

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293279

研究課題名(和文) 膵ランゲルハンス島移植時の適切な移植部位が探索できるクローンブタの作出とその応用

研究課題名(英文) A transgenic-cloned pig model expressing fluorescent or non-fluorescent modified Plum gene for the evaluation of islet transplantation

研究代表者

長屋 昌樹 (Masaki, Nagaya)

明治大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：90329300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病患者に対する治療、膵ランゲルハンス島(膵島)移植には、移植した膵島の絶対的な生着率の低さという問題がある。膵島移植はその約90%が門脈経由-肝臓内移植で行われるが、この移植法では、膵島への酸素供給量の低下、細胞間の相互作用の消失等、様々な問題が発生する。新たに適切な移植先、方法を見出さない限り、膵島の生着率の低さという問題は克服できない。本研究は蛍光蛋白を発現する個体と、その変異体である非蛍光化蛋白を発現する2個体のトランスジェニックブタを体細胞クローン技術で作出し、膵島の適切な移植部位の探索ができるモデルの構築を目的とした。2個体間は免疫寛容となり移植場所の探索に有用である。

研究成果の概要(英文)：A problem with pancreatic islet transplantation for type-1 diabetes patients is the low engraftment rate of islets in the recipient. About 90% of islet transplantations are carried out by intrahepatic transplantation through the portal vein, but a variety of problems occur with this method. Frequent transplants necessary for insulin therapy withdrawal because overcoming the serious problem of transplanted islets will be impossible until new, appropriate transplant method is discovered. If two individual pigs- one that expresses fluorescent proteins, and one that expresses mutated non-fluorescent forms of these proteins- are generated using somatic cell cloning technology, the recipient pig will become immunotolerant to the donor pancreatic islet. This research was undertaken to generate such pigs and to determine appropriate sites for transplantation of islet transplantation.

研究分野：一般外科学

キーワード：膵ランゲルハンス島 トランスジェニックブタ 膵島移植 拒絶

## 1. 研究開始当初の背景

インスリン依存状態の1型糖尿病患者の治療として、生活の質を改善させるべく膵ランゲルハンス島(以下、膵島)移植療法がある。インシュリン注射からの離脱が期待される療法であったが、移植5年後でインシュリンを必要としない患者はわずか7.5%であった(Diabetes. 2005; 54:2060-9.)。インスリンの離脱には2~3度の移植を受けているのが現状である(Curr Diab Rep. 2011;11;364-74)。数回の膵島移植を余儀なくされる原因に、移植した膵島の絶対的な生着率の低さがあり、これは深刻な問題となっている。膵島移植では約90%が門脈経由-肝臓内移植で行われるが、この移植法でおこる大きな問題としてinstant blood mediated inflammatory reaction (IBMIR)があるほか、膵島に供給される酸素の低下、膵島の血管床の減少、上皮細胞との細胞間の相互作用の消失、代謝機能の抑制、エピジェネティックな変化が起こるなど、様々な問題点が挙がってきている。(Diabetes. 2007. 56:1544-1550., Curr Diab Rep. 2010.10: 332-337)。これらがインスリン離脱には複数回の移植が必要となる原因で、新たに適切な移植先、方法を見出さない限り、移植した膵島の生着率の低さという問題は克服できない。

## 2. 研究の目的

蛍光蛋白を発現する個体と、その蛍光蛋白の変異体である非蛍光化蛋白を発現する2種類のトランスジェニック(tg)クローンブタをsomatic cell nuclear transfer (SCNT)で作出すれば、蛍光蛋白<sup>+</sup>のドナー細胞が非蛍光蛋白<sup>+</sup>のレシピエントとなる個体に移植されても、レシピエントブタの体内でドナー細胞は免疫寛容となり、移植後の細胞の挙動を正確に評価できる。2個体間の膵島移植にて、新たな移植先、方法を探索できるシステムを、また、膵島の関連遺伝子を用い、移植した膵島に対するエピゲノムによる解析にて、移植が膵島

にもたらす影響を評価できるシステムの構築を目的とした。

## 3. 研究の方法

(A) 長波長の赤紫蛍光蛋白の monomeric Plum (Plum)を発現する tg クローンブタの作出 (B) 非蛍光化蛋白である変異型 Plum (変異型 Plum)を発現する tg クローンブタの作出 (C) Plum、変異型 Plum、いずれの蛋白も発現しないクローンブタの作出 (D) 移植後、細胞がもつ蛍光蛋白が抗原となるか否かの評価 (E) 膵島の関連遺伝子を用い、移植した膵島に対するエピゲノムによる解析にて、移植が膵島にもたらす影響を評価できるシステムの構築の試み、を行った。また、オプションとして以下を追加した。門脈経由-肝臓内移植以外の方法を探索する一助として、(F) ブタにいくつかの生体適合性バイオマテリアルを移植し、バイオマテリアルが膵島移植の足場になるか否かを検証した。

(A, B) Plum 蛋白、あるいは変異型 Plum を発現する tg クローンブタを SCNT で作出; ドナーとなる細胞が蛍光蛋白を発現する場合は、蛍光。蛋白がレシピエント体内で抗原となり、拒絶反応を起こす可能性がある(Immunology Letters. 2009: 123; 103-113)。移植時のこの問題を回避するために、蛍光蛋白を発現する tg クローンブタと、その変異体である非蛍光化蛋白を発現する tg クローンブタの2種類を SCNT で作出した。本研究には蛍光蛋白として Plum 蛋白を選択した。Plum 蛋白は DsRed の変異体である monomeric RFP1 の突然変異により誘発された最大励起波長 590 nm、最大蛍光波長 649 nm の長波長の遠赤色蛍光蛋白である。また、Plum 蛋白の抗原性を保ちながら、蛍光を発光しない変異型 Plum 蛋白を発現させるには、最小限のアミノ酸置換により発色団(chromophore)の構造を破壊する必要がある。Plum の発色団を構成するアミノ酸 (Met<sup>67</sup>-Tyr<sup>68</sup>-Gly<sup>69</sup>)のうち、Tyr<sup>68</sup> は n 共役系構造を形成するのに必須のアミノ酸である。

著者らはこの 68 番目を Glycine に置換して、蛍光を発光しない変異型 Plum(PlumY68G)を作製した。a) CAG promoter (Cytomegalovirus enhancer と Chicken  $\beta$ -actin promoter をつなげた構造)下に Plum 遺伝子、あるいは変異型 Plum 遺伝子を組み込んだベクターをそれぞれ構築、b) 共通の *porcine fetal fibroblasts (PFF)* にそれぞれの遺伝子をエレクトロポレーション法により導入、Plum 蛋白を発現、あるいは変異型 Plum 蛋白を発現し核ドナー細胞となるセルラインを完成。c) これらをそれぞれ核ドナー細胞とし、SCNT により tg クローンブタの作出を行った。

(C) Plum 蛋白、変異型 Plum いずれの蛋白も発現しない tg クローンブタを SCNT で作出; いずれの蛍光蛋白も導入していない PFF も核ドナー細胞とし、SCNT により tg クローンブタの作出を行った。

(D) i) Plum-PFF、ii) 変異型 Plum-PFF、iii) C の作出の際に核ドナーとして用いたいずれの遺伝子も導入していない PFF、これら 3 種類を C で作出したクローンブタに移植すれば蛍光蛋白が拒絶の原因となるか否かが判明する。C で作出した 2 匹のクローンブタをレシピエントとし、i- iii) それぞれの細胞を皮下に移植した。移植後、1wk、3wks に移植部を取り出し、Plum 遺伝子に対する polymerase chain reaction (PCR)と病理組織学的手法により拒絶の有無を検証した。iii)の PFF は蛍光蛋白を持たないため、発色基質である蛍光クロロメチル誘導体 CellTracker™ CM-DiI Dye(Invitrogen)で標識させた後に移植を行った。

(E) 移植後の膵島に対する検証は、レシピエント内での膵島の変化を短時間で捕られることが望ましい。膵島に関連する遺伝子を用い、移植した膵島に対しエピジェネティックスの解析を行うことにより、生体内で膵島が起こす変化を推測できる可能性がある (Pancreas. 2015;44:778-85.)。膵 細胞の転写因子である、

NeuroD、paired-box -containing gene (*Pax*)-4、6、Pancreatic and duodenal homeobox 1 (*Pdx1*)をはじめとしたいくつかの遺伝子を選択し、これらの遺伝子のエピゲノムの変化が本仮説を裏付けるかを *Bisulfite genomic sequencing*法を用いて、エピゲノム解析を用いた膵島機能の変化を解析できるシステムの構築を試みることにした。

(F) IBMIRを防ぐ可能性は、門脈経由-肝臓内への膵島の移植法以外の方法を選択することである。血管内に移植しない場合を想定し、ブタにいくつかのバイオマテリアルを移植し、膵島移植の足場になるかを検証した。アルギン酸ナトリウム、あるいはこれに生体適合性の高い物質を添加したバイオマテリアルの 5 種類を選択した。ブタの筋膜内にこれらを移植し、1週間後に摘出、病理組織学的に生体適合性を検証した。

#### 4. 研究の成果

Plum 蛋白を発現する個体は全身に Plum 蛍光を発し(図 1)、各組織においても安定した蛍光を発現した(J Reprod Dev. 2015;61:169-77. に報告)。SCNT による Tg クローン動物の作出では、一度作出したクローン胎仔由来の線維芽細胞を核ドナー細胞に用いて連続的にクローニングを実施すること(リクローニング)により、効率的に産仔を獲得できることが報告されている (Mol Reprod Dev. 2008;75:1372-8., Cell Stem Cell. 2012;10:753-8.)。本研究においても、Plum 蛋白、あるいは変異型 Plum 蛋白を発現する tg クローンブタの作出には共にリクローニングを行っている。変異型 Plum 蛋白を発現するブタの作出は困難を極めた。まず、変異型 Plum 蛋白を発現する PFF を核ドナー細胞とし、SCNT にて変異型 Plum 蛋白を発現する個体の作出を行った。8 頭の胎仔を確保し、この中でリクローニングのための核ドナー細胞となりうる胎仔の選定を行った。8 頭の Tg クローン胎仔の PFF に対して抗 Plum 抗体を

用いたウエスタンブロッティング解析を行った結果、変異型 Plum-2 のみ陽性であった。抗 Plum 抗体が陰性であった原因の検証として、胎仔由来の線維芽細胞の CAG プロモーター領域に対する DNA のメチル化解析を行った。変異型 Plum-6, -7, -8 は高メチル化状態であった。他の 4 頭の胎仔において、ウエスタンブロッティング解析で抗 Plum 抗体が陰性であった理由は、現在、明確ではない。今後はヒストンのアセチル化解析や導入した遺伝子の位置を確認するための fluorescence in situ hybridization (FISH) 解析の検証を行う予定としている。変異型 Plum-2 から樹立した線維芽細胞 (Neo PlumY68G-PFFs) を用いた再度の SCNT による産仔の作出では、産仔作出効率は Plum 蛋白を発現する tg クローンブタの作出時とほぼ同等であったが、獲得した 4 頭はすべて死産仔であった。死産仔ではあったものの変異型 Plum 蛋白を発現していたか否かの検証を行った結果、1. 蛍光顕微鏡にていずれの組織においても Plum 蛋白の蛍光は陰性、2. PFF に対するウエスタンブロッティング解析にて抗 Plum 抗体に陽性、3. 免疫組織染色を行った心臓、腎臓は抗 Plum 抗体に陽性、4. フローサイトメトリーによるリンパ球の解析で抗 Plum 抗体に陽性、であった。これらから死産仔が変異型 Plum 蛋白を発現していたことを証明した(図. 2、現在、投稿中)。

一般に、ゲノムに導入された遺伝子数が多い場合、導入された遺伝子の発現量が高まり、細胞の増殖や個体の成長に影響をもたらすことが知られている (Plos One. 2009;4:e6679.)。キメラ胚を構築して変異型 Plum tg クローンブタの作出を試みたが、死産に終わった。次なる展開はドナー細胞の変更と、導入する変異型 Plum 遺伝子を低コピーにする工夫となる。ブタは妊娠から出産まで 115 日を要する他、細胞、妊娠までの準備期間を入れると一回の妊娠がおおよそ 1 年の

Project となるため、上記は今後の課題となる。

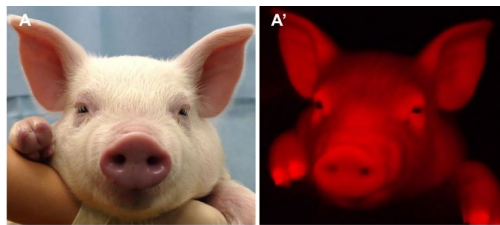


図 1 . Monomeric Plum を発現するトランスジェニッククローンブタ

変異型 Plum 蛋白を発現する tg クローンブタの作出に並行し、2015年度からは、蛍光蛋白を発現する細胞を移植した場合、蛍光蛋白が拒絶の原因になるか否かの検証と、脾島の門脈経由-肝臓移植の代わりとなる移植法の探索を行った。蛍光蛋白を発する細胞はいずれもレシピエント内で拒絶されることを、PCR法、病理組織学的検証にて確認した。移植3wks後、レシピエント内で移植した細胞は認められず、著者らは生体適合性の高いバイオマテリアルを選択し、2頭のブタの筋肉内への埋め込みを行った後の生体内での反応を検証する試みから始めた。移植1週間後、バイオマテリアルの埋め込み部は認識可能で、マテリアルの取り出しも容易であった。

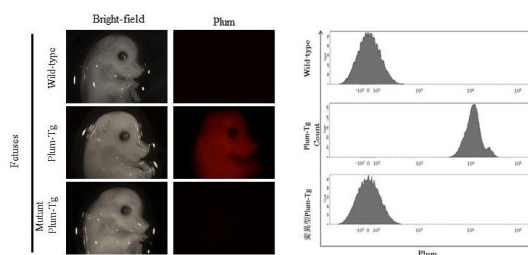


図2 . Monomeric Plum、非蛍光化蛋白である変異型 Plum を発現する tg クローンブタの胎仔とそれぞれの線維芽細胞に対し抗 Plum 抗体を用いたフローサイトメトリー解析

組織学的所見は、バイオマテリアル周囲に炎症細胞の高度な浸潤を認めた。選択したバイオマテリアルではマテリアル内に脾島を収容して移植を行うことは困難と結論づけた。脾島の機能、移植の影響を短期間で評価するに

は、豚島に関連する遺伝子を用い、移植した豚島に対するエピゲノム解析が有用な可能性がある(申請者ら: 特願2014-027655)。しかしながら、ブタの遺伝子の多くは既存のゲノム情報が不完全であり、ゲノムワイドな解析が困難である事に直面した。一方、分担者の検討では、エピジェネティック制御は種を超えて保存された遺伝子の発現調節機構で、動物間においても相同性を確認出来る場合が多いことを導いた(投稿準備中)。現在、ゲノム情報が豊富なマウス、ヒトの情報を用いて、ブタの豚島に関連する遺伝子のエピジェネティック制御を検証する手法に切り替えシステム構築を行い始めた。

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 5 件)

1. Nagaya M, Arai Y, Matsunari H, Honda M, Nakano K, Maehara M, Sugimoto N, Kobayashi M, Sakai R, Asano Y, Watanabe M, Umeyama K, Nagashima H. A New System to Evaluate the Influence of Immunosuppressive Drugs on Pancreatic Islets Using Epigenetic Analysis in a 3-Dimensional Culture. *Pancreas*. 2015;44:778-85. 査読有。
2. Watanabe M, Kobayashi M, Nagaya M, Matsunari H, Nakano K, Maehara M, Hayashida G, Takayanagi S, Sakai R, Umeyama K, Watanabe N, Onodera M, Nagashima H. Production of transgenic cloned pigs expressing the far-red fluorescent protein monomeric Plum. *J Reprod Dev*. 2015;61:169-77. 査読有。
3. Hoang DT, Matsunari H, Nagaya M, Nagashima H, Millis JM, Witkowski P, Periwal V, Hara M, Jo J. A conserved rule for pancreatic islet organization. *PLoS One*. 2014;9:e110384. 査読有。
4. Matsunari H, Kobayashi T, Watanabe M,

Umeyama K, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Nagaya M, Hara M, Nakauchi H, Nagashima H. Transgenic pigs with pancreas specific expression of green fluorescent protein. *J Reprod Dev*. 2014;60:230-7. 査読有。

5. Umeyama K, Honda K, Matsunari H, Nakano K, Hidaka T, Sekiguchi K, Mochizuki H, Takeuchi Y, Fujiwara T, Watanabe M, Nagaya M, Nagashima H. Production of diabetic offspring using cryopreserved epididymal sperm by in vitro fertilization and intrafallopian insemination techniques in transgenic pigs. *J Reprod Dev*. 2013; 59: 599-603. 査読有。

〔学会発表〕(国際学会 4 件、国内学会 2 件、計 12 件)

(国際学会)

1. Matsunari H, Watanabe M, Nakano K, Uchikura A, Asano Y, Umeyama K, Yamaguchi T, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H. Blastocyst complementation restore apancreatic phenotype of pdx1 pigs. In: International Society for Stem Cell Research 2015 Annual Meeting: 24-27 Jun 2015; Stockholm, Sweden.
2. Kobayashi M, Watanabe M, Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Hayashida G, Matsumura Y, Kuramoto M, Sakai R, Arai Y, Umeyama K, Watanabe N, Onodera M, Nagaya M, Nagashima H. Generation and characterization of transgenic-cloned pigs expressing the far-red fluorescent protein monomeric plum. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.
3. Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Sakai R, Watanabe M, Umeyama K, Kobayashi T, Yamaguchi T, Shiota A, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H. Generation of a

double-transgenic pig with pancreas-specific green and liver-specific red fluorescence.

39th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society. Jan 19-22, 2013; Hannover, Germany.

4. Nakano K, Watanabe M, Matsunari H, Matsuda T, Honda K, Maehara M, Kanai T, Hayashida G, Kobayashi M, Umeiyama K, Fujishiro S, Mizukami Y, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H. Production of chimeric porcine fetuses by aggregation method using parthenogenetic embryos. 39th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Jan 19-22, 2013; Hannover, Germany.

(国内学会)

1. 畑江将太, 中野和明, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 浅野吉則, 武石透輝, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: プタにおけるキメラ胚の発達動態. In: 第108回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
2. 小林美里奈, 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 林田豪太, 坂井理恵子, 松村幸奈, 倉本桃子, 梅山一大, 渡辺信之, 小野寺雅史, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: 遠赤色蛍光蛋白monomeric Plum を全身発現するトランスジェニック・クローンブタの作出. In: 第107回日本繁殖生物学会大会: 21-24 Aug 2014; 帯広.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

〔その他〕 ホームページ等

明治大学バイオリソース研究国際インスティ  
チ ュ ー ト

<http://muiibr.com/institute/institute.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者 長屋昌樹 (MASAKI NAGAYA).

明治大学・研究・知財戦略機構・特任教授 研究者番号: 90329300

(2)研究分担者

長嶋比呂志 (HIROSHI NAGASHIMA) .

明治大学・農学部教授 研究者番号: 50318664

梅山一大 (KAZUHIRO UMEYAMA) .

明治大学・研究・知財戦略機構・特任准教授 研究者番号: 70342699

渡邊将人 (MASATO WATANABE) .

明治大学・研究・知財戦略機構・特任講師 研究者番号: 00321688

松成ひとみ (HITOMI MATSUNARI) .

明治大学・研究・知財戦略機構・特任講師 研究者番号: 70639517

新井良和 (YOSHIKAZU ARAI) .

明治大学・研究・知財戦略機構・研究推進員: 70639517