

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字	MAKUUCHI MASATOSHI				
①研究代表者氏名	幕内 雅敏		②所属研究機関・部局・職	東京大学・医学部附属病院・教授	
③研究課題名	和文	人工肝臓に用いる形質転換ブタの生産			
	英文	Production of transgenic pig for the use of the bioartificial liver			
④研究経費 金額単位：千円	平成15年度	平成16年度	平成17年度		総合計
	32,100	29,500	29,800		91,400
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在					
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）		
幕内 雅敏	東京大学・医学部附属病院・教授	消化器外科学	形質転換ブタ生産プロジェクトの評価		
成瀬 勝俊	東京大学・医学部附属病院・助手	消化器外科学	形質転換ブタの生産及びそれを用いた人工肝臓システムの開発		
長嶋 比呂志	明治大学・農学部・教授	発生工学	遺伝子導入による形質転換ブタの生産		
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）					
<p>重症肝不全患者の治療法として、生の肝臓組織を用いたバイオ人工肝臓が大きな期待を持たれている。人工肝臓とは、劇症肝炎や術後肝不全患者における肝機能の補助や肝移植適応ドナーが現れるまでの待機期間における肝機能の代替つなぎとして灌流治療に使用する体外設置式の血液浄化療法システムである。我々はこれまで、ブタ肝臓を用いた人工肝臓システムの開発や、血液透析濾過、血漿交換などのアフレス治療法の研究を行ってきた。人工肝臓システムとしては、患者側回路と浮遊ブタ肝細胞灌流回路との二つの回路の間で血漿交換を行う灌流法であり、性能、安全性、便宜性に優れた反復式血漿分離灌流システムを開発した。ブタ肝組織を用いた人工肝臓では、ブタのタンパクが合成され、これが患者体内に流入することが大きな問題である。この問題を解決するには、発生工学的手法を用いて、ブタタンパク合成遺伝子をノックアウトし、その部位にヒトタンパク合成遺伝子を挿入することにより、ヒトのタンパクを合成する肝臓を持つブタを生産する必要がある。また、ヒトのタンパクを合成する肝臓を持つ形質転換ブタを生産できれば、アフレス治療法においても極めて有用である。そこで、我々は、ヒトアルブミン遺伝子と、マーカーである発光遺伝子 EGFP を連結した連結遺伝子を作製した。そして、培養細胞や、マウスにおける基礎実験を経て、東京大学農学部附属牧場において、細胞内精子注入（Intracellular sperm injection: ICSI）によりブタ未受精卵に受精と同時に上記遺伝子を導入する精子ベクター法による形質転換ブタ生産に取り組んできた。本研究の目的は、ヒト血清アルブミンを肝臓から産生する形質転換ブタを作出し、こうしたブタ肝臓を用いることにより、肝臓の最も重要な能力である代謝とタンパク合成の両方を発揮することのできる人工肝臓システムを開発し、肝不全患者の治療に用いることである。また、これらタンパクの経済的医療資源的コストを下げ、異種疫学的、医療資源的問題がなく、安価で大量生産できるヒトタンパクを用いる血液浄化療法としての肝不全の治療法を開発することである。</p>					

⑦研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

われわれ東京大学医学部人工臓器移植外科は、重症肝不全患者の治療法を開発する目的で、ブタ肝臓を用いた人工肝臓システムの開発や、血液透析濾過、血漿交換などの血液浄化療法の研究を行ってきた。

これまで、肝機能代替部として、ブタ肝細胞をポリエステル不織布に固定化した不織布充填式バイオリアクター、及び、ダイアフラム式人工心臓を組み込んだ独自の全肝収納装置を開発した。また、体外灌流法として、白血球吸着除去カラム、免疫グロブリン吸着カラム、肝機能代替部を、この順で接続することによって異種間の超急性拒絶反応を抑制しつつ、異種全血を肝機能代替部に直接灌流する異種全血直接灌流法を確立した。さらに、この方法を肝機能代替部の回路において生かしつつ、異種ウイルス感染を防ぐことのできる交差血漿灌流法を確立した。こうしたブタ肝臓を用いた人工肝臓が、タンパク合成能を発揮するためには、ヒトタンパク合成遺伝子を導入することにより、ヒトのタンパクを合成する肝臓を持つ形質転換ブタを生産する必要がある。

しかし一方で、ブタ肝臓には異種への心理的抵抗などの問題があり、血漿交換には医療資源の供給量の限界の問題がある。したがって、現時点では、血液透析濾過、及び、アルブミンや凝固因子などの有用ヒトタンパク投与を併用する血液浄化療法の、最も実用的な治療法と考えられる。そのためには、有用ヒトタンパクの経済的医療資源的コストを下げるのが重要な課題となるが、その方法としては有用ヒトタンパクを生産する形質転換ブタを作出することにより、異種疫学的、医療資源的問題がなく、安価で保存の効く肝不全の治療法を開発することが一つの将来性ある戦略である。

このように、人工肝臓であれ、血液透析濾過と有用ヒトタンパク投与を合わせた血液浄化療法であれ、肝不全の治療においては、有用ヒトタンパク供給法の開発が今後の重要な課題であり、そのためには有用ヒトタンパクを生産する形質転換ブタを作出することが有望な戦略である。そこで我々は、ヒトアルブミン遺伝子とオワンクラゲの発光遺伝子 EGFP を連結した全身発現性の遺伝子 pCX-HSA-EGFP を構築した。そして、マウスの繊維芽細胞 NIH3T3 への導入実験、及び、マウスの受精卵への前核注入による顕微注入法を用いた形質転換マウスへの導入実験において、EGFP 及びヒトアルブミンの導入と発現を認めた。そこで、東京大学農学部付属牧場において、精子ベクター法を用いてこの遺伝子を導入した形質転換ブタの作出を試みた。これは、導入用遺伝子と共培養したブタ精子をマイクロインジェクション法によりブタの未受精卵に注入して受精させ、受精と同時に遺伝子を導入した上で、得られた受精卵を仮親のブタ子宮に移植する方法である。その結果、平成 15 年度、蛍光により発光を示す形質転換ブタの産仔が 2 匹産まれ、これらは、死産または出生後早期に死亡したが、いずれも蛍光により明瞭な発光を示す形質転換ブタであることが判明した。平成 16 年度にかけて行なわれた全身臓器の遺伝子的検索により、ヒト血清アルブミンの導入と発現が認められた。リアルタイム RT-PCR により、各臓器の遺伝子発現量を解析したところ、ヒト血清アルブミンの発現量は、大動脈、肺、肝臓、子宮、皮膚、右前肢の筋肉、蹄、左前肢の筋肉、卵巣の順に発現量が高かった。

平成 16 年度には、精子ベクター法により 2 匹目の形質転換ブタが生まれ、これは短期間ながら生存していたので、体細胞（繊維芽細胞）を採取して冷凍保存した。そして、この細胞をドナーとして、核移植技術を用いて、ヒト血清アルブミン遺伝子が導入された形質転換ブタのクローン・ブタを生産した。その結果、平成 17 年度にかけて 12 匹のクローンブタを生産することに成功したが、どのブタも短命であり、生後 2 週間前後で死亡した。そこで、EGFP を除き、ヒト血清アルブミンのプロモーターと cDNA を連結した導入用遺伝子を現在構築中である。



形質転換ブタ 自然光

蛍光発光

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

我々は、これまで、ブタ肝臓を用いた人工肝臓システムの開発研究を行い、様々なシステムを検討してきたが、いかなる方法でも準備や運転管理に著しい労働力を要し、血液透析のような簡便さを獲得して医療現場に遍く広まるには解決困難な点が多いと考えられた。また、ブタ肝臓には、異種ウイルスなどによる感染の問題、異種タンパク流入の問題に加え、異種への心理的抵抗の問題があり、その点でも社会的な拒絶反応が予想されることから、今後臨床応用を目指すことは現実的でないと判断されつつある状況である。一方、血漿交換は、医療資源の供給量の限界の問題があるので、血液透析濾過と、アルブミンや凝固因子などの有用ヒトタンパク投与を合わせた血液浄化療法が、今後、最も実用的な治療法と考えられる。ヒト血清アルブミンの導入遺伝子であるpCX-HSA-EGFPを構築し、精子ベクター法を用いてこの遺伝子を導入した形質転換ブタを作出することは、将来性のある研究課題と言える。

ヒト血清アルブミンを生産する方法には幾つかの方法が考えられる。これまで主流となってきたのは、献血等で得たヒト血液をCohnの低温エタノール法により成分分画し、アルブミンを精製する方法である。しかし、この方法で得られるアルブミンはヒト血液製剤であり、新鮮凍結血漿と同様、ヒト血液資源の供給の上に成り立つもので、経済的乃至医療資源のコストが非常に高い。一方、形質転換技術を用いたリコンビナント・アルブミンとしては、国内では、三菱ウェルファーマ社が、形質転換酵母にヒト血清アルブミン遺伝子を導入して産生させる方法を完成し、すでに北海道の工場生産体制を確立し、短期臨床試験を終了しており、現在長期臨床試験を行っている。米国では、Genzyme Transgenic社がヒト血清アルブミンのcDNAをカゼインやラクトフェリンといった乳腺発現プロモーターと連結した遺伝子を構築し、これをヤギに導入してヒト血清アルブミンをヤギ乳汁中に分泌させることに成功した。しかし、量的に十分なアルブミンが採取できないことが問題で、改善の努力が続けられている。我々の方針は、ブタ血中にヒト血清アルブミンを分泌させようというものであるが、本来血清タンパクであるものをブタ血液に発現させる方針は、乳汁中に分泌させるGenzyme Transgenic社と比較して、量を得ることににおいてはより有望と考えられる。一方、酵母に生産させる三菱ウェルファーマ社の方法は、現時点で市場への供給まで具体的な見込みができており、研究開発の進行状況は他を大きくリードしていると言える。ブタに生産させる方法では総合的なコストをいかに下げるかが課題となるであろう。

一方、コストの低いヒト血清アルブミン投与と血液透析濾過の併用療法を普及させる上で、臨床医療経験を積むことは極めて重要である。血漿交換法においては、免疫グロブリンを除く必要のある免疫疾患やアルブミンの薬物結合能が重要な薬物中毒等の患者では、病的血漿を廃棄した後、補充液として新鮮凍結血漿ではなくアルブミン輸液が用いられる。我々は平成16年度、元々腎不全を持った患者が心臓手術を受け、その回復期に血清アルブミン値2.2であった際、血液透析濾過治療と併用してヒト血清アルブミン投与を行った。アルブミンの保険適応である2バイアル×3日間は長期的には十分量とは言えないが、投与方法によっては血圧が上昇しすぎることもあり、十分な注意が必要と考えられた。今後、患者を選んでアルブミン投与と血液透析濾過の併用療法の臨床経験を重ねて行きたいと考える。

本研究においては、ヒト血清タンパクを自らの血中へ分泌するブタ胚が個体発生し、形質転換ブタが出生に至るまで育ったことが大きな成果である。我々の戦略により、ヒト有用物質を生産する動物バイオリクターとして形質転換ブタを開発する具体的な展望ができた。このような形質転換ブタの系を樹立すれば、ブタの血漿分画製剤として安価に大量のヒトアルブミンが生産できる可能性がある。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

英文論文

Efficacy of xenogeneic direct hemoperfusion using whole swine liver for liver failure in dogs.

Naruse K, Sakai Y, Natori T, Guo L, Shindoh J, Michishita K, Iida Y, Makuuchi M.

Journal of Surgical Research. 111, 229-235, 2003

Development of a new extracorporeal whole liver perfusion system.

Naruse K, Sakai Y, Guo L, Natori T, Karasawa Y, Iida Y, Kojima K, Michishita K, Makuuchi M.

Journal of Artificial Organs. 6, 211-217, 2003

Efficacy of immunoabsorbent devices for maintaining hepatic function in ex vivo direct xenogeneic hemoperfusion.

Shindoh J, Naruse K, Sakai Y, Makuuchi M.

International Journal of Artificial Organs. 27, 294-302, 2004

○Production of a transgenic pig expressing human albumin and enhanced green fluorescent protein.

Naruse K, Ishikawa H, Kawano H, Ueda H, Kurome M, Miyazaki K, Endo M, Sawasaki T, Nagashima H, Makuuchi M.

Journal of Reproduction and Development. 51, 539-546, 2005.

○Development and perspectives of perfusion treatment for liver failure.

Naruse K, Nagashima H, Sakai Y, Kokudo N, Makuuchi M.

Surgery Today. 35, 507-517, 2005.

○Artificial liver support: future aspects

Naruse K.

Journal of Artificial Organs. 8, 71-76, 2005

和文論文

再生医療工学 工業調査会 2004年3月25日発行

65-70 免疫克服法

先端医療シリーズ 25 肝胆膵の最新治療 先端医療研究所

人工肝臓と医療用形質転換ブタの開発

成瀬勝俊、幕内雅敏

83-92, 2003

スタンダードとなり得る人工肝臓システムの開発

成瀬勝俊、幕内雅敏

現代医療 36, 135-142, 2004

人工肝臓

成瀬勝俊

人工臓器 32, 217-220, 2003

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

学会発表

Investigatuion of ultimate style for bioartificial liver support.
Naruse K, Sakai Y, Guo L, Natori T, Makuuchi M.
ASAIO (American Society for Artificial Internal Organs) / ISAO (International Society for Artificial Organs) joint conference
Jun. 19, 2003 (Washington, USA)

日本移植学会
2003/10/27, 28 大阪

日本人工臓器学会
2003/11/1 札幌

肝不全に対する実用的な血液浄化療法とは何か？
日本臓器保存生物医学会
2004/5/21 広島

人工肝補助療法 肝不全に対する血液浄化療法の開発
人工臓器教育セミナー 講演
2004/7/17 東京女子医科大学

明治大学シンポジウム 講演
2004/11/20 明治大学

肝不全に対する血液浄化療法
第21回日本医工学治療学会（東京） 2005年5月15日

その他

TV 医学教育番組出演
サイエンス・チャンネル「ドキュメント人工臓器 人工肝臓」
平成 17 年 4 月 18 日、4 月 25 日放送

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

特許申請(これまでの本研究における通算の申請)

(1) 発明の名称: 新規な人工臓器システム

発明者: 成瀬勝俊

出願国: 日本、米国、豪州、ARIPO 特許国、ユーラシア特許国、ヨーロッパ特許国、OAPI 特許国等

出願番号: 特願 2000-80131 出願日: 2000年3月22日

公開番号: 国際公開番号 WO01/070302

国際出願番号: PCT/JP01/02233

国際出願日: 2001年3月21日 国際公開日: 2001年9月27日 再公表特許出願番号: 特願 2001-568496

要約: 異種臓器を用いた人工臓器システムで、白血球除去装置及び免疫グロブリン除去装置を併用することにより、異種間の拒絶反応を回避しつつ全血直接灌流治療を可能にするシステム。

(2) 発明の名称: 手術台

発明者: 成瀬勝俊

出願国: 日本

出願番号: 特願 2000-327791 出願日: 2000年10月26日

公開番号: 特開 2002-126017 公開日: 2002年5月8日

要約: 手術患者の上半身が下半身より水平を保ったまま挙上されることにより腹部臓器が術者に十分に見えるようにし、その結果視野を改善する手術台。

(3) 発明の名称: 臓器収納装置を含む移植用臓器保存装置および該収納装置を含む人工臓器システム

発明者: 成瀬勝俊、酒井康行

出願国: 日本

出願番号: 特願 2001-401200 出願日: 2001年12月28日

公開番号: 特開 2003-206201 公開日: 2003年7月22日

要約: 移植用の肝臓、腎臓等の臓器を機能を発揮しうる状態で保持する肝臓収納装置を含む人工臓器システムの提供。

(4) 発明の名称: 新規な灌流法を用いる人工臓器システム

発明者: 成瀬勝俊

出願国: 日本

出願番号: 特願 2002-236760 出願日: 2002年8月15日

優先権主張番号: 特願 2001-401224 優先日: 2001年12月28日

公開番号: 特開 2003-250882 公開日: 2003年9月9日

要約: 患者血液循環回路と、異種臓器を用いた機能代替部の血液循環回路との間で、免疫グロブリン除去装置を併用して異種間の拒絶反応を回避しつつ、二本の血漿分離器を介して血漿交換を行う人工臓器システム。