

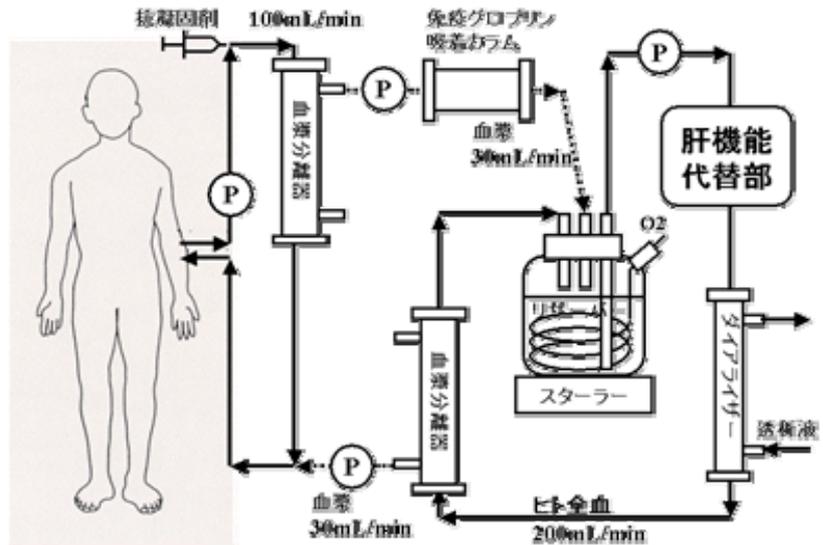
平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな（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 a transgenic pig for the use of bioartificial liver					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		32,100	29,500	29,800	0	0	91,400
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
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		研究全体の総括、総合評価	
成瀬 勝俊		東京大学・医学部附属病院・助手		消化器外科		遺伝子構築、ブタ手術	
長嶋 比呂志		明治大学・農学部・教授		畜産学		ブタ胚の遺伝子導入、クローン・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>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、血漿交換などの血液浄化療法の研究を行ってきた。これらの治療法においては、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、人工肝臓装置においても、血液浄化療法においても極めて有用である。そこで、まず、ヒト血清アルブミンを産生する形質転換ブタを作出する目的で、全身臓器発現性プロモーター、ヒト血清アルブミン遺伝子、そして、クラゲの発光遺伝子 EGFP を連結した連結遺伝子 pCX-HSA-EGFP の構築を行った。NIH3T3 培養細胞の導入実験では、発光とヒトアルブミン mRNA の発現を認めた。さらに、マウス受精卵にこの遺伝子を顕微注入したところ、遺伝子導入マウスが3匹得られた。そこで、東京大学農学部附属牧場および明治大学農学部附属農場において、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、in vitro において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。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これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

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開発した。一方、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

(図)を確立した。一方、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。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、東京大学農学部附属牧場において、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。そして、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 年度は、2 匹目の短期間ながら生存していたブタから採取して冷凍保存した体細胞（繊維芽細胞）をドナーとして、核移植技術により、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。これは多数出生したが、どのブタも非常に短命であり、生後 1 週間前後で死亡した。そこで、EGFP を除いた pCX-HAS を導入遺伝子として、形質転換ブタ生産を試みている。

⑧特記事項 (これまで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、学問的・学術的なインパクト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。したがって、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。

平成 15 年、東京大学農学部附属牧場において、pCX-HSA-EGFP を導入した形質転換ブタの最初の産仔が生まれ、死産ではあったが、蛍光により明瞭な発光を示し、全身臓器の遺伝子的検索により、ヒト血清アルブミンと EGFP の導入と発現が認める形質転換ブタであることが判明した。この形質転換ブタ作出の意義は、異種タンパクを自らの血中へ分泌するブタ胚が個体発生し、出生に至るまで育ったことである。また、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。人工肝臓の場合、導入遺伝子が肝臓で発現しているかどうか重要であるが、この例では、他臓器と比較して、肝臓におけるヒトアルブミン遺伝子の十分な発現が認められた。

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、学会等における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

○Production of a transgenic pig expressing human albumin and EGFP.

Naruse K, Nagashima H, Ishikawa H, Miyazaki K, Kurome M, Ueda H, Sawasaki T,

Makuuchi M. Journal of Reproduction and Development. In press.

○History and perspectives of perfusion treatment for liver failure.

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

Surgery Today. In press.

和文論文

○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

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（講師）

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

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