子高発現ブタ細胞の取得法の開発

先ず、systemic で強力な遺伝子発現を可能とする鶏 $\beta$ -actin promoter-base の CAG promoter の下流に EGFP cDNA (高発現させたい目的遺伝子) -IRES-EndoGalC 遺伝子-poly(A) 付加部位を有する pCEIEnd と名付けたベクターを作製する。IRES の存在により、このベクターからは、EGFP と EndoGalC の 2 種のタンパクが同時発現される。このベクターをブタ胎仔性繊維芽細胞 (PEF) に電気穿孔法を用いて遺伝子導入し、4-5 日目に細胞を回収。これを IB4SAP 液に懸濁し、短時間反応させる。その後、新鮮培地を含む培養皿に直接投じ、10 日間ほど培養する。この過程で、IB4SAP 結合細胞は死滅し、結合しなかった細胞は生存し、コロニーとなって増殖する。EndoGalC 高発現の結果、 $\alpha$ -Gal エピトープが細胞表面から消え、IB4SAP の存在下でも増え、且つ、EndoGalC 高発現であれば、EGFP も高発現になると期待される。

#### 次世代型 KO システムである CRISPR/Cas9 系と targeted toxin-based negative selection との組み合わせによる選択用薬剤を用いない簡便な $\alpha$ -GalT 遺伝子 KO ブタ細胞取得法の開発

CRISPR/Cas9 系は、目的遺伝子 (この場合、 $\alpha$ -GalT 遺伝子) の標的部位に Cas9 を誘導する guide RNA (この場合、 $\alpha$ -GalT 遺伝子の ATG 近傍の 20 bp 部分を標的部位として設定) 標的部位を切断する endonuclease Cas9 を発現するベクター-phCas9 が必要となる。PEF に guide RNA + phCas9 + pmaxGFP (遺伝子導入の成否を確認するモニター用ベクター) を電気穿孔法を用いて遺伝子導入し、導入後 4-5 日目に細胞を回収。これを IB4SAP 液に懸濁し、短時間反応。その後、新鮮培地を含む培養皿に直接投じ、10 日間ほど培養する。生じたコロニーを拡大し、 $\alpha$ -Gal エピトープ発現の不在、 $\alpha$ -GalT 遺伝子の変異の有無などを調

べる。また、当該細胞を SCNT に付し、発生した胚盤胞における $\alpha$ -Gal エピトープ発現の不在、 $\alpha$ -GalT 遺伝子の変異の有無なども検討する。

#### トランスポソンの一つ *piggyBac* 系と targeted toxin-based negative selection との組み合わせによる選択用薬剤を用いない簡便な多遺伝子導入ブタ細胞取得法の開発

*piggyBac* 系のベクターとして pT-EGFP (緑蛍光発現ベクター)、pT-tdTomato (赤蛍光発現ベクター) を用い、これらが同時に PEF に導入された場合、IB4SAP による細胞選別後、両遺伝子を高発現する細胞株が取得できるかどうかを検討する。先ず、上記 *piggyBac* 系のベクターを宿主染色体に挿入するための transposase 遺伝子と EndoGalC を同時に発現できるベクター pTranslEnd を構築する。即ち、CAG promoter + transposase 遺伝子 + IRES + EndoGalC 遺伝子 + poly(A) 付加部位から成る。PEF に pTranslEnd + pT-EGFP + pT-tdTomato を co-transfection させ、導入後 2 日目 (pTranslEnd がまだ「浮遊状態」にある時期) に細胞を回収。これを IB4SAP 液に懸濁し、短時間反応。その後、新鮮培地を含む培養皿に直接投じ、10 日間ほど培養する。生じたコロニーを拡大し、 $\alpha$ -Gal エピトープ発現、緑、赤蛍光の発現を確認する。この場合、pTranslEnd は宿主染色体に挿入されてはならず (従って、細胞は  $\alpha$ -Gal エピトープを発現する)、目的遺伝子である赤、緑蛍光遺伝子のみが宿主染色体に挿入されていることが望ましい。

#### 4. 研究成果

pCEIEnd を PEF に遺伝子導入し、その後、細胞を IB4SAP で処理し、選択用薬剤、薬剤耐性遺伝子不在下でも遺伝子高発現ブタ細胞の単離が可能かどうか、生じたコロニーの特性を評価したところ、得られたコロニーの多くは、目的遺伝子である EGFP を強力に発現していた。いわゆる、遺伝子高発現細胞株の高率取得に成功した。EGFP から目的遺伝子を lacZ 遺伝子に代えても、同様の結果が得られた。この結果、targeted toxin-based negative selection を用いた目的遺伝子高発現ブタ細胞の取得という新規な方法の妥当性が証明された (Sato et al., *Biology* 2, 341-355, 2013)。

CRISPR/Cas9 系成分を PEF に導入後、細胞を IB4SAP で処理して得られたコロニーの大半 (80%以上) は IB4 染色に対し陰性であり、 $\alpha$ -GalT 遺伝子に関して双方の allele が KO されたいわゆる biallelic KO であることが推定された。幾つかのコロニーからゲノム DNA を精製し、PCR で増幅された断片を sequencing に付すと、 $\alpha$ -GalT 遺伝子の deletion mutation が見られ、アミノ酸のフレームシフトが起こっていた。次いで、この

ような  $\alpha$ -Gal epitope 陰性細胞を SCNT に付し、発生した胚盤胞について  $\alpha$ -Gal epitope 発現の有無を蛍光標識 IB4 染色で検討すると、予想通り、陰性であった (Sato et al., *Xenotransplantation* 21, 291-300, 2014)。以上から、CRISPR/Cas9 と targeted toxin-based negative selection とを絡めた選択用薬剤を用いない細胞選別法は、ブタ細胞で標的遺伝子の biallelic KO を誘導するのに非常に有効であることが判明した。

外来性遺伝子の導入効率が頗る高いとされる *piggyBac* を targeted toxin-based negative selection 系に絡め、効率性が高く、且つ選択用薬剤に依存しない多遺伝子同時高発現細胞の取得法を考案し、その有効性を検討した結果、期待通り、効率良く、多遺伝子同時高発現細胞株取得に成功した (Sato et al., *Biotechnology Journal* 10, 143-153, 2015)。これにより、ブタ細胞のゲノムに異種移植拒絶を抑える多種の遺伝子を同時に挿入でき、しかも多種の遺伝子を内蔵する細胞を薬剤選択用遺伝子の導入なくして調製できる見通しがついた。現在、3 種類の異種移植拒絶関連遺伝子をこの系を用いて導入しようと研究を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 32 件)

1. Ohtsuka M, Miura H, Mochida K, Hirose M, Hasegawa A, Ogura A, Mizutani R, Kimura M, Isotani A, Ikawa M, Sato M, Gurumurthy CB: One-step generation of multiple transgenic mouse lines using an improved Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis (i-PITT). *BMC Genomics* 16, 274, 2015 doi:10.1186/s12864-015-1432-5. (査読有)
2. Kitaji H, Ookutsu S, Sato M, Miyoshi K: A new rolling culture-based in vitro fertilization system capable of reducing polyspermy in porcine oocytes. *Animal Science Journal*, 86, 494-498, 2015 doi: 10.1111/asj.12327. (査読有)
3. Sato M, Inada E, Saitoh I, Matsumoto Y, Ohtsuka M, Miura H, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: A combination of targeted toxin technology and the *piggyBac*-mediated gene transfer system enables efficient isolation of stable transfectants in nonhuman mammalian cells. *Biotechnology Journal* 10, 143-153, 2015 DOI: 10.1002/biot.201400283. (査読有)
4. Miyazaki T, Ikeda Y, Kubo I, Suganuma S, Fujita N, Itakura M, Hayashi T, Takabayashi S, Katoh H, Ohira Y, Sato M, Noguchi M, Tokumoto T: Identification of genomic locus responsible for experimentally induced testicular teratoma 1 (ett1) on mouse Chr 18. *Mammalian Genome* 25, 317-326, 2014 doi:

10.1007/s00335-014-9529-8. ( 査読有 )

5. Sakurai T, Watanabe S, Kamiyoshi A, Sato M and Shindo T: A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. *BMC Biotechnology* 14, 69, 2014 doi:10.1186/1472-6750-14-69 ( 査読有 )

6. Watanabe S, Haraguchi S, Nakamura S, Sakurai T, Mugikura S, Kajiwara K, Minoiru K, Sato M: Novel cancer vaccination system based on human endo- $\beta$ -N-Acetyl glucosaminidase gene delivery. *Journal of Glycobiology* 3, 1 (2014) <http://dx.doi.org/10.4172/2168-958X.1000106> ( 査読有 )

7. Sato M, Miyoshi K, Nagao Y, Nishi Y, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: The combinational use of CRISPR/Cas9-based gene editing and targeted toxin technology enables efficient biallelic knockout of the  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase gene in porcine embryonic fibroblasts. *Xenotransplantation* 21, 291-300, 2014 DOI: 10.1111/xen.12089 ( 査読有 )

8. Nakamura S, Maehara T, Ishihara M, Sato M: Liver lobe- and strain-difference in gene expression after hydrodynamics-based gene delivery in mice. *Animal Biotechnology* 26, 51-57, 2015 doi: 10.1080/10495398.2014.886583. ( 査読有 )

9. Sato M, Inada E, Saitoh I, Matsumoto Y: An efficient and convenient method for MiniPrep analysis of recombinant plasmids. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 7, 105-107, 2014 DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2014.73013> ( 査読有 )

10. Murakami T, Saitoh I, Inada E, Kurosawa M, Iwase Y, Noguchi H, Terao Y, Yamasaki Y, Hayasaki H, Sato M: STO feeder cells are useful for propagation of primarily cultured human deciduous dental pulp cells in view of elimination of contaminated bacteria and promotion of cellular outgrowth. *Cell Medicine* 6, 75-81, 2013 DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/215517913X674234> ( 査読有 )

11. Sato M, Inada E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: Site-targeted non-viral gene delivery by direct DNA injection into the pancreatic parenchyma and subsequent in vivo electroporation in mice. *Biotechnology Journal* 8, 1355-1361, 2013 DOI:10.1002/biot.201300169 ( 査読有 )

12. Ohtsuka M, Miura H, Hayashi H, Nakaoka H, Kimura M, Sato M, Gurumurthy CB, Inoko H:

Improvement of pronuclear injection-based targeted transgenesis (PITT) by iCre mRNA-mediated site-specific recombination. *Transgenic Research* 22, 873-875, 2013 DOI:10.1007/s11248-013-9703-x ( 査読有 )

13. Nakamura S, Maehara T, Watanabe S, Ishihara M, Sato M: Improvement of hydrodynamics-based gene transfer of nonviral DNA targeted to murine hepatocytes. *BioMed Research International*, Article ID 928790, 9, 2013 doi: [10.1155/2013/928790](https://doi.org/10.1155/2013/928790) ( 査読有 )

14. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: Targeted toxin-based selectable drug-free enrichment of mammalian cells with high transgene expression. *Biology* 2, 341-355, 2013 DOI:10.3390/biology2010341 ( 査読有 )

15. Sato M, Maeda S, Inada E, Saitoh I, Kubota N: Mosaic expression of pluripotency-related proteins Oct-3/4 and alkaline phosphatase in human pancreatic carcinoma cell PANC-1. *Advanced Studies in Biology* 5, 157-172, 2013 <http://www.doaj.org/doaj?func=issueTOC&isId=150538&uiLanguage=en> ( 査読有 )

16. Sato M, Kubota N, Inada E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: Hela cells consist of two cell types, as evidenced by cytochemical staining for alkaline phosphatase activity: A possible model for cancer stem cell study. *Advances in Stem Cells* Article ID 208514, 15, 2013 DOI:10.5171/2013.208514 ( 査読有 )

17. Miura H; Inoko H; Inoue I; Okada Y; Tanaka M; Sato M; Ohtsuka M: piggyBac-mediated generation of stable transfectants with surface HLA expression from a small number of cells. *Analytical Biochemistry* 437, 29-31, 2013 doi: 10.1016/j.ab.2013.02.003. ( 査読有 )

18. Ohtsuka M, Miura H, Sato M, Kimura M, Inoko H, Gurumurthy CB: PITT: Pronuclear injection-based targeted transgenesis, a reliable transgene expression method in mice. *Experimental animals* 61, 489-502, 2012 DOI :10.1538/expanim.61.489 ( 査読有 )

19. Sato M, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S, Yasuoka Y: Functional recovery of a whole ovary transplanted into syngenic testis in mice. *Cloning & Transgenesis* 1, 102, 2012 doi: 10.4172/2168-9849.1000102 ( 査読有 )

20. Nakamura S, Takikawa M, Ishihara M, Nakayama T, Kishimoto S, Isoda S, Ozeki Y, Sato M, Maehara T: Delivery system for autologous growth factors fabricated with low-molecular-weight heparin and protamine to

- attenuate ischemic hindlimb loss. *Journal of Artificial Organs* 15, 375-385, 2012 doi: 10.1007/s10047-012-0658-0. ( 査読有 )
21. Nakamura N, Ishihara M, Takikawa M, Kishimoto S, Isoda S, Fujita M, Sato M, Maehara T: Attenuation of limb loss in an experimentally induced hindlimb ischemic model by FGF-2/ F/P MPs as a delivery system. *Tissue Engineering Part A* 18, 2239-2247, 2012 doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0741. ( 査読有 )
22. Ohtsuka M, Miura H, Gurumurthy CB, Kimura M, Inoko H, Yoshimura S, Sato M: Fluorescent transgenic mice suitable for multi-color aggregation chimera studies. *Cell and Tissue Research* 350, 251-260, 2012 doi: 10.1007/s00441-012-1470-0. ( 査読有 )
23. Saitoh I, Sato M, Iwase Y, Akasaka E, Yamasaki Y, Noguchi H: Generation of a set of mouse STO feeder cell lines that confer resistance to several types of selective drugs. *Cell Medicine*, 3, 97-102, 2012 DOI:http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639414 ( 査読有 )
24. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: A simplified protocol for the semi-large scale recovery of plasmids from *Escherichia coli* grown on agar plates. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 5, 406-408, 2012 DOI:org/10.4236/jbise.2012.57051. ( 査読有 )
25. Ohnami N, Nakamura A, Miyado M, Sato M, Kawano N, Yoshida K, Harada Y, Takezawa Y, Kanai S, Ono C, Takahashi Y, Kimura K, Shida T, Miyado K, Umezawa A: CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biology Open*, 1, 640-647, 2012 DOI:10.1242/bio.20121420( 査読有 )
26. Abe K, Araki K, Tanigawa M, Semba K, Ando T, Sato M, Sakai D, Hiyama A, Mochida J, Yamamura K-I: A Cre knock-in mouse line on the *Sickle tail* locus induces recombination in the notochord and intervertebral disks. *Genesis*, Article first published online, 50, 758-765, 2012 DOI:10.1002/dvg.22035 ( 査読有 )
27. Sato M, Ohtsuka M, Miura H, Miyoshi K, Watanabe S: Determination of the optimal concentration of several selective drugs useful for generating multi-transgenic porcine embryonic fibroblasts. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 759-765, 2012 DOI:10.1111/j.1439-0531.2011.01964.x ( 査読有 )
28. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Watanabe S: *In vivo* gene transfer in mouse preimplantation embryos after intraoviductal injection of plasmid DNA and subsequent *in vivo* electroporation. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, Posted online on, 58, 275-287, 2012 DOI:10.3109/19396368.2012.688088. ( 査読有 )
29. Chi H., Shinohara M., Yokomine T., Sato M, Takao S., Yoshida M., Miyoshi K: Successful suppression of endogenous  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase expression by RNA interference in pig embryos generated *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*, 58, 69-76, 2012 DOI:http://dx.doi.org/10.1262/jrd.10-165M ( 査読有 )
30. Chi H, Sato M, Yoshida M, Miyoshi K: Expression analysis of a  $\alpha$ -1, 3-galactosyltransferase, an enzyme that creates xenotransplantation-related  $\alpha$ -Gal epitope, in pig preimplantation embryos. *Animal Science Journal*, 83, 88-93, 2012 DOI:10.1111/j.1740-0929.2011.00964.x. ( 査読有 )
31. Ohtsuka M, Miura H, Nakaoka H, Kimura M, Sato M, Inoko H: Targeted transgenesis through pronuclear injection of improved vectors into *in vitro* fertilized eggs. *Transgenic Research*, 21, 225-226, 2012 DOI:10.1007/s11248-011-9505-y. ( 査読有 )
32. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Watanabe S: Development of a technique for efficient gene transfer to antral follicular cells in the mouse ovary. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58, 136-141, 2012 DOI:10.3109/19396368.2012.656796. ( 査読有 )
- [ 学会発表 ] ( 計 16 件 )
1. Soda M, Saitoh I, Inada E, Murakami T, Iwase Y, Kubota N, Sawami T, Matsumoto Y, Yamasaki Y, Hayasaki H, Ohshima H, Sato M: piggyback transposon mediated gene delivery efficiently generates stable transfectants from HDDPCs and HDDPC derived iPSCs. IADR, Boston, USA, 11-14 March, 2015
2. 渡部聡、桜井敬之、中村伸吾、梶原景正、木村穰、佐藤正宏、EndoGalC と targeted toxin法の組み合わせを用いたCRISPR系でノックアウトされた遺伝子改変細胞濃縮法の開発、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日 ~ 27 日、パシフィコ横浜 ( 神奈川県横浜市 )
3. 高橋剛、三浦浩美、佐藤正宏、大塚正人、電気穿孔法によるマウス 2 細胞期胚への RNA 導入法の開発と CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術への応用、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日 ~ 27 日、パシフィコ横浜 ( 神奈川県横浜市 )

4. 佐藤正宏、稲田絵美、齋藤一誠、松本祐子、大塚正人、三浦浩美、中村伸吾、桜井敬之、渡部聡、標的細胞破壊法と piggyBac の組み合わせは遺伝子導入安定株の効率的取得を可能とする、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日～27 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
5. Sato M, Kagoshima A, Saitoh I, Inada E, Miyoshi K, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: Efficient generation of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase-deficient porcine embryonic fibroblasts by CRISPR/Cas9-mediated knock-in system. The Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations (AFLAS) Congress, Loyal Chulan Hotel, Kuala Lumpur, Malaysia, 11 - 12 Nov, 2014
6. 佐藤正宏、郡山 実優、三好和睦、大塚正人、中村伸吾、桜井敬之、渡部聡、ブタにおける CRISPR/Cas9, targeted toxin 法を用いた multiple constructs の標的遺伝子導入システムの開発、第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014 年 8 月 21 日～24 日、帯広畜産大学（北海道帯広市）
7. 大塚正人、三浦浩美、磯谷綾子、伊川正人、佐藤正宏、木村穰、C57BL/6N を遺伝的背景に持つターゲットトランスジェニック用種マウスの作製と評価、日本実験動物科学技術さっぽろ 2014(第 61 回実験動物学会総会)、2014 年 5 月 15 日～17 日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）
8. 佐藤正宏、三好和睦、長尾洋三、西洋平、大塚正人、中村伸吾、桜井敬之、渡部聡、次世代型 KO システムである CRISPR/Cas9 を用いた異種移植用クローンブタ作製の試み、第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日～18 日、鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島県鹿児島市）
9. Murakami T, Saitoh I, Iwase Y, Inada E, Mastuyama J, Ohshima H, Hayasaki H, Sato M: Multipotency of juvenile human buccal epithelial cells. AADR, North Carolina, USA, 19-20 March, 2014
10. 渡部 聡、梶原景正、麥倉真一郎、桜井敬之、中村伸吾、木村穰、佐藤正宏：gcr2 タンパクは糖鎖を介して I 型 BMP 受容体と結合しシグナル伝達制御に関与する、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日～6 日、神戸ポートアイランド（神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル）（兵庫県神戸市）
11. 佐藤正宏、三好和睦、長尾洋三、西洋平、大塚正人、中村伸吾、桜井敬之、渡部聡：RISPR/Cas9 による遺伝子編集と標的毒素法との組み合わせは、 $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase 遺伝子を完全に KO したブタ胎仔性線維芽細胞の効

率的作製に有効である

第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日～6 日、神戸ポートアイランド（神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル）（兵庫県神戸市）

12. 中村伸吾、前原正明、渡部聡、石原雅之、佐藤正宏：ハイドロダイナミクスに基づく生体内遺伝子導入における外来遺伝子発現のマウス系統差および肝臓ローブ間の差、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日～6 日、神戸ポートアイランド（神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル）（兵庫県神戸市）

13. Tada N, Kanai F, Nakamura E, Lu H, Saito M, Sato M: Syngenic grafting of a whole male juvenile gonadal tissue into the adult testes confers successful spermatogenesis in mice. The 3rd World Congress of the International Society for Fertility Preservation, Malia Valencia Hotel, Valencia, Spain, 7-9 November, 2013

14. 郡山美優、稲田絵美、齋藤一誠、三浦浩美、大塚正人、中村伸吾、桜井敬之、渡部聡、三好和睦、佐藤正宏、トランスポゾン PiggyBac システムによる複数遺伝子のブタ細胞への同時導入、第 106 回日本繁殖生物学会、2013 年 9 月 12 日～14 日、東京農工大学農学部府中キャンパス（東京都府中市）

15. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Watanabe S, Attempts to produce transgenic mice by a novel in vivo method, as an alternative to the pre-existing pronuclear microinjection- based transgenesis., 11th Transgenic Technology Meeting, Baiyun International Convention Center, Guangzhou City, China, 25-27 Feb, 2013

16. 佐藤正宏、赤坂恵理、齋藤一誠、大塚正人、渡部聡：マウス成熟卵細胞への生体内遺伝子導入法の開発、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日～14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡（福岡県福岡市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）  
取得状況（計 0 件）

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐藤 正宏 (SATO, Masahiro)  
鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・教授  
研究者番号：30287099

##### (2) 研究分担者

三好 和睦 (MIYOSHI, Kazuchika)  
鹿児島大学農学部 生物生産学科・教授  
研究者番号：70363611