

異種移植に関する基礎的研究

Basic Research on Xenotransplantation

高尾 尊身 (SONSHIN TAKAO)

鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進センター・教授



研究の概要

異種移植における超急性拒絶反応制御のためクラウン系ミニブタ胎児繊維芽細胞初代培養細胞で α -1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子をターゲットとするドナー細胞を作成し、核移植によるKOミニブタ作出を推進中である。ミニブタの内在性レトロウイルスに対して抗エイズ薬 AZT の活性型である AZT-TP は著明な阻害効果を示した。異種移植の急性・慢性拒絶反応に High mobility group box-1 の関与が示唆された。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体材料学

キーワード：異種移植、クローンミニブタ、 α -1,3-ガラクトース転移酵素、内在性レトロウイルス、HMGB-1、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景・動機

異種移植医療の実現は、ドナーの臓器不足を始めとする細胞や組織移植における材料提供、移植適応症の拡大など現在の移植医療の課題の解決に期待される。

2. 研究の目的

ミニブタの遺伝子改変による超急性拒絶反応の制御、内在性レトロウイルスの解析と制御による安全性の確保、急性・慢性拒絶反応機構の解析と制御など異種移植の基礎的研究に貢献することである。

3. 研究の方法

- ①核移植によるクローン胚作出
- ②Gene targeting 法によるドナー細胞作製
- ③ドナー細胞核移植でのKOミニブタ作製
- ④内在性レトロウイルス (PERV) の解析
- ⑤抗レトロウイルス薬剤の開発
- ⑥High mobility group box-1 (HMGB-1) の異種移植における拒絶反応への関与
- ⑦異種移植における免疫抑制機構の検討

4. これまでの成果

1) 遺伝子改変 (α GalT ノックアウト) ミニブタ作製進捗状況

①クローンミニブタ作製：超音波法で活性化した体細胞由来クローン胚を雌ブタへ移植した結果、平成17年10月に2頭のクローンミニブタ産仔が得られ、産仔と核移植に用いた線維芽細胞の遺伝子型はマイクロサテライト DNA マーカー12種の解析により全てが一致した。次いで、平成18年11月には、仮親として雌ミニブタを用いたクローンブタ作出に成功し、本技術の確立を確認した。さらに、このクローンミニブタ(雌)の発育は良好で、1年後に妊娠し、4頭を出産した(下図)。遺伝子改変クラウン系ミニブタの良好な繁殖性が示唆された。

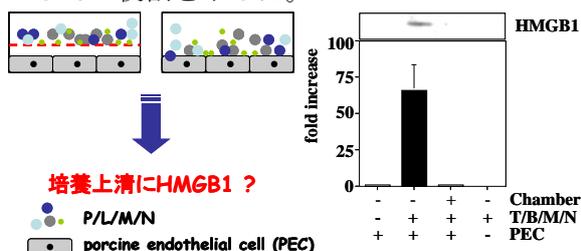


②初代培養細胞への遺伝子導入：ミニブタ初代線維芽細胞への新しい効率的遺伝子導入法（Nucleofector system）の開発
Nucleofection における遺伝子導入プログラムを用いた場合、生存細胞の 75%が GFP を発現し、electroporation 法(40-50%) や lipofection 法 (3-5%)と較べて高い効率で、本法が極めて優れていることを示した。さらに、EGFP 蛍光を強く発する pEGFP-N1 導入安定株をドナー細胞として核移植した結果、少なくとも 5%は、胚盤胞まで発生し、ドナー細胞由来の EGFP 発光を示す胚が得られた。ミニブタ初代線維芽細胞への新しい効率的遺伝子導入法であることが実証された。

③Gene targeting：ミニブタ初代培養線維芽細胞（PEF）を用いて α -1,3-ガラクトース転移酵素（ α GalT）を不活性化した細胞を作成するため、 α GalT gene targeting 用コンストラクトの基本設計、 α GalT のクローニング、targeting 用プラスミドの構築、PEF への遺伝子導入と導入 PEF の選別とクローン化を行っているが、目的の targeting 細胞は得られていない。

2) 内在性レトロウイルス（PERV）の解析と制御：抗エイズ薬 AZT の活性型である AZT-TP は、PERV RT に対しても HIV-1 RT と同等かそれ以上の阻害効果を有していたが、d4T の活性型である d4T-TP の PERV RT に対する作用は HIV-1 RT に対する作用よりも劣っていた。

3) High mobility group box-1(HMGB-1)の異種移植における拒絶反応への関与：各種白血球と HMGB1 との関係から T 細胞刺激によってブタ内皮細胞からの HMGB1 放出が認められた。すなわち、HMGB1 は移植局所での免疫応答のメディエーターとしての役割を示した。



5. これまでの進捗状況と今後の計画
クローンミニブタ作出技術の確立、クローンミニブタの繁殖能力を実証した。 α GalTKOミニブタの作出のためのドナー細胞作成が予定より遅れているが、内在性レトロウイルスと拒絶反応制御に関する基礎的検討は、概ね順調に進展している。20年度は、 α GalTKOミニブタ作製のドナー細胞作成を最優先課題として取り組んでいる。

6. これまでの発表論文等
(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. Activation and parthenogenetic development of pig Oocytes exposed to ultrasound in media containing different concentrations of Ca^{2+} . Miyoshi K, Fujimoto M, Mori K, Yoshida M. J Reprod Dev 54:42-45, 2008
2. HMGB1 release in co-cultures of porcine endothelial and human T cells. Kawahara K, Setoyama K, Kikuchi K, Biswas KK, Kamimura R, Iwata M, Ito T, Morimoto Y, Hashiguchi T, **Takao S**, Maruyama I. Xenotransplantation 14:636-641, 2007
3. Efficient transfection of primarily cultured porcine embryonic fibroblasts using the Amaxa nucleofection systemTM. Nakayama A, Matsubara S, Sato M, Yokomine T, Akasaka E, Fujiyoshi T, **Takao S**. Cloning and Stem Cell, 9, 523-534, 2007
4. Selective inhibition of porcine endogenous retrovirus (PERV) replication in human cells by acyclic nucleoside phosphonates. Shi M, Wang X, Clercq ED, **Takao S**, Baba M. Antimicrob. Agents Chemother. 51:2600-2604, 2007

ホームページ等
<http://www.xenotransplantation.fsrc.jp>