

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659612

研究課題名（和文）人工遺伝子（codon 改変機能ドメイン重合分子）を発現するブタの作出

研究課題名（英文）The production of the pigs with an artificial gene

(a functional domain-polymerized nucleotide based on optimal codon usage)

研究代表者

宮川 周士 (MIYAGAWA SHUJI)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90273648

研究成果の概要（和文）：多数のヒト遺伝子を導入したブタを作製するために、各遺伝子の機能ドメインを含んだハイブリッド遺伝子を構築し、顕微鏡下で授精を試みる方法、ICSI法で、トランスジェニックブタの作製を試みた。まずはマウスでそれぞれの遺伝子を持つトランスジェニックマウスを作製し、解析し得た。ブタに関しては、顕微鏡下で授精された卵の状態を調べたが、卵割には問題を認めなかったが、期間内には目的のブタの誕生には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：To establish transgenic pigs with multiple human genes, the hybrid gene containing the function domains of each molecule were produced and the pigs with the gene was then tried to produce by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) methods. At first, the transgenic mouse with the hybrid genes were successfully produced and analyzed. Concerning the pig project, the condition of the oocyte with each gene was studied under the microscope. The condition of the segmentation was no problem, however the pigs with genes were not born in this period.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

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、トランスジェニックブタ、ハイブリッド遺伝子、顕微授精

### 1. 研究開始当初の背景

移植用臓器の開発は、1990年頃より、諸外国ではベンチャーも巻き込んで篠木をけずっている。

\*まず、ハーバード大学は、a-Gal-KO した MGH ミニブタに DAF (CD55) を発現させている。

Mayo Clinic では a-Gal-KO に MCP (CD46)-TG

ブタを作製している。ピッツバーク大では、a-Gal-KO-ブタをベースに、CD39, DAF, Tissue factor pathway inhibitor (TFPI), CD39, thrombomodulin (TM), CTLA4-Ig, HLA-E, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) を発現するブタを既に作成し、またかけ合わせでは

a-Gal-KO/hCD46/TFPI/CTLA4-I ブタを作成している。

\*欧州” XENOME” プロジェクト (伊、仏中心) がある。 Human hemoxygenase-1 (hHO-1), CD73, CD39 ブタを作成し、すでに掛け合わせとしては、a-Gal-KO/CD55/CD59/CD39/HT ブタを報告している。

ハノーバー大 (独) でも、DAF ブタ、TM ブタ、さらに HO-1 ブタを作製している。また、ブタレトロウイルスの KD ブタ、CTLA4-Ig と A20 のブタも作成している。

\*豪のメルボルンのグループは、同じく a-Gal-KO をベースに CD55/CD59/CTLA4-Ig を導入している。また、TM や CD39、活性化 protein C ブタも作製されている。

\*韓国では、ソウル大と m-gen 社が、DAF ブタ、HLA-E ブタ、Fas-L ブタを報告している。

\*台湾でも、台北大学で DAF ブタと HO-1 ブタを開発している。

これが現在の日本を取り巻く状態であり、これらの研究機関、特にピッツバーク及び XENOME プロジェクトに追いつく可能性が今回の秘策にかかってくる。

## 2. 研究の目的

諸外国ではバイオ人工臓器の開発のため遺伝子改変 (transgenic: TG, knockout: KO) ブタの作出に篠木を削っている。しかし、その作出方法はワンパターンで、(野生型の) ヒトの遺伝子=cDNA や genome を1つ1つ導入し、多数の仔 (F1) を作り、高発現の系統を樹立し、自然交配により重ね合わせて行くやり方である。

我々は、1. 高発現 TG を得るのに、cDNA の codon を改変しブタで至適なものとする。

2. 各分子の機能ドメインだけを、同分子であるいは別の分子と繋ぎ合わせた人工の多

重合分子 (hybrid) を作製し、この人工 cDNA をブタに遺伝子導入する方法をとる。作出した TG-ブタで正常に hybrid 分子が高発現するかを検査する。

成功すれば、一操作で 4-5 個分の遺伝子を高発現した TG-ブタが作出できる。この方法の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子構築の作製

我々が既に持つ遺伝子 (cDNA) を中心に、コドン変換し、機能ドメインを重ね、かつ繋ぎ合わせた cDNA の作製。

### (2) In vitro での検査 (細胞での発現実験)

in vitro で発現を確認。導入方法は、lipid 法と電気ショック法を用いる。

### (3) トランスジェニックブタ作り

次にブタを使って、スパームインジェクション (ICSI) 法で、遺伝子導入を行い、生まれてきた仔ブタの導入分子の発現を確認。

### (4) スクリーニング 組織染色、培養

Neonatal porcine islets cluster (NICC) で検定。

## 4. 研究成果

(1) <遺伝子構築の作製> 1. 補体制御因子と抗凝固因子の hybrid 分子、C1-INH-TM-DAF-MCP [CTDM: codon 改変、機能ドメイン重合分子] を作成し、pig insulin promoter に CMV enhancer をつけた構築に繋いだ。C1-INH に関しては補体制御機能とは関係しない部分 (アミノ酸 1-99) を取り除いた。Thrombomodulin に関しては、直接抗凝固機能に関与する EGF4-6 と EGF3 の一部を選んだ。

また、DAF の機能ドメインに関しては SCR2-4。同じく、MCP も補体制御機能が有る SCR2-4 を使った。

2. また、HLA-E に point mutation で 147 番目の Ser を Cys に換え、かつ HLA-E 分子内に発現できる signal peptide に換えた遺伝子 [HLA-Ev(147)] に、IRES で human beta-globulin の遺伝子を繋ぎ、さらに Chicken-beta-actin(CAG) promoter に繋いだ。

#### (2) <In vitro 検査>

これら、CTDM と HLA-Ev(147) を、ブタ血管内皮及び CHO 細胞にて、発現を確認した。

(3) <マウスでの発現> 旧来の pCPI/CTDMA および pCX/HLA-E をマウスに TG し、それぞれ 4 匹、2 匹の line を得た。内、2 匹、1 匹の発現を生後 8 週令で RT-PCR で解析した (臍臓での発現を 1 とした)。

\*CTDM#1: 脳 (5.41)、心 (0.19)、肺 (1.17)、胸腺 (0.30)、肝 (0.06)、腎 (0.13)、腸 (0.39)、脾 (1.61)、臍 (1)

\*CTDM#2: 心 (2.45)、肺 (7.29)、胸腺 (9.25)、肝 (0.03)、腎 (0.71)、脾 (14.25)、臍 (1)

\*HLA-E: 脳 (2.75)、心 (70.71)、肺 (15.48)、胸腺 (0.17)、肝 (0.36)、腎 (1.28)、腸 (0.30)、脾 (2.81)、筋 (12.86)、臍 (1)。であった。両方の promoter で臍臓での発現を確かめたが、pCPI の方が相対的に高発現と考えられた。

新規に遺伝子構築を作製した。\* pCPI (pig insulin promoter + CMV enhancer)/NCTDM : C1-INH - Thrombomodulin - DAF - MCP --- 昨年の CTDM を改良した。さらに、NK 細胞制御 pCAGGS/HLA-Ev(147)-2A-hb2m <N-HLA-E> : IRES をやめ 2A で繋いだ。

(4) <ブタでの発現> NCTDM および HLA-Ev 遺伝子両者ともに、1.25ng/μl では 2.5ng/μl に比してより高い胚盤胞形成率が得られる傾向であった。一方、胚盤胞の遺伝子導入効率

については、両区に差は見られなかった。胚移植試験には、発生率が高い傾向であった 1.25ng/μl の DNA 濃度を採用した。NCTDM 遺伝子および HLA-Ev 遺伝子を導入した顕微授精胚、それぞれ 69 個および 79 個を 2 頭のレシピエントブタに移植した。しかし、TG-ブタは得られなかった。

#### 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 6 件)

\* Aki Yamamoto, Kosuke Ikeda, Dandan Wang, Shino Nakatsu, Yuichi Takama, Takehisa Ueno, Hiroshi Nagashima, Akihiro Kondo, Masahiro Fukuzawa and Shuji Miyagawa. Trial using pig cells with the H-D antigen knocked down. Surgery Today In press

\* Shuji Miyagawa, Akira Maeda, Shunsaku Takeishi, Takehisa Ueno, Noriaki Usui, Shinichi Matsumoto, Teru Okitsu, Masafumi Goto, Hiroshi Nagashima. A Lectin array analysis for wild-type and α-Gal-knockout pig islets, compared with humans. Surgery Today in press

\* Akira Maeda, Takehisa Ueno, Shino Nakatsu, Dandan Wang, Noriaki Usui, Shunsaku Takeishi, Teru Okitsu, Masafumi Goto, Hiroshi Nagashima, Shuji Miyagawa. A lectin microarray study of glycoantigens in neonatal porcine islet-like cell clusters (NPCC). J Surgical Research in press

\* Ikeda K, Yamamoto A, Nanjo A, Inuinaka

C, Takama Y, Ueno T, Fukuzawa M, Nakano K, Matsunari H, Nagashima H, Miyagawa S. A cloning of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase from porcine endothelial cells. Transplant Proc. 2012;44:1136-8.

\*Nakatsu S, Takama Y, Ueno T, Inuinaka C, Takeishi S, Kondo A, Okitsu T, Nagashima H, Fukuzawa M, Miyagawa S. A study of the glycoantigens of neonatal porcine islet-like cell clusters (NPCC) using a lectin microarray. Transplant Proc. 2012;44:1134-5.

\* Shuji Miyagawa, Yuichi Takama, Hiroshi Nagashima, Takehisa Ueno and Masahiro Fukuzawa

Carbohydrate antigens. Curr Opin Organ Transplant. 2012; 17: 174-9.

[学会発表] (計 9 件)

**12th Congress of the Asian Society of Transplantation, September 25th-28th , Seoul, Korea.**

\* Complements in transplantation

Shuji Miyagawa

\* Kosuke Ikeda, Akiko Nanjyo, Hiroaki Kashiwada, Yuichi Takama, Takehisa Ueno, Masahiro Fukuzawa, Kazuaki Nakano, Hitomi Matsunari, Hiroshi Nagashima, Shuji Miyagawa

A cloning of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid (CMP-NeuAc) hydroxylase from porcine endothelial cells

\* Akiko Nanjyo, Aki Yamamoto, Hiroaki Kashiwada, Kosuke Ikeda, Yuichi Takama, Takehisa Ueno, Masahiro Fukuzawa, Akihiro Kondo, Hiroshi Nagashima, Shuji Miyagawa Trial of knockdown for the H-D antigen of pig cells

\* Hiroaki Kashiwada, Akiko Nanjyo, Shino Nakatsu, Shunsaku Takeishi, Yuichi Takama, Akihiro Kondo, Teru Okitsu, Hiroshi Nagashima, Masahiro Fukuzawa, Shuji Miyagawa. A study of the glycoantigens of neonatal porcine islet-like cell clusters using a lectin microarray

**The 11th Congress of International Congress for Xenotransplantation (Joint Conference with CST), 23-26 October, 2011, Miami, USA**

\* In comparison with APIs, NICCs are very rich in a2,6Neu5NAc, and reduced Fucose/Core Fucose & high-mannose form, and Lactosamine & Core 1 forms are upregulated, instead, in 5 day cultures. Hiroaki Kashiwada, Akiko Nanjyo, Shino Nakatsu, Yuichi Takama, Teru Okitsu, Hiroshi Nagashima, Masahiro Fukuzawa, Shuji Miyagawa.

The 24<sup>th</sup> International Congress of the Transplantation Society  
July 15-19, Berlin

\* Adult pig islets, rich in the high-mannose form compared with humans, were slightly up-regulated, and alpha-linked GalNAc was reduced by Gal-knockout

Wang D, Maeda A, Ueno T, Takama Y, Fukuzawa M, Matsumoto S, Okitsu T, Goto M, Kondo K, Nagashima H, Miyagawa S.

Seoul Forum on Xenotransplantation

Nov. 3, Seoul

\* A study for glyco-antigens in porcine islets. Shuji Miyagawa

\* Monocytic suppressor cells derived from peripheral blood suppress CTL lysis in xenotransplantation

Akira Maeda, Takuji Kawamura, Dandan Wang, Takehisa Ueno, Noriaki Usui and Shuji Miyagawa

2012 CABX Workshop and International Symposium

Transgenic Animal and its Application

Dec.2-4, Seogwipo, Jeju, Korea

\* A feature of glyco-antigen in porcine islets. Shuji Miyagawa

[図書] (計 2 件)

\* Hitomi Matsunari, Masahito Watanabe, Kazuhiro Umeyama, Kazuaki Nakano, Yuka Ikezawa, Mayuko Kurome, Barbara Kessler, Eckhard Wolf, Shuji Miyagawa and Hiroshi Nagashima.

Cloning of Homozygous  $\alpha$  1,3-Galactosyltransferase Gene Knock-Out Pigs Somatic Cell Nuclear Transfer.

[Xenotransplantation] Open access Publisher INTECH. 2012, p37-54.

Shuji Miyagawa, Akira Maeda. Glycoprotein alpha 1,3-galactosyltransferase 1, pseudogene (GGTA1P). The second edition.

[Handbook of Glycosyltransferases and related genes] Springer-Reference. In press.

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮川 周士 (MIYAGAWA SHUJI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号 : 90273648

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :