

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006 年度～2008 年度  
 課題番号：18300143  
 研究課題名（和文）ミニブタを用いた再生医学研究における有効性・安全性テストシステムの開発  
 研究課題名（英文）Development of feasibility test system using miniature Pig

研究代表者  
 小林英司（KOBAYASHI EIJI）  
 自治医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：00245044

## 研究成果の概要：

本研究は、この小動物の成果を体サイズがヒトに近いミニブタを使い再生医学研究部における有効性テストシステムを作ることを目的とした。ミニブタを用いて腎臓、小腸および肺の移植実験を行うと共に、胎仔および新生仔の心臓から回収した心筋細胞を用いた再生医療に関する実験を行った。ミニブタの小腸および肺の移植モデルでは、regulatoryT 細胞（Tregs）など、移植臓器に対する宿主の拒絶反応に関して前臨床検討した。さらに GFP 豚より種々の間葉系幹細胞を樹立し再生医療研究のソースとしての有効性を検討した。樹立された滑膜幹細胞は、励起光下で発光し、関節鏡で観察できることを確認した。幹細胞を使用した関節内組織の再生医療を解析するのに、ブタを用いて、GFP を発光する幹細胞がどのように挙動するか、関節鏡を用いて解析することが可能となった。本システムは、小動物では不可能な、幹細胞の関節内成果での挙動を直接観察することを可能にし、臨床応用での疑問点を明らかにする。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2007 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

## 研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：病態モデル、ミニブタ、再生医療、臓器移植

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、再生医療、移植医療さらに人畜共通感染症予防等の先端医学治療における前臨床モデルとして、ミニブタモデルシステムを開発することを目的とした。近年、再

生医科学がおおきなエポックとなってきたが、現時点では、遺伝子改変マウスやラットを使用して研究が行われている。しかしながら、マウス、ラットからは、体サイズを含めヒトまで生物学的に大きな距離があり、その成果全てがそのままにヒトへと応用はでき

ない。一方、前臨床として、サルの実験が行われるが、多額な費用と大きな設備が必要な上、動物福祉、倫理共に大きな配慮が望まれ、十分な量の研究を行うことが困難となってきた。特に胎仔を用いた研究は再生医学研究で注目され、胎仔をソースとした前駆細胞や幹細胞が研究試料として必須となっているが、これを霊長類に求めることもはばかれる。

先に開発したラットモデルを用いて、滑膜幹細胞の関節内投与により半月板が再生されるか、広範囲半月板切除モデルで検討してきた。この小動物のシステムは、移植細胞追跡のため、Luciferase・LacZ遺伝子を同時発現するトランスジェニックラットで、この膝滑膜から幹細胞(Luc/LacZ+ MSCs)を分離した。半月板切除後、Luc/LacZ+ MSCs  $5 \times 10^6$ 個を膝関節内に投与し、組織学的解析とin vivo追跡を行なった。MSCs投与群ではコントロール群に比べ2, 4, 8週で半月板再生が優位に認められ、LacZ陽性細胞は最終観察時(12週)まで確認され、2型コラーゲン陽性の軟骨細胞に直接分化した。in vivo追跡では、膝関節内のルシフェラーゼ活性は投与後3日で一過性に上昇し漸減した。移植細胞は膝関節以外の他臓器への移動を認めなかった。滑膜幹細胞を関節内に投与すると、半月板欠損部に生着し、直接半月板様細胞に分化し、半月板再生を促進した。実際の臨床を想定するためには、同様の系をミニブタで作成し、間接鏡など人での検索と同じシステムを構築する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究は、この小動物の成果を体サイズがヒトに近いミニブタを使い再生医学研究部おける有効性テストシステムを作ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は、ミニブタシステムを用いて

- (1) 移植で使用される細胞ソースの有効性と安全性を確認するモデルを作製すること
- (2) 肝をスカルフォードとするコンディショニング肝障害ミニブタの産出の二段階を分担者とともに効率良く進める。

I

- ① 核移植による GFP-ミニブタからの細胞ソース樹立とミニブタ疾患モデルの作製

これまで我々の研究室では、GFP発現ラットを主力に、Wistar-GFP105 ラット、Lewis-EGFP ラット等複数のラインを作成し疾患ラットに移植してきた。この技術力と

成果の上に、すでに作製された GFP-ミニブタを用いて、下記移植実験を行う。

現在クローン技術で誕生した GFP ミニブタは3頭である(投稿中)。その内の1頭をキャラクター化し、再生医療研究ソースにふさわしいか検討する。対象は、骨髄、体性幹細胞(SP)、脳、筋肉、心筋とし GFP 輝度の強弱を検討する(袴田分担)。また他の2頭は胎仔を得るために交配を開始する。疾患ブタ(レシピエント)としては、①心筋梗塞、②肝切除、③下肢虚血、④脳虚血を作製する(小林分担)。さらに未成熟卵子を体外で成熟培養し、この成熟卵子を除核した後、肝細胞特異的に自殺遺伝子を発現させた線維芽細胞の核を導入する(田中分担)。作成された再構築胚を活性化し、仮親ブタに胚移植し、肝細胞特異的に自殺遺伝子を発現させたブタを得るのがその骨格である。

我々はブタ核移植の基本となる未成熟卵子の体外成熟培養条件を改善し、さらに、活性化処置後の培養液組成の添加により、再構築胚の胚盤胞期胚への発育率を向上させる技術的検討を行ってきた。現在、胚盤胞期胚までの発育率は約3%から10%に向上している(ビオフィリア2009)。

現在のクローン技術は以下の通りである。遺伝子改変ミニブタ作出に関して、雌雄2系統由来のブタ線維芽細胞を培養し、GFP 遺伝子下流に Internal Ribosomal Entry Site (IRES) をはさみ、ピューロマイシン発現遺伝子をおいたコンストラクトを作成し、ブタ線維芽細胞に transfect する。その後、ピューロマイシンによる選択を行い、ピューロマイシン耐性 GFP 発現線維芽細胞を選択し、培養増殖させる。次に、未成熟卵子を体外成熟培養し、この成熟卵子を除核した後、ピューロマイシン耐性 GFP 発現線維芽細胞の核を導入する。この再構築胚を活性化し、仮親ブタへと胚移植し、GFP 遺伝子を発現させたブタを得る計画である。作成された雌雄2系統の産子を用い、自然交配により増殖して、必要頭数を確保する。

- ② 肝細胞特異的自殺遺伝子コンストラクトの作製と肝疾患ブタの作成

肝細胞特異的プロモーターの下流に組み込んだ自殺遺伝子を作製する(村上分担)。そしてそれをブタ線維芽細胞に transfect し、この線維芽細胞の核を除核した成熟卵子に核移植し肝細胞特異的自殺遺伝子を組み込んだブタを作成する(田中分担)。未成熟卵子を体外成熟培養し、この成熟卵子より除核を行った後、肝細胞特異的に自殺遺伝子を発現させた線維芽細胞の核を導入する。この再

構築胚を活性化し、仮親ブタに胚移植し、肝細胞特異的に自殺遺伝子を発現させたブタを得る。

これまで検討した肝細胞特異的に自殺遺伝子を発現させる遺伝子コンストラクトとして、すでに単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子がある。本遺伝子発現肝細胞はガンシクロビル投与下で特異的に細胞死におちいる。本遺伝子コンストラクトの動作はラットで実証済みである (Kawasaki M, et al, 2003)。その他の自殺遺伝子候補としては、yeast cytosine deaminase gene(CD gene) と phosphoribosyl-transferase gene を融合させて用いる。CD gene は、prodrug である 5-FC を抗癌剤でもある 5-FU に効率よく変換する酵素である。哺乳動物には存在しないため正常動物に 5-FC を投与しても障害は起こらず、この CD gene を持った細胞が選択的に障害される。この CD gene 融合物の下流に IRES(Internal ribosomal entry site)をはさみ、その下流に EFGP を置く。この操作により、CD gene 融合物と EGFP が一本の mRNA 上に転写され、EGFP の発現がある肝細胞では、CD gene 融合物の発現が保証される。遺伝子改変ミニブタのライン確保においては、速やかで効率のよいスクリーニングが多大な労力を削減し、かつ発現のよいラインを選別する効果大きい。特に CD gene の発現をモニターするためには、蛋白質レベルでは HPLC 法しかないため、簡便な蛍光発現でラインを選べるモデルは非常に優れている。EFGP は少ないながらも抗原性があるが、ミニブタ肝細胞脱落を目的とするため、その使用が合目的であると考えている。さらにヒト肝細胞との判別に非常に有用となる。既に、上述のマウスアルブミンプロモーターエンハンサーが、ブタでも肝細胞特異的に発現をきたすかどうかの検討もすでに行っている。ブタ肝細胞に外来遺伝子を発現させるため、これまで当研究室で実績のある遺伝子銃による検討を行った。luciferase をマーカー遺伝子としてブタ肝臓に対する遺伝子銃の射入圧力を検討したところ、350 psi で最もよく luciferase 遺伝子発現が認められ、この圧力をその後の実験に使用した。さきのマウスアルブミンプロモーターエンハンサー下流に luciferase を置くコンストラクトを作成し、コントロールとして CMV プロモーターの下流に luciferase を置いたコンストラクトを作成した。この 2 種の遺伝子を遺伝子銃でブタ肝臓とコントロールである膀胱粘膜に打ち込み、luciferase の発現を比較検討した。マ

ウスアルブミンプロモーターエンハンサー下流の luciferase は膀胱粘膜と比較して、肝臓で約 4 倍の発現を示した。CMV プロモーターを用いた luciferase 発現は膀胱粘膜と肝臓でほぼ同等の発現を示した。このパイロット実験からマウスアルブミンプロモーターエンハンサーはブタにおいて肝細胞特異的に発現することが認められ、今後の遺伝子発現コンストラクトに使用できると判断した。これらはすでに先行研究の中で得られた自殺遺伝子であるが、その他ラット Tg で実績のあるものから随時選択し、ミニブタ線維芽細胞にトランスフェクトする (村上分担)。

以上の実験結果を踏まえ肝細胞特異的自殺遺伝子発現コンストラクトを使用し、肝細胞特異的自殺遺伝子を組み込んだブタを作成する。

前述と同様に雌雄 2 系統のブタ線維芽細胞を培養し、ピューロマイシン発現遺伝子コンストラクトと肝細胞特異的自殺遺伝子を co-transfect した後、ピューロマイシン耐性線維芽細胞を選択する。この選択ピューロマイシン耐性線維芽細胞の中に、肝細胞特異的自殺遺伝子が組み込まれているか否かは PCR 法で確認し、肝細胞特異的自殺遺伝子が導入された線維芽細胞を選択する。さらに、樹立した肝細胞特異的自殺遺伝子導入線維芽細胞の核を取り出す。同様の核移植技術を用いて、肝細胞特異的に遺伝子を発現させたブタを得る。

作製された雌雄 2 系統の産子を用い、自然交配により増殖して、必要頭数を確保する。

初年度以降は

I

① 継続して GFP-ミニブタの発現解析を行う。

経時的に発現がどのように各臓器で変化するかのプロファイルをまず解析する。特に胎仔ソースを中心に解析する。さらに幹細胞を採取し、各臓器への分化を GFP をマーカーとして用いて追跡する (袴田分担)。

② GFP-ミニブタを使用した中枢神経再生実験

骨髄、新生仔、胎児より中枢神経への体性幹細胞の再生研究を行う。本研究に於いては、骨髄、新生仔を材料として、体性幹細胞を採取し、中枢神経系への分化恒常的に発現する GFP レポーター遺伝子(CAG-GFP)をマーカーとして追跡し、ヒトにより近い本モデルでより子細に神経細胞の分化、再生を検討する (袴田、小林分担)。

### ③ GFP-ミニブタを使用した肝臓再生実験

前年に引き続き肝切除後の GFP 幹細胞移植で完治率を検討する(小林分担)。骨髄を材料として、体性幹細胞を採取し、肝臓への分化を GFP をマーカーとして追跡する。過去に山口大学で開発されたマウスの四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)の持続肝障害下での骨髄細胞の分化評価モデル GFP/CCl<sub>4</sub> モデルを本研究に応用し、新たにブタ骨髄細胞の肝細胞への分化モデルを作成する。また過去の解析(マウスモデル)から明らかになった肝細胞分化促進因子を骨髄細胞とともに投与し、ブタに骨髄細胞からの肝細胞分化を評価する。過去のマウスを用いた実験では、肝硬変症が骨髄細胞の投与により改善する結果が得られており、この現象がブタにおいて再現されるかどうかを評価する。

安全性評価のためにサルを使った実験が倫理的な背景から困難を極める中で、ミニブタを使った研究推進は有効な代替手段であり、その整備が急務である。また現在の画像診断装置ではヒトにおける臨床研究では、投与した骨髄細胞が実際に肝細胞に分化した具体的な細胞数など、効率性を正確に評価するには限界がある。ヒトにおいては現在腹部超音波検査下で肝組織をとることで評価するしかないのが状況である。将来ヒトにおいて再生医療の現場で、細胞単位の定着や分化効率の評価を正確にするためには、今後新たな診断機器の開発も視野にいたった研究が必要である。今回我々が提案する大型動物を使った評価モデルの開発はその第一歩になることが期待される。

### ④ 遺伝子組み換えとブタ核移植の技術により肝細胞特異的自殺遺伝子を組み込んだミニブタの解析及び再生実験

作成した肝障害ミニブタに関しては、その発現の度合い及び種が異なるため、薬剤の必要濃度を決める必要がある。そこで、ミニブタに薬剤を投与し、肝細胞脱落が起きるかを transaminase の推移で観察する(田中分担)。肝細胞脱落のための最低濃度、また投与期間、耐用最大濃度等を明らかにする。ラインセレクションに関しては、transgene の発現があまりに多いと、肝壊死のみならず、個体死まできたす可能性がある。またあまりに発現が少ないと、期待される肝壊死が起こらない。そこで、目標としては、薬剤の投与で肝壊死が起こらず個体死が起こらない濃度域が最も広いラインを選択する。

これらの実験結果を踏まえ、新生児期免疫寛容の手法を用いアロの肝細胞を受容する

ブタ作製を試みる。正常に分娩された新生ブタは生理的に胎仔としての性格があることが知られている。例えば、新生ブタは、胎児性蛋白( $\alpha$ -fetoprotein)が高く、ほ乳期にも高濃度(4日齢で1.1 mg/ml)で存在する。従って、uteroxenotransplant と同様な手法を適用し、新生ブタに対し、免疫学的寛容を生じさせる可能性がある。ただし本研究のみでは遂行が予算的にも不可能となる可能性があり、以下はその将来利用について述べる。

胎生終末期あるいは新生児期のミニブタにアロの肝細胞あるいは臍帯血に由来する幹細胞を注入し、アロの細胞に対して免疫学的寛容を誘導できることを確認する。免疫学的にアロの細胞に寛容となったブタにさらにアロの肝細胞を追加注入することにより、アロの肝細胞を持つキメラブタを作成することが出来ると思われる。ヒト細胞のソースは HepG2 を使い、あらかじめ luciferase 遺伝子を組み込んだものを用い脾臓から注入することによりその生着を luciferase 発光で観察する。これらの研究は技術的には可能なレベルに達しているものの、FDA の異種移植の人畜共通感染症の待機的検討の結果を待つ必要がある。本研究はヒト肝細胞の移入を視野に入れており、異種動物を治療用バイオリアクターとして用いることの社会的な、倫理的論議も必要となってくる。しかしながら、本研究がもたらす基礎技術の重要性は移植・再生医科学研究に不可欠であることに変わりはない。

## 4. 研究成果

ミニブタを用いて腎臓、小腸および肺の移植実験を行うと共に、胎仔および新生仔の心臓から回収した心筋細胞を用いた再生医療に関する実験も行った。

臓器不足が深刻な社会問題となっているが、この問題を解決すべく、心臓移植分野では、これまでラットを用いて心筋細胞シートの研究を進めてきた(Sekine et al. '06a, b, Shimizu et al. '06)が、将来的な臨床応用を視野に入れ、ブタを用いた研究へとシフトした。ラット同様、家畜豚だけでなくミニブタでも新生仔および胎仔から回収した心筋細胞をシート状に培養し拍動する事を確認した。今後は、レシピエントであるブタ血管に心筋細胞シートを巻いて補助心臓の作製を試みるが、今後は拒絶反応を出来るだけ起こさないように血管を処理する方法も検討し、来年度以降は臨床応用を視野に入れた研究を進めていく。

また、ミニブタの小腸および肺の移植モデルを作製して、regulatory T 細胞 (Tregs) など、移植臓器に対する宿主の拒絶反応に関して検討した。その結果、小腸よりも肺移植モデルで非常に安定した疾患モデルを確立した。このモデルを用いて、Tregs 投与時の lymphopenia 作製のためのエンドトキシン投与量や免疫抑制剤の血中濃度維持に関して検討中であり、これらの結果をもとに、ミニブタ肺移植モデルにおいて Tregs の理論が確立の可能性を検討した。

さらには、ヒトにおける腎移植は、優れた免疫抑制剤の開発により腎移植を受けた患者の殆どが長期生存するものの、依然として一定の割合で免疫不全等により移植手術が効を成さない場合がある。そこで腎臓の形態ならびに生理学性状がヒトと非常に類似しているミニブタを用いて腎移植法を検討した結果、ブタの場合、左腎を腹部後大動脈に端々吻合するのモデルが最も簡便で成功率が高い結果を得たが、今後は様々な臓器保存液を用いて保存した後に腎臓を移植し、臓器の保存状況と移植手術結果の相関を検討中である。

GFP Tg ブタ (静岡県中小家畜試験場：河原崎博士らとの共同研究) とクサビラ Tg ブタ (明治大学長嶋博士らとの共同研究) より骨髓細胞を採取し、培養の上骨髓由来間葉系幹細胞 (MSC) を樹立した。樹立した MSC は *In vitro* で脂肪細胞や骨細胞への分化能を確認した。本結果を得た上で平成 19 年度はさらに下記 2 点を検討した。

① 本細胞を筋肉障害のラットの大腿動脈より注入して第 1 および 3 日目に注入細胞をマーカー遺伝子をもとに追跡した。同時にコントロールとしてラット MSC を同様に注入した。後者できわめて効率よく筋肉内にマーカー細胞が存在したが、前者ではほとんどその細胞が確認できなかった。そこで次なる実験を行った。

② マーカー遺伝子を持つブタ MSC をラット胎児メタネフロン (腎臓原基) に注入した。本系は、胎児臓器への移植で拒絶反応を回避できる利点がある。注入細胞はラット腎臓原基内で分散し、一部尿管や糸球体へと分化が確認された。

今後、このようなマーカー遺伝子が搭載されたブタ MSC を用いて、他の幹細胞との違

いを研究したり、肝臓細胞への分化誘導に使用する研究を遂行する予定である。

膝半月板は線維軟骨であるが、自己修復能に乏しく、損傷を放置したり、広範囲切除後には、変形性関節症に至る。縫合術には限界があり、新たな治療法が望まれる。間葉幹細胞のなかで滑膜由来のものは採取が容易で、増殖・軟骨分化能が高く、半月板再生の細胞源として利用価値が高い。

これまでラットモデルを用いて、滑膜幹細胞の関節内投与により半月板が再生されるか、広範囲半月板切除モデルで検討してきた。

今年度は、この小動物の成果を体サイズがヒトに近いブタを使い検証した。特に移植する細胞は、静岡県畜産技術研究所の河原崎達雄博士らが開発した緑色の発光をする GFP クローンブタから樹立した滑膜幹細胞を使用した。樹立された滑膜幹細胞は、励起光下で発光し、関節鏡で観察できることを確認した。幹細胞を使用した関節内組織の再生医療を解析するのに、ブタを用いて、GFP を発光する幹細胞がどのように挙動するか、関節鏡を用いて解析することが可能となった。本システムは、小動物では不可能な、幹細胞の関節内での挙動を直接観察することを可能にし、臨床応用での疑問点を明らかにすることが出来た。

## 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 8 件)

1. Tanaka, H., Yasuda, Y., Lefor, A., Kobayashi, E.: The feasibility of an animal laboratory for teaching surgical techniques to medical students: Teaching in a non-clinical environment. 医学教育 2008, 39(5): 299-303. 査読・有
2. Wakai, T., Sugimura, S., Yamanaka, K., Kawahara, M., Sasada, H., Tanaka, H., Ando, A., Kobayashi, E., Sato, E.: Production of Viable Cloned Miniature Pig Embryos Using Oocytes Derived from Domestic pig Ovaries. Cloning Stem Cells 10(2): 249-262, 2008. 査読・有
3. Wakai, T., Tanaka, H., Yamanaka, K., Sugimura, S., Sasada, H., Kawahara,

- M ., Kobayashi, E., Sato, E.: Induction of estrus in pubertal miniature gilts. *Animal reproduction sciens* 103: 193-198, 2008. 査読・有
4. Hara, M., Murakami, T., Kobayashi, E.: In vivo bioimaging using photogenic rats: Fate of ingected bone marrow derived mesenchymal atromal cells. *Journal of Autoimmunity* 30(3): 163-171, 2008. 査読・有
5. Kimura, A., Ohmori, T., Ohkawa, R., Madoiwa, S., Mimuro, J., Murakami, T., Kobayashi, E., Hoshino, Y., Yatomi, Y., Sakata, Y.: Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P<sub>1</sub> receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury. *Stem Cells* 25(1):115-124, 2007. 査読・有
6. Haga, J., Wakabayashi, G., Shimazu, M., Tanabe, M., Takahara, T., Azuma, T., Sato, Y., Hakamata, Y., Kobayashi, E., Kitajima, M.: In vivo visualization and portally repeated transplantation of bone marrow cells in rats with liver damage. *Stem Cells Dev* 16(2):319-327, 2007. 査読・有
7. Tanaka, H., Kobayashi, E.: Education and research using experimental pigs in a medical school. *J Artif Organs*, 9:136-143, 2006
8. 今野兼次郎、小林英司: 異種移植. 臨床検査. 51(2): 213-217, 2006

[学会発表] (計0件)

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林英司 (KOBAYASHI EIJI)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 00245044

(2) 研究分担者

今野兼次郎 (KONNO KENJIRO)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 30323348

村上孝 (MURAKAMI TAKASHI)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 00326852

田中穂積行 (TANAKA HOZUMI)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90364497

(3) 連携研究者