

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 21 日現在

機関番号：32682

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870630

研究課題名(和文) 異種移植における超急性拒絶反応を抑制する遺伝子ダブルノックアウトブタの開発

研究課題名(英文) Generation of alpha1,3-galactosyltransferase and cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-knockout pigs

研究代表者

松成 ひとみ (Matsunari, Hitomi)

明治大学・研究・知財戦略機構・特任講師

研究者番号：70639517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：絶対的なドナー臓器不足を解決する一つとして、ブタ臓器を用いる異種移植が提唱されている。異種移植では、免疫拒絶の克服が必須である。最初に起こる超急性拒絶の引き金としてGal抗原があるが、我々はこの抗原を持たないGalTノックアウト(KO)ブタを作出している。本研究では、GalT-KOブタを基盤に、超急性拒絶の別要因とされるH-D抗原を除去したCMAH遺伝子KOブタの作出を目的とした。ゲノム編集技術を用いてCMAH遺伝子をKOした細胞の体細胞核移植を行い、クローン産仔を作出した。主要組織において抗原糖鎖の消失が確認できた。本研究により国内初のGalT/CMAH両遺伝子KOブタの作出に成功した。

研究成果の概要(英文)：Pig to human xenotransplantation is one of the current strategies for overcoming the worldwide shortage of organ transplants. However, discordant xenografts involve severe immune rejections strongly related to species-specific glycoantigens. The major xenoantigen is the  $\alpha$ -Gal epitope. Another carbohydrate xenoantigen, N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc), which is a component of the H-D antigen, has also been identified. Neu5Gc is synthesized by cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH). The aim of this study was to produce 1,3-galactosyltransferase (GalT)/CMAH-double KO pigs using genome editing and somatic cell nuclear transfer (SCNT) technology. The homozygous CMAH KO cells were established using ZFNs or TALENs. These cells were used for SCNT and produced GalT/CMAH-double KO cloned pigs. The absence of  $\alpha$ -Gal and H-D antigens was confirmed in both the tissue and granulocyte samples of the cloned piglets.

研究分野：発生工学

キーワード：異種移植 ブタ ゲノム編集 体細胞核移植

### 1. 研究開始当初の背景

臓器移植医療においてドナー臓器不足は全世界的な問題であるが、その一つの解決策として、ブタの臓器を用いる異種移植が提唱されている。ヒト・ブタ間の異種移植研究では、免疫拒絶という障壁の克服が最重要課題となっている。異種移植に伴う超急性拒絶を回避する方策として、ブタが持つ異種抗原である  $\alpha 1,3$ -ガラクトース抗原と Hanganutziu-Deicher (H-D) 抗原を持たないブタの作出が求められていた。

### 2. 研究の目的

$\alpha 1,3$ -ガラクトース抗原と H-D 抗原の生成を担う  $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase (GalT) と cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) の両遺伝子が破壊 (ノックアウト) されたブタの作出を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ゲノム編集技術を用いた CMAH 遺伝子ノックアウト細胞の樹立

我々は既に GalT 遺伝子がノックアウトされた (GalT-KO) ブタの系統を確立している (引用文献 1)。このノックアウトブタの細胞に対して、CMAH 遺伝子の破壊を行い、GalT 並びに CMAH 両遺伝子がノックアウトされた細胞を樹立することとした。遺伝子ノックアウトは、Zinc finger nucleases (ZFN) と transcription activator-like effector nucleases (TALENs) を用いたゲノム編集技術によって行った。

雌の GalT-KO ブタ細胞に対しては、ZFNs を用いた。CMAH 遺伝子のエクソン 8 を標的とした ZFNs を設計し、皮膚由来線維芽細胞に対してエレクトロポレーション法によって ZFN mRNA を導入した。雄の GalT-KO ブタについては TALENs を用いた。CMAH 遺伝子のエクソン 7 を標的とした TALENs を設計し、胎仔線維芽細胞に対して、雌細胞と同様に TALEN mRNA を導入した。

#### (2) 体細胞核移植胚の作製及び GalT/CMAH-KO クローンブタの作出

既報 (引用文献 2) の方法に従い、樹立した核ドナー細胞と体外成熟卵を用いて核移植を行った。ZFN によって CMAH 遺伝子を heterozygous KO した雌の細胞からは、クローン産仔を作出し、その個体から得た細胞に再度 CMAH-KO を施した後に核移植を行い、個体作出した。

#### (3) GalT/CMAH-KO クローン個体における表現型の解析

得られたクローン産仔の尻尾組織よりゲノム DNA を抽出し、KO 変異解析を行った。さらに、心臓・肺・脾臓・腎臓について H-D 抗原並びに  $\alpha$  Gal 抗原に対する免疫染色を行った。1 か月齢の GalT/CMAH-KO クローン

産仔から末梢血を採取し、血球細胞における H-D 抗原、 $\alpha$  Gal 抗原の存在をフローサイトメトリー解析によって検証した。

### 4. 研究成果

我々は国内で唯一の、GalT-KO ブタの系統を維持するグループである。本研究では、この GalT-KO ブタから採取した細胞に、ゲノム編集を用いて CMAH-KO の変異を導入した。

(1) 雌の GalT-KO ブタ細胞に、ZFN により CMAH-KO を誘導した。90 コロニーの細胞のうち、変異が認められたものは 6 コロニー (変異誘導効率: 6.7%, 6/90) であった。そのうち有意なヘテロ KO コロニーは 5 コロニー (5.6%, 5/90)、ホモ KO 細胞は得られなかった。このためヘテロ KO 変異が認められた細胞を体細胞核移植に用いてクローン産仔を得た。heterozygous CMAH-KO クローン産仔から樹立した細胞に残存する CMAH 遺伝子 (残存アリル) を再びノックアウトし、その後体細胞クローニングによって、最終的に homozygous CMAH-KO 個体 (雌) の作出に成功した。連続的体細胞核移植によって、homozygous 遺伝子 KO を行い得ることを示した世界的にも先駆的な成果が得られた。

(2) 雄の GalT-KO ブタ細胞に対しては、TALEN により homozygous CMAH-KO を誘導した。166 コロニーの細胞のうち、40 コロニー (24.1%, 40/166) であった。ヘテロ変異が認められたものは 68 コロニー (41.0%, 68/166)、ホモ KO 変異は 5 コロニー (3.0%, 5/166) 樹立された。この細胞の体細胞核移植によって、CMAH-KO 個体 (雄) を作出した。このことから、ゲノム編集効率が高い TALEN の使用によって、短期間に homozygous 遺伝子 KO ブタが得られることが実証された。

(3) 合計 137 個の KO クローン胚を発情同期化した借腹雌に移植し、4 頭のクローン産仔が得られた。4 頭のうち、雌が 1 頭 (生存)、雄は 3 頭 (うち 1 頭死産) であった。すべての産仔は核ドナー細胞と同じ変異を有しており、GalT/CMAH 両遺伝子ノックアウト変異が確認された。

(4) GalT/CMAH-KO ブタの心臓・肺・脾臓・腎臓について、H-D 抗原ならびに  $\alpha$  Gal 抗原に対する免疫染色を行った (図 1, 2)。GalT/CMAH-KO ブタでは、H-D 抗原、 $\alpha$  Gal 抗原が消失していることが確認された。さらに、生後 1 ヶ月齢時に末梢血を採取し、血球細胞における発現も同様に調べたところ、GalT/CMAH-KO ブタでは血球細胞においても両抗原を発現していないことが明らかとなった。

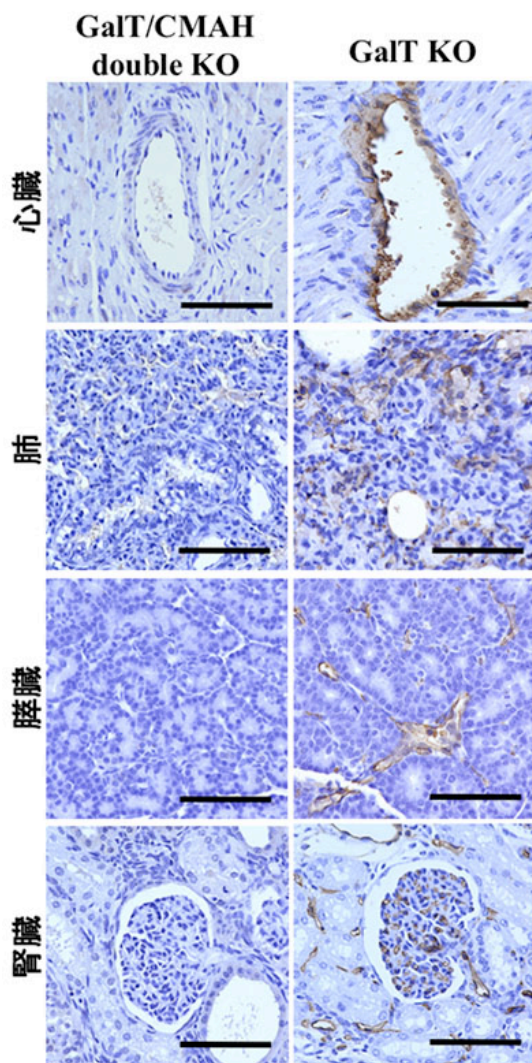


図 1. H-D 抗原に対する免疫染色像。

以上によって、本研究では GalT と CMAH の両遺伝子を homozygous に KO された雌雄の個体が得られた。今後の異種移植研究を飛躍的に推進し得る、極めて貴重な動物資源が開発されたと言える。

<引用文献>

- ① Matsunari, H., Watanabe, M., Umeyama, K., Nakano, K., Kurome, M., Kessler, B., Wolf, E., Miyagawa, S., and Nagashima, H. (2012). Cloning of homozygous  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase gene knock-out pigs by somatic cell nuclear transfer. In *Xenotransplantation*, S. Miyagawa, ed. (Rijeka, Croatia: InTech), pp. 37-54.
- ② Watanabe, M., Nakano, K., Matsunari, H., Matsuda, T., Maehara, M., Kanai, T., Kobayashi, M., Matsumura, Y., Sakai, R., Kuramoto, M., et al. (2013). Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells

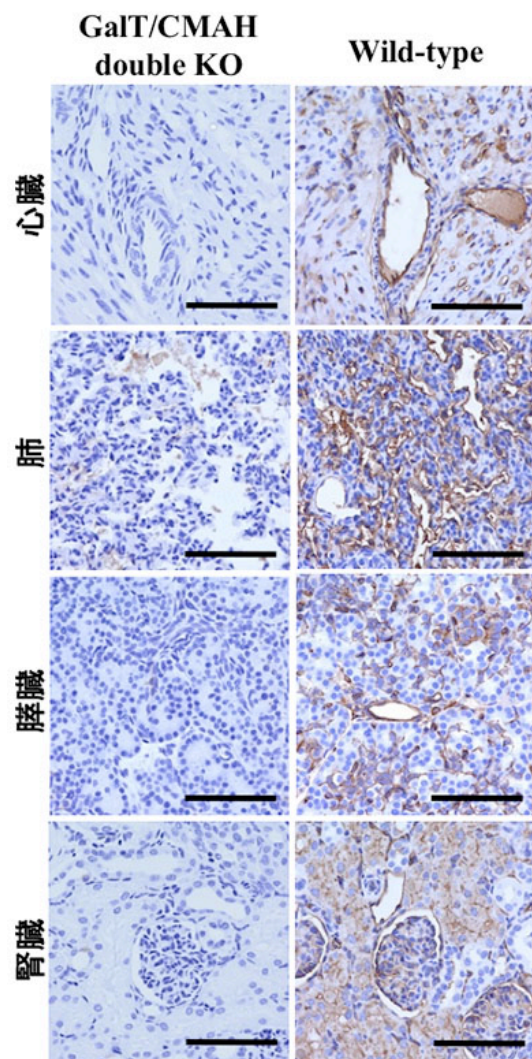


図 2.  $\alpha$  Gal 抗原に対する免疫染色像。

genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. *PLoS ONE* 8, e76478.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- ① Miyagawa S, Matsunari H, Watanabe M, Nakano K, Umeyama K, Sakai R, Takayanagi S, Takeishi S, Fukuda T, Yashima S, Maeda A, Eguchi H, Okuyama H, Nagaya M, Nagashima H: Generation of alpha1,3-galactosyltransferase and cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-knockout pigs. *Journal of Reproduction and Development*, 61(5): 449-457, 2015. 査読有  
DOI: <http://doi.org/10.1262/jrd.2015-058>

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① Matsunari H, Watanabe M, Nakano K, Uchikura A, Asano Y, Hatae S, Takeishi T, Yashima S, Fukuda T, Sakai R, Umeyama K, Nagaya M, Maeda A, Egushi

G, Okuyama H, Miyagawa S, Nagashima H: Production of alpha 1,3-galactosyltransferase and cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-knockout pigs by genome editing and somatic cell cloning. In : 2015 IPITA-IXA-CTS Joint Congress: 15-19 Nov 2015; Melbourne (Australia).

② 松成ひとみ, 渡邊将人, 中野和明, 内倉鮎子, 浅野吉則, 武石透輝, 福田暢, 八島紗耶香, 梅山一大, 高柳就子, 坂井理恵子, 前田晃, 江口寛, 奥山宏臣, 宮川周二, 長嶋比呂志:  $\alpha$ -ガラクトシル抗原及び H-D 抗原を発現しない遺伝子ノックアウトブタの作出. In: 第 17 回日本異種移植研究会: 14 Mar 2015; 自治医科大学(栃木県, 下野市).

〔その他〕

明治大学バイオリソース研究国際インスティテュート HP(<http://muiibr.com>)で常時情報発信している

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松成 ひとみ (MATSUNARI, Hitomi)  
明治大学・研究知財戦略機構・特任講師  
研究者番号：70639517