

# 遺伝子操作による臓器移植のための低免疫原性豚の作成

(課題番号 14370374)

平成14年度～15年度科学研究費補助金(基盤研究 B(2))  
研究成果報告書

平成16年3月

研究代表者 大河内 信弘  
(筑波大学臨床医学系教授)

## 目 次

	ページ
1. はしがき	1
2. 研究組織	2
3. 研究経費	3
4. 研究発表	4
5. 研究背景	5
6. 研究目的	6
7. 研究の独創性	7
8. 研究の意義・位置づけ	8
9. 申請書における研究計画	9
10. 実用化の見通しと社会的貢献度	12
11. 予測される研究結果	13
12. 研究結果の要旨	16
13. 行った研究の方法・結果・考察	17
a. 異種抗原ノックアウトブタ作成の試み	
b. ブタ異種抗原転移酵素に対するアンチセンス RNA 導入によるブタ細胞の異種抗原抑制の試み	
14. 発表論文	61

## はしがき

重症臓器不全に対する治療は今の所臓器移植以外には見当たらない。しかし、生体肝移植は適応が限られ提供者への負担が大きく、また、脳死移植は開始されたばかりで提供者はまだ数十名にとどまっており、医療として定着するまでにはかなり時間を要する。脳死移植が盛んに行われている欧米においても提供者不足はやはり深刻な問題であり、提供者不足の解決策を確立することは世界的にみても急務である。これらの提供臓器の不足に対してヒヒ、チンパンジー、豚などの動物、いわゆる異種移植の研究が盛んに行われている。臨床ではこれまでも米国において5名の異種肝移植が行われているがすべてが拒絶反応で死亡している。最も異種移植として可能性が高いインスリン依存性糖尿病（IDDM）に対する治療として豚の膵臓のランゲルハンス細胞（ラ島）移植が、スウェーデンにおいてヒト10例に対して行われた。しかし、豚ラ島はヒトにおいて長期間生着するもののインスリン投与から離脱できず拒絶反応が必発であり、いまだ trial の域を脱していない。このようにドナー動物としてブタが最も有望とされているが、ブタからヒトへの異種移植においてはヒト抗異種反応性自然抗体および補体によって引き起こされる超急性拒絶反応が大きな障壁となっている。この超急性拒絶反応を抑制するためには異種抗原（galactose  $\alpha$  - 1,3 - galactose）を消去または減少させることが必要不可欠である。そこで本研究では、この細胞表面に存在する異種抗原を合成する転換酵素（ $\alpha$  - 1,3 - galactosyltransferase）のアンチセンス RNA ベクターを作成し、ブタ細胞への遺伝子導入を試みた。その結果、一過性発現ではあるが、ブタ細胞の異種抗原を減弱させられることが明らかになった。本研究の結果は異種移植の扉を開く上で遺伝子操作による抗原性を低下させるという新しい試みの第一歩を記したものである。

## 研究組織

### 平成 14 年度

- 研究代表者：大河内信弘（筑波大学臨床医学系 教授）
- 研究分担者：佐藤 英明（東北大学農学部 教授）
- 研究分担者：安江 博（農業生物資源研究所 ゲノム研究グループ 上席研究官）
- 研究分担者：里見 進（東北大学大学院医学研究科 教授）
- 研究分担者：土井 秀之（東北大学医学部附属病院 講師）
- 研究分担者：小山田 尚（東北大学医学部附属病院 助手）
- 研究分担者：川岸 直樹（東北大学医学部附属病院 助手）

### 平成 15 年度

- 研究代表者：大河内信弘（筑波大学臨床医学系 教授）
- 研究分担者：安江 博（農林水産農省生物資源研究所 上席研究官）
- 研究分担者：佐藤英明（東北大学農学部動物生殖科学科 教授）
- 研究分担者：湯沢賢治（筑波大学臨床医学系 講師）

### 研究経費（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	5,000 千円	0 円	5,000 千円
平成15年度	5,400 千円	0 円	5,400 千円
総計	10,400 千円	0 円	10,400 千円

## 研究発表

学会発表

無し

論文発表

1. 小ヶ口恭介、白幡 康弘、里見 進、大河内信弘、安江 博：ブタ異種抗原転移酵素に対するアンチセンス RNA 導入によるブタ細胞の異種抗原抑制の試み. 移植 38 巻 327-332. 2003

## 研究背景

本邦において肝硬変をはじめとする重症肝疾患で死亡する患者は年間3万人を越え、その80%をしめるC型肝炎患者は全国で300万人にのぼる。インターフェロン療法も期待されたほどの効果は得られず、現在にとりどころ末期肝疾患に対しての有効な治療は肝移植のみであるが、生体肝移植は小児が大部分をしめており、成人では適応が限られ、また、脳死肝移植は開始されたばかりで提供者はまだ数名にとどまっており、医療として定着するまでにはかなり時間を要する。脳死肝移植が盛んに行われている欧米においても提供者不足はやはり深刻な問題であり、提供者不足の解決策を確立することは世界的にみても急務である。これらの提供臓器の不足に対してヒヒ、チンパンジー、豚などの動物、いわゆる異種移植の研究が盛んに行われている。臨床ではこれまでも米国において5名の異種肝移植が行われているがすべてが拒絶反応で死亡している。最も異種移植として可能性が高いインスリン依存性糖尿病（IDDM）に対する治療として豚の膵臓のランゲルハンス細胞（ラ島）移植が、スウェーデンにおいてヒト10例に対して行われた。しかし、豚ラ島はヒトにおいて長期間生着するもののインスリン投与から離脱できず拒絶反応が必発であり、いまだtrialの域を脱していない。

## 研究目的

今回申請する研究の概要および目的は、下記に示す我々の研究結果にもとづき、i) 豚の細胞表面の液性免疫のターゲットとなる糖鎖抗原(?1,3galactose)を knock out する gene vector、および移植される豚の臓器の持つホストのヒト-リンパ球に対する細胞性免疫原性を低下させる CTLA4 Ig の gene vector を各々作成し、ii) これらの gene vector を豚胚性幹細胞 (ES 細胞) にレーザー遺伝子導入装置を用いて遺伝子導入を行い、iii) その 2 種類の遺伝子を導入された細胞を用いて受精卵に核移植を行い、iv) 異種動物のヒト自然抗体に対する抗原性と抗原-抗体反応による細胞性免疫原性を低下させた、つまり豚細胞に対するヒト液性抗体による免疫反応とヒト T 細胞による細胞性免疫反応の両者を抑制した臓器を持つ豚の作製を目的とする。最終目標としては豚からヒトへの膵臓、肝臓の異種臓器移植を可能にすることである。



## 本研究の学術的な特色・独創的な点

- 1.異種の移植臓器のヒトに対する液性免疫抗原ならびに細胞性免疫原性の両者を抑制する点に特色がある
- 2.遺伝子操作を行うターゲット細胞に胎児幹細胞を用いる点に特色がある
- 3.胎児幹細胞は非常に脆弱であるため低侵襲、無感染性でかつ導入効率の高い遺伝子導入法であるレーザー光を用いた遺伝子導入法を使用する点が独創的である

## 本研究の位置づけと意義

英国において異種移植を可能にするべく豚に遺伝子導入を行い、ヒト補体の活性化を抑制することが試みられたが、実際に豚からヒトへ移植を行うところまでは至っていない。また異種移植において超急性拒絶反応の原因である細胞表面の糖鎖抗原である $\alpha$ 1,3galactose を knock out したマウスの作製は報告されているが、豚のような大動物での成功はいまだ報告がない。本研究の目的である遺伝子操作により豚のもつヒト液性免疫に対する抗原性と、抗原-抗体反応による細胞性免疫原性を低下させた、言いかえるならばヒト液性抗体による免疫反応とヒトT細胞による細胞性免疫反応をともに抑制した臓器を持つ豚の作製が可能になれば、豚からヒトへの膵臓、肝臓の異種臓器移植を可能になり、提供者を待つことが不要となり移植医療に新たな展開をもたらし、移植を待つ患者に大きな福音をもたらす。

## 研究計画

平成 14 年度

### A ジーンターゲティングのための基礎的実験

a) ヒト液性免疫反応（超急性拒絶反応）を抑えるための gene vector の作製

1) BAC ライブラリーからの細胞表面糖鎖抗原表質酵素遺伝子 ( $\alpha$ -1,3-galactose) の単離 (大河内、安江分担) :

細胞表面糖鎖抗原表質酵素 ( $\alpha$ -1,3-galactose 以下  $\alpha$ -1,3-GT と略す) の生体における機能を欠損させるため、当該遺伝子を含むゲノム DNA フラグメントのサブクローニングを行う。まず BAC ライブラリーを当該遺伝子の配列を用いてスクリーニングし、 $\alpha$ -1,3-GT を含んだゲノム DNA 断片を獲得する。

2)  $\alpha$ -1,3-GT の遺伝子地図の作製と解析 (大河内、安江分担) :

当該遺伝子について、配列および制限酵素の部位等を特定するため、獲得した  $\alpha$ -1,3-GT ゲノム DNA をさらに短いフラグメントに分割してサブクローニングする。 $\alpha$ -1,3-GT の既知の配列より、数種類のプライマーを設定し、その組み合わせによる PCR プロダクトをクローニングベクターに組み込んでサブクローニングする。

3)  $\alpha$ -1,3-GT knock out のためのターゲティングベクターの作製 (大河内、土井分担) :

$\alpha$ -1,3-GT タンパク質の活性中心をコードする部分は当該遺伝子のエクソン 9 上に存在する。この部分をジーンターゲティング法にて欠損させれば、 $\alpha$ -1,3-GT タンパク質の生物学的活性を消失でき得ると考えられる。具体的には、 $\alpha$ -1,3-GT のエクソン 9 の一部を除いた DNA 断片を、ネオマイシン耐性遺伝子の両端を挟むように接続し、エクソン 9 をネオマイシン耐性遺伝子で置換することにより、 $\alpha$ -1,3-GT タンパク質の活性中心を欠損した組み換え遺伝子を構築する。実験 A-2) で作製したベクター中の DNA フラグメントを単純ヘルペスウイルス由来の thymidine kinase を組み込んだプラスミドベクター内に挿入する。一連の遺伝子操作に於いては、制限酵素・T4 DNA リガーゼ等を用いて DNA の切断・接着を行う。

b) ヒト細胞性免疫反応（細胞性急性拒絶反応）を抑えるための gene vector の作製

4) ヒト T 細胞の免疫能抑制のための CTLA4Ig の gene vector の作成 (安江、土井分担) :

ヒト T 細胞 CD28 を活性化するリガンドである B7 に対する、もう一つのリガンドであり、ヒト T 細胞の細胞性免疫反応の抑制作用をもつ CTLA4Ig の gene vector を作製する。本実験の目的は豚の種々の細胞、特に血管内皮細胞や肝細胞に CTLA4Ig を発現、産生させ、この豚の細胞から産生される CTLA4Ig により豚細胞に発現している B7 をマスクさせ、移植後のヒト T 細胞の CD28 を活性化を

抑制することにある。この CTLA4Ig gene vector 作製に当たっては国立小児医療研究センターの協力の下に行う。

平成16年度

#### B 遺伝子組み換え低免疫原性豚の作製

##### 1) ターゲティングベクターの細胞内導入 (大河内、佐藤、土井分担) :

作製した2種類のターゲティングベクターをすでに cell line 化した豚胚性幹細胞細胞内(ES細胞)に遺伝子を導入する。これらのベクターを細胞内に導入することによって、ベクターは核内に移行し相同組み換えを起こして取り込まれる。本実験においてベクターを脆弱なES細胞内に導入する方法として、我々が開発したレーザー光を用いた遺伝子導入装置を用いるが、この遺伝子導入法は最も効率的に安定した結果が得られ、かつウィルスを用いないため感染症面からみても安全である。本実験においてレーザー光発信量の微調整が必要なため digital display laser pulse generator を備品として申請した。

##### 2) 遺伝子欠損/導入ES細胞の選別と分離 (土井、佐藤分担) :

$\alpha$ -1,3-GT gene が knock out され、かつ CTLA4Ig gene が transduction がなされたか否かを、ネオマイシン・ガンシクロビル等の薬剤を加えた培地で細胞を培養する過程において選別する。本実験を行うに当たってはDNAの $\alpha$ -1,3-GTの knock out ならびに CTLA4Ig の gene transduction を確認する作業を、より効率よく行うためリアルタイムPCR解析システムを備品として申請した。

##### 3) $\alpha$ -1,3-GT gene knock out- CTLA4Ig gene transduction ES細胞のヒトリンパ球に対する免疫原性の検討 (土井、小山田分担) :

$\alpha$ -1,3-GT および CTLA4Ig 抗体を用いて遺伝子操作ES細胞において $\alpha$ -1,3-GTが細胞表面に表出していないこと、CTLA4Igを産生していることを、免疫染色にて確認する。この遺伝子操作低免疫原性ES細胞とヒトBリンパ球およびヒトTリンパ球と混合培養を行い、ヒトBリンパ球の自然抗体の産生能およびヒトT細胞の cytotoxic 活性の変化について検討し、本細胞の低免疫原性を確認する。

##### 4) 核移植による組み換え動物の作成と飼育 (大河内、佐藤分担) :

$\alpha$ -1,3-GT knock out かつ CTLA4Ig gene が transduction されたES細胞を培養、増殖させた後、除核受精卵に核移植を行う。この核移植した細胞を豚の仮親へ移植、着床させ、豚を育成する。

##### 5) 低免疫原性豚からサルへの臓器、器官の移植 (大河内、里見、織井、小山田分担) :

育成された低免疫原性豚の肝臓、膵臓、ランゲルハンス島をヒトとほぼ同じ免疫反応を示すサルへ移植を行い免疫学的変化を無処置豚肝と比較検討する。

以上に示したAの(1) ? (4)、ならびにBの(1) ? (5)の実験を行うことにより、本研究の目的である『遺伝子操作による臓器移植のための低免疫原性豚の作成(液

性免疫原性抑制のための異種糖鎖抗原 knock out gene vector ならびに細胞性免疫原性抑制のための CTLA4Ig gene vector の作成、胎児幹細胞に対するレーザー照射による gene vector の導入、ならびに遺伝子操作低免疫原性胎児幹細胞から豚を育成により異種臓器移植を可能にする研究)』が遂行され、期待される成果があげられるものと考えられる。

## 実用化の見通しと社会的貢献度

本邦において肝硬変をはじめとする重症肝疾患で死亡する患者は年間3万人を越え、C型肝炎患者は全国で300万人にのぼる。末期肝疾患に対しての有効な治療として唯一肝移植があげられるが、わが国で行われているのは生体肝移植が大部分であり成人では適応が限られ、また、脳死肝移植は開始されたばかりで医療として定着するまでにはかなり時間を要する。脳死肝移植が盛んに行われている欧米においても提供者不足はやはり深刻な問題であり、重症肝疾患に対する治療の確立という意味で提供者不足の解決策を確立することは世界的にみても急務である。これまで米国において5例の異種移植が行われているがすべて急性拒絶反応で死亡している。英国において異種移植を可能にするべく豚に遺伝子導入を行い、ヒト補体の活性化を抑制することが試みられ補体活性化遺伝子の knock out 豚の作成は成功したものの、補体抑制、つまり凝固系の抑制だけでは豚からヒトへ移植をおこなうにまでは至らなかった。本研究の目的は豚の肝臓における免疫反応の中心である細胞表面抗原とマクロファージ細胞の抗原提示能を double knock out し、その遺伝子導入核移植胚細胞を人工授精、育成して豚肝を猿に移植、最終的には豚からヒトへの異種肝移植を可能にしようとするものである。本研究で組織したスタッフは豚ゲノムの分析、gene vector の作成、核移植、豚胚性幹細胞培養の各々の分野においてスペシャリストであり、これまでの研究実績、設備状況から判断して、十分に研究の目的を達成できると考えられる。本研究の成果はこれまで滞っていた異種移植の臨床応用の分野に新しい方向性を開くことになり、肝移植を望む全世界の患者に福音をもたらすことは間違いない。

### [研究組織を(1)でする理由]

- ・豚の gene の sequence の供与に関しては、豚の全 gene の sequence をこれまで最も多く解析し、実績を持っている農林水産省生物資源研究所の協力が本研究を進めるに当たっては必要不可欠である。
- ・double knock out gene vector の作成は当教室で行い、移植実験、ならびに免疫反応の変化についても当教室で行う。
- ・knock out 豚の作成は胎児幹細胞に gene vector を遺伝子導入し、核移植の後人工授精を行うという動物の生殖を扱うことに習熟した研究機関、すなわち東北大学農学部動物生殖科学との協力が本研究を進めるに当たっては必要不可欠である。

## 予想される結果

我々はこれまでに 1) 豚からヒトへの移植を行った場合の問題点として、超急性拒絶反応の原因となる豚の細胞表面の糖鎖抗原(?1,3galactose)に対するヒトのB細胞のなかの自然抗体産生細胞は生体内に均一に分布していること、その抗体産生能に部位別の差がみられないこと (Gotoh et al. Transplant. Proc., 1999) を明らかにした。2) 細胞性免疫を担うヒトT細胞の豚異種抗原(class I, II)への細胞性障害反応を検討しヒトの class I, II と同様な細胞性障害反応を示すことを明らかにした (Kawagishi et al. Xenotransplantation, 1997, Kawagishi et al. Transplant. Proc., 2000)。3) この糖鎖抗原を人工的に大量に作り出す方法を開発し(Haga et al, Transplant. Proc., 1999)、ヒトの異種抗原への抗体の中和を試みたが非常に高価となるため実用化は難しいと判断された。4) 異種移植において移植直後の超急性拒絶反応を抑えれば、その後の急性拒絶反応は各種薬剤にてコントロール可能であり移植臓器の生着が著名に延長することを明らかにした (Koyamada et al. Transplantation, 1996)。5) 急性拒絶反応の起こるメカニズムとして移植される肝臓のマクロファージが重要な機能を果たしており、マクロファージの機能をあらかじめ抑制しておくこと拒絶反応がおこらず生着が半永久的に延びることを明らかにした (Akamatsu et al. Transplant. Proc., 1998)。6) マクロファージの機能抑制方法として mRNA のアンチ・センスを用いる方法が非常に有効であること (平成9年度文部省科研費) を報告してきた。また、遺伝子操作による Stat3 knock out マウスの作成にも成功している (Akaishi et al, International Immuno 1998)。7) 豚胚性幹細胞もすでに cell line 化しており、心筋への分化誘導にも成功している (Miyoshi et al. Biol. Reproduc., in press)。8) 細胞に対する確実かつ低侵襲な gene vector 導入システムとしてレーザーを用いた遺伝子導入法を確立した (Shirahata et al. J Exp Med., in press)。また、9) 細胞性免疫を活性化する際、TCR CD3 以外に CD28 と B7 の costimulatory pathway が重要な働きを示しており、B7 のリガンドである CTLA4 Ig を投与することにより細胞性免疫の活性化が抑えられ、allo 移植が著名に延長することが近年報告されている。以上の結果から i) 豚の細胞表面の免疫のターゲットとなる糖鎖抗原(?1,3galactose)を knock out する gene vector、および移植される豚の臓器の、ホストのヒトリンパ球に対する免疫原性を低下させる CTLA4 Ig の gene vector を各々作成し、ii) これらの gene vector を豚胚性幹細胞(BS細胞)にレーザー遺伝子導入装置を用いて遺伝子導入を行い、iii) その2種類の遺伝子を導入された細胞を用いて受精卵に核移植を行い、vi) 豚細胞に対するヒト液性抗体による免疫反応とヒトT細胞による細胞性免疫反応の両者を抑制した臓器を持つ豚の作製が可能になると考えられる。

本研究に関してこれまでに研究代表者ならびに研究協力者が得た研究成果:

豚異種抗原に対するヒトの液性ならびに細胞性免疫反応について

- 1) 豚からヒトへの移植を行った場合の問題点として、超急性拒絶反応の原因となる豚の細胞表面の糖鎖抗原(?1,3galactose)に対する自然抗体産生細胞であるヒトの B 細胞は、臓器特異的に分布することなくリンパ節、脾臓などに均一に分布し、比較的末梢血に多く存在すること、また当然のことではあるが糖鎖抗原に対する抗体産能は自然抗体産生 B 細胞において著明に高いことを明らかにした(平成 11 年度文部省科研費、Gotoh et al, Transplant. Proc.,1999)。
- 2) 細胞性免疫を担うヒト T 細胞の豚異種抗原への反応性を検討し、II-2 レセプターをブロックすることによりヒト T 細胞の活性化、NK 細胞の活性化が阻害されることを明らかにした(平成 10 年度厚生省科研費、Kawagishi et al, Xenotransplantation, 1997)。加えて、豚の肝臓の血管内皮細胞及び Kupffer 細胞の持つヒト T cell receptor に対する抗原が、移植後のヒト T 細胞の活性化に深く関与していることを明らかにした(Kawagishi et al, Transplant Proc, 2000)。
- 3) 糖鎖抗原を人工的に安価で大量に作り出す化学合成法を開発した(Haga et al, Transplant. Proc.,1999)。現在本法で作成した糖鎖抗原をサルに投与し既存するサル抗豚自然抗体を中和した後、豚の肝臓を移植した実験を行い、移植後の免疫反応について検討中である。しかし、非常にコストが高いため臨床応用は難しいと考えられる。

異種移植における超急性拒絶反応の発生機序とその予防方法について

- 4) ハムスターからラットへの異種移植(心臓移植)において自然抗体により惹起される超急性拒絶反応を、レシピエントへの抗癌剤移植前投与ならびに脾臓摘出により抑制すると、その後起こる急性拒絶反応は種々の薬剤により抑えることが可能になり、移植臓器の生着が延長することを明らかにした(平成 11 年度文部省科研費、Koyamada et al, Transplantation, 1996, Takayama et al, Transplant Proc., 1999, 2000)。
- 5) 急性拒絶反応の起こるメカニズムとして、移植される肝臓のマクロファージが重要な機能を果たしており、マクロファージの抗原提示機能をあらかじめ抑制しておくこと拒絶反応がおこらずラット肝移植においては生着が半永久的に延びることを明らかにした(平成 11 年度文部省科研費、Akamatsu et al, Transplant. Proc. 1998, Akamatsu et al, Transplantation,1999)。

動物臓器、細胞への遺伝子操作法について

- 6) 遺伝子治療ならびに knock out 動物の作成マクロファージの機能抑制方法として mRNA のアンチ・センスを用いる遺伝子による方法が非常に有効であること(平成 9 年度文部省科研費)を明らかにした。また、当教室では遺伝子操作による Stat3 knock out マウスの作成に成功している(Akaishi et al, International Immuno 1998)。加えて本研究の特徴である感染性のない、導入効率の高いレーザー光を用いた種々の細胞



への遺伝子導入法を確立し(平成 3、4、7、8、10、11、12 年度文部省科研費、Ohkohchi et al, Lasers in Surg Med, 2000, Shirahata et al. J Exp Med, in press)、常時使用可能な状態である。

豚胚性幹細胞(ES 細胞)の cell line 化について

- 7) 分担研究者の佐藤らはすでに豚胚性幹細胞(ES 細胞)の cell line 化しており、心筋細胞への分化誘導に成功している(Miyoshi et al. Biol Reprod., in press)。

## 研究結果の要旨

### 和文要約

移植医療の問題点の一つである移植臓器不足の解決法のひとつとして、異種動物からヒトへ臓器を移植する異種移植が挙げられる。このドナー動物としてブタが最も有望とされているが、ブタからヒトへの異種移植においてはヒト抗異種反応性自然抗体および補体によって引き起こされる超急性拒絶反応が大きな障壁となっている。この超急性拒絶反応を抑制するためには異種抗原 (galactose  $\alpha$  - 1,3 - galactose) を消去または減少させることが必要不可欠である。そこで本研究では、この細胞表面に存在する異種抗原を合成する転換酵素 ( $\alpha$  - 1,3 - galactosyltransferase) のアンチセンス RNA ベクターを作成し、ブタ細胞への遺伝子導入を試みた。その結果、一過性発現ではあるが、ブタ細胞の異種抗原を減弱させられることが明らかになった。以上の結果より、遺伝子導入によりアンチセンス RNA を発現させ  $\alpha$  - 1,3 - galactosyltransferase タンパクの翻訳を阻害する方法は、超急性拒絶反応を抑制する手段の一つとなることが示唆された。

### 英文要約

Objective: In pig-to-human xenotransplantation, the hyperacute rejection triggered by human xenoreactive natural antibody and complement is a big barrier. In order to control this hyperacute rejection, we studied whether the antisense RNA vector could decrease the major xenoantigen galactose  $\alpha$ -1,3-galactose.

Methods: We created the antisense  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase RNA vector, transfected to a pig cell and analyzed the porcine xenoantigen.

Result: Although it was transient expression, it was able to decrease the xenoantigen of a pig cell.

Conclusion: The method that expressed an antisense RNA by transfection and prevented translation of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase protein has a possibility that would be one of the means to control hyperacute rejection.

Key words: porcine xenoantigen,  $\alpha$  - 1,3 - galactosyltransferase, antisense RNA

本科学研究費を用いて行った研究の方法・結果・考察

## a) 異種抗原ノックアウトブタ作成の試み

### I. 目的

ブタからヒトへの異種移植においてはヒト抗異種反応性自然抗体および補体によって引き起こされる超急性拒絶反応が大きな障壁となっている。この超急性拒絶反応を抑制するためには異種抗原 (galactose  $\alpha$  - 1,3 - galactose) を消去または減少させることが必要不可欠である。そこで、この細胞表面に存在する異種抗原を合成する転移酵素 ( $\alpha$  - 1,3 - galactosyltransferase) の遺伝子ノックアウトブタの作製を目指した。

## II. 方法

### 1. ターゲティングベクター作製

ブタ  $\alpha$  - 1,3 - galactosyltransferase 遺伝子は9つの exon から成っており exon 4, 5 が stem region, exon 8, 9 が catalytic region を coding している. 活性部位(catalytic region)を coding している exon 8, 9 のうち exon 8 を落としているので, まず活性はほぼ抑制されると考え, exon 6, 7, 8 を knock out したターゲティングベクターを作製することとした.

まず, ブタ  $\alpha$  - 1,3 - galactosyltransferase 遺伝子(GGTA1)の cDNA をもとにプライマーを設定し, ブタ大動脈内皮細胞より RT-PCR により cDNA を合成. これをプローブに農業生物研究所ゲノム研究グループに依頼しブタ BAC を取得.

cDNA 上にプライマーを設定し genomicDNA で PCR 法, 制限酵素で制限酵素地図を作成. exon 4 と exon 7 間での PCR で約 8.8kbp のフラグメント得られたのでこれを pT7blue vector に ligation し E.coli を用いて sub cloning. このフラグメントで制限酵素部位を探し, EcoRI で切断し得られた 5kbp のフラグメントを long arm にした. long arm を pBluescript II ks+ vector の multiple cloning site の EcoRI site に挿入した. 一方, exon 8 と exon 9 間での PCR で約 5kbp のフラグメント得られたのでこれを pT7blue vector に ligation し sub cloning. これを BamHI で 2kbp のフラグメントを pBluescript II ks+ vector の BamHI site に ligation し sub cloning. secquence を行い 2kbp のフラグメント上に内側方向に 5'側から各々 XhoI, SalI site を付加したプライマーを作成し PCR で増幅し short arm にした. ポジティブセレクションマーカーに pMC1 - neo カセットをネガティブセレクションマーカーに HSV-TK を用いた. pBluescript II ks+ vector の multiple cloning site に各々を ligation. SalI で linear になる形にした. sub cloning , ligation のおのおのの段階で secquence で確認した.

### 2. 遺伝子導入に用いた細胞

ブタ脱出胚盤胞由来細胞 (東北大学大学院農学系研究科動物生殖学分野より供与) は Dulbecco's modified Eagle's medium(以下 DMEM)(Life Technologies, Inc., Rockville, MD), 20% fetal bovine serum(以下 FBS)(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 50U/ml ペニシリン G カリウム(BANYU PHARMACHEUTICAL CO., LTD., Tokyo, Japan), 50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン(MEIJI SEIKA KAISHA, LTD., Tokyo, Japan), 1mM Glutamine(Life Technologies), 0.1mM 2-メルカプトエタノール(Life Technologies), 0.1mM MEM 非必須アミノ酸溶液(ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH), ヌクレオシド溶液[0.03mM アデノシン(Sigma), 0.03mM グアノシン(Sigma), 0.03mM シチジン(Sigma), 0.03mM ウリジン(Sigma), 0.01mM チミジン(Sigma)] , 1000IU/ml recombinant mouse leukemia inhibitory

factor(CHEMICON International, Inc., Temecula, CA)の培地(pH 7.2)で培養した.

### 3. 遺伝子導入ならびに選別

東北大農学部動物生殖学講座, 佐藤英明教授のもとでブタ脱出胚盤胞由来細胞に遺伝子導入を行った. 遺伝子導入法は electroporation で行い, neomycin(G418) 250  $\mu$ g/ml による positive selection と gancyclovir(GANC) 8  $\mu$ M による negative selection をおこなった.

### 4. genomic DNA の抽出

SepaGene(三光純薬)を用い culture した細胞より genomic DNA を抽出した.

### 5. PCR 分析

genomic DNA 2  $\mu$ l を ampliTaq DNA polymerase(Applied Biosystems, Foster City, CA) 1U, 1mM each dNTPs, 1 $\times$ Taq reaction buffer, 1mM MgCl<sub>2</sub>, プライマーをそれぞれ 0.8  $\mu$ M で全量 50  $\mu$ l とし PCR を 85 $^{\circ}$ C 5 分, (94 $^{\circ}$ C 30 秒, 62 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 2 分)を 40 サイクル, 72 $^{\circ}$ C 10 分で行った. プライマーは ターゲティングベクターで反応する組み合わせを 1 種類, recombination が起こった mutated allele で反応する組み合わせを 2 種類で行った. PCR 産物 5  $\mu$ l をエチジウムブロマイド含有 2%アガロースゲルに電気泳動し, 紫外線下で観察した.

### 6. southern 分析

genomic DNA 25  $\mu$ g を BamHI で制限酵素処理を行い, エチジウムブロマイド含有 1.5%アガロースゲルに電気泳動した. membrane に transfer させ, 予め作成しておいた exon9 probe を用いて RI 法にて hybridization をおこなった. <sup>32</sup>P ならびに Klenow enzyme を使用した.

### III. 結果

#### 1. ターゲティングベクター作製

図1の通りターゲティングベクターを作製した。

#### 2. 遺伝子導入ならびに選別

3回の electroporation を行い, single colony を culture し, 計9クローンを得た。

#### 3. PCR 分析

図2に2クローンの結果を示す。ターゲティングベクターで反応するプライマーの組み合わせではバンドを認めたが, mutated allele で反応するプライマーの組み合わせでは2種類ともバンドを認めなかった。これによって, 遺伝子導入はされたが, 相同組み換えは起こらなかったことが示唆された。残りの7クローンでも同様の結果であった。

#### 4. southern 分析

図3に3クローンの結果を示す。Pig genomic DNA では3.2kbp のバンド, mutated allele では2.9kbp のバンドが出現するはずであるが, 全てコントロールと同じ3.2kbp のバンドであった。残りの6クローンでも同様の結果であった。

#### IV. 考察

異種抗原ノックアウトブタの作成を目指し、 $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase ノックアウトのターゲティングベクターを作製し遺伝子導入をしたが、相同組み換えを起こした細胞をえることができなかった。

原因としては、まず第一に遺伝子導入し 9 クローンしか得ることができなかったことが挙げられる。transfection の条件やマンパワー、ブタ脱出胚盤胞由来細胞の増殖能が悪かったことが関与している。通常相同組換えの確率は 1/100~1000 と言われており、明らかに得られたクローンの数は不足している。

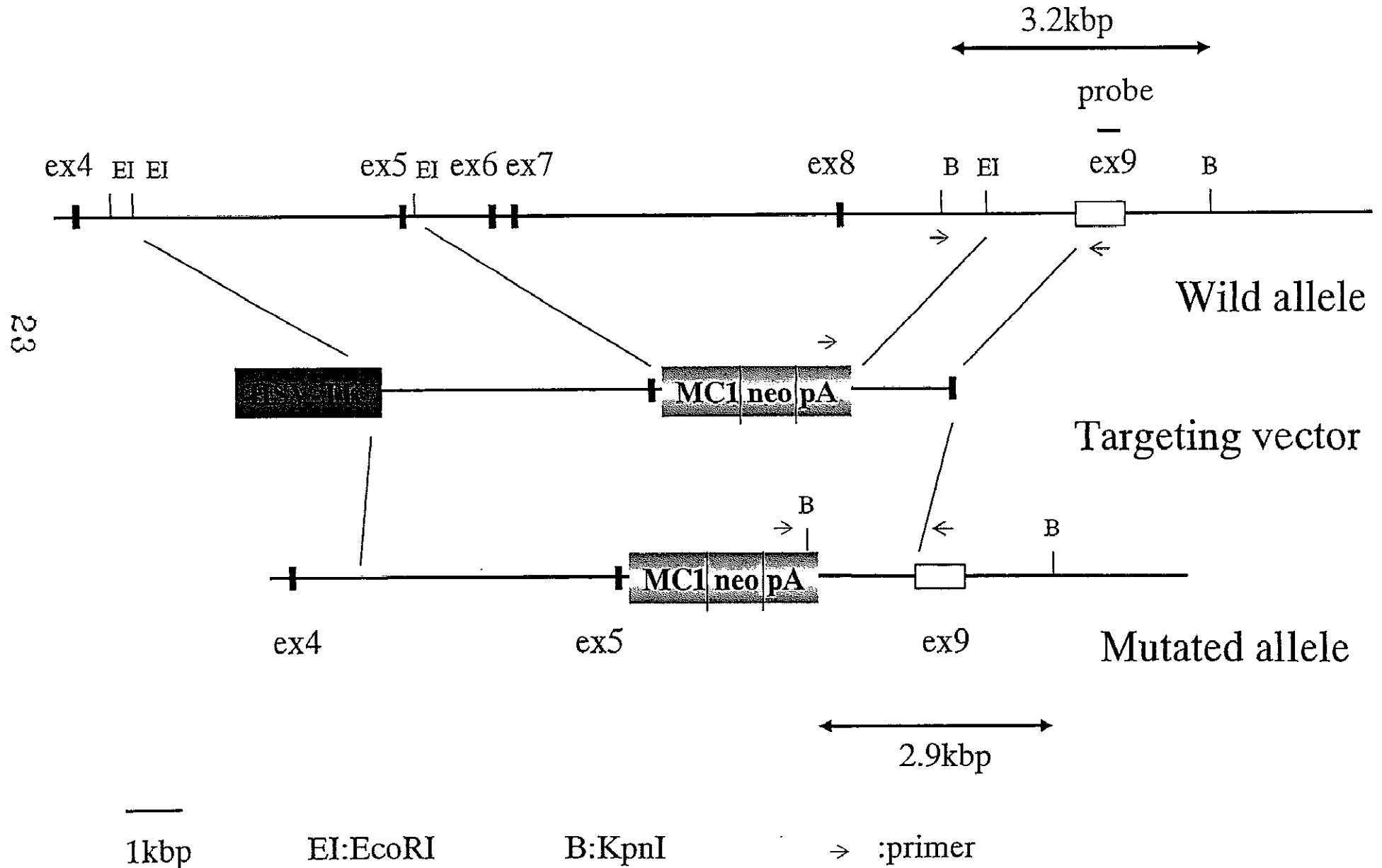
次に考えられるのがベクターの構造の問題である。相同部分が短いことが考えられたため、2001 年 12 月、農業生物研究所ゲノム研究グループの協力を得てターゲティングベクターを作り直した(図 4)。相同組換え効率を上げるために相同部分を長くし、また southern 分析による判別も容易にするようにした。selection 方法も変えた。

exon 4 と exon 7 間での PCR 産物で 9kbp の相同部分を long arm に、exon 8 と exon 9 間の 1k の相同部分を short arm とした。ポジティブセレクションマーカーに PGK-puro-pA カセットをネガティブセレクションマーカーに DTpA を用いた。ベクターは pUC19 プラスミドを用いた。

現在、東北大農学部動物生殖学講座でミニブタ胎児由来 fibroblast に遺伝子導入を開始したと同時にさらに協力してくれる施設を探しているところである。

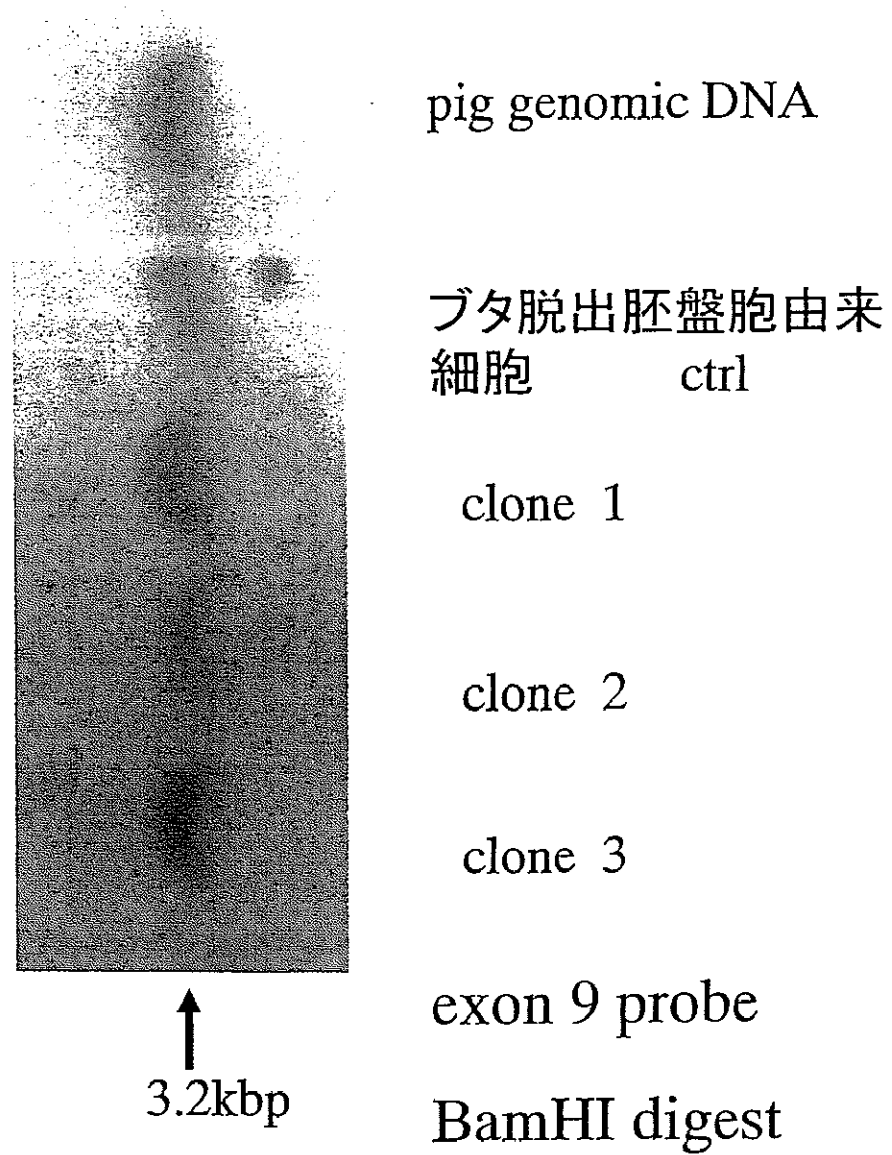


# 図1 $\alpha$ 1,3galactosyltransferase targeting vector



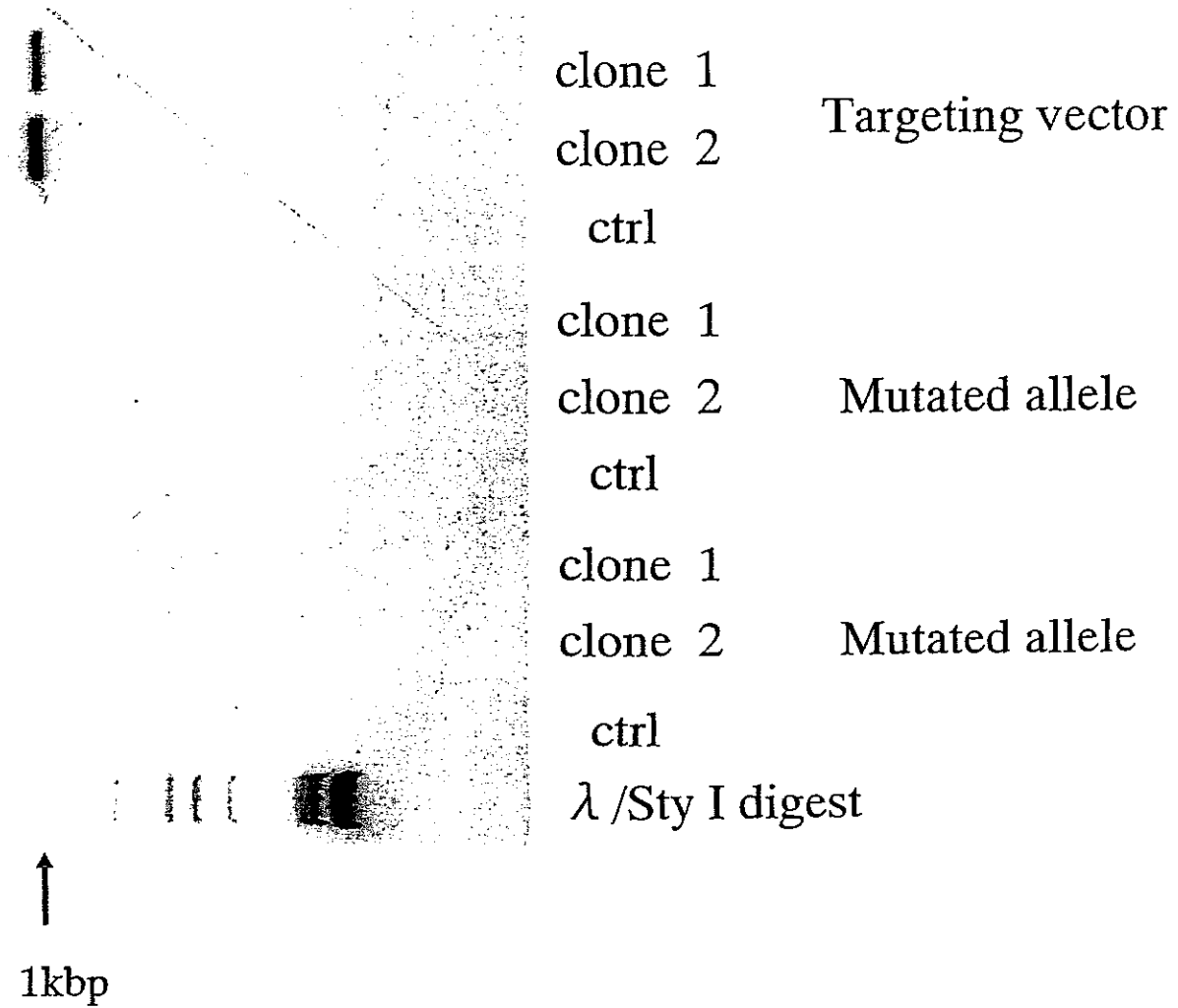
## 図2 southern analysis

24

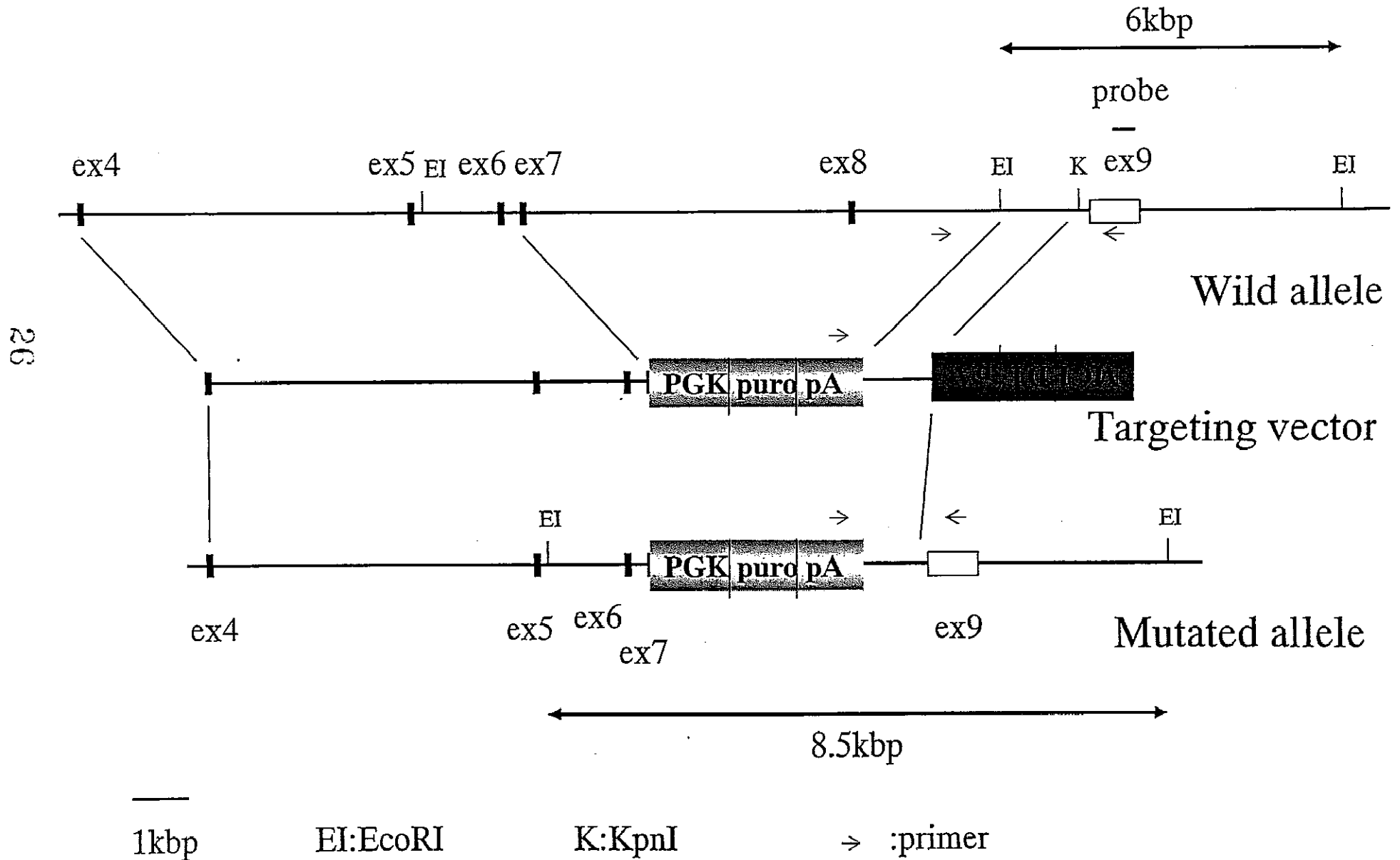


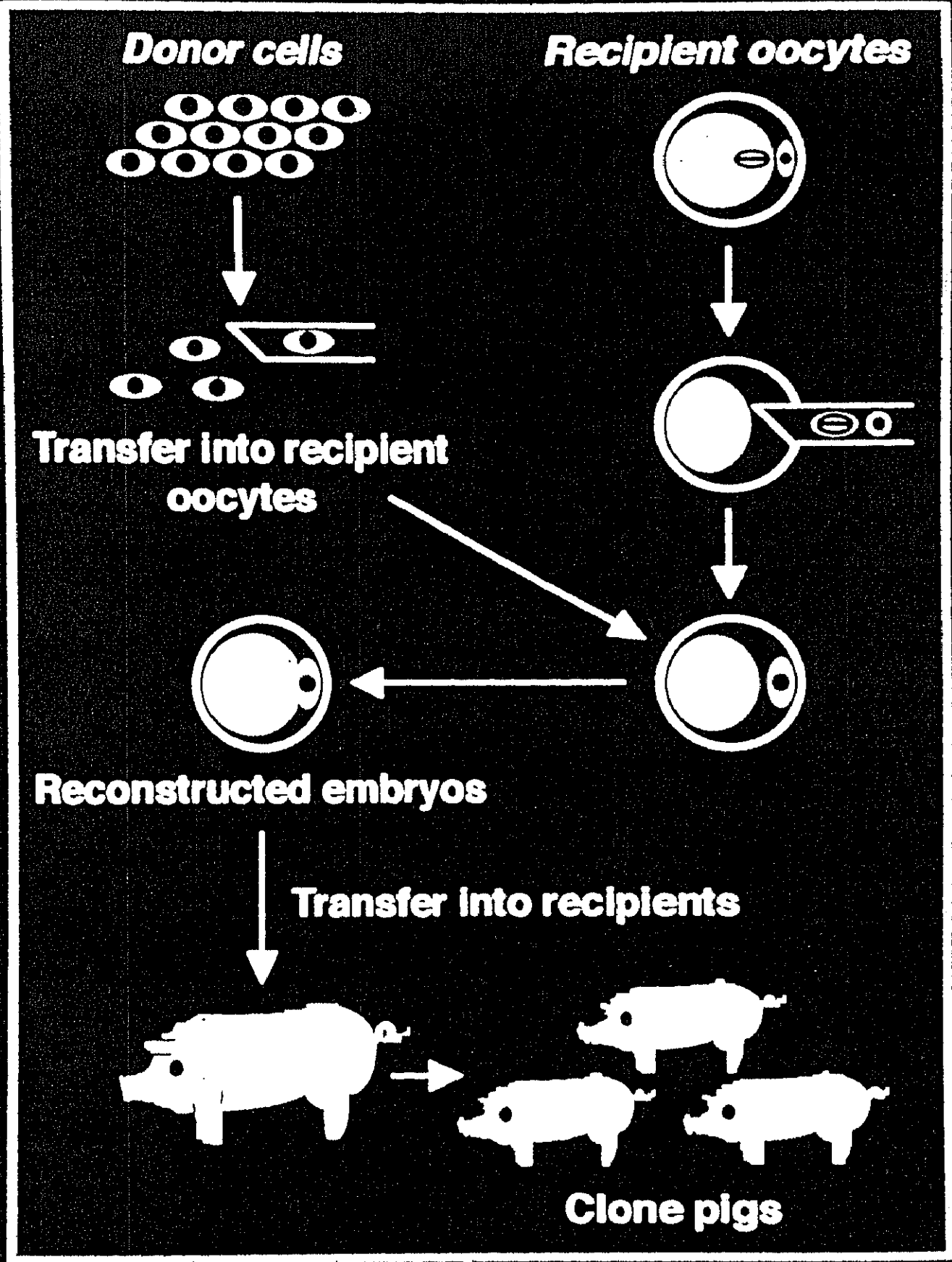
### 図3 PCR analysis

25



# 图4 $\alpha$ 1,3galactosyltransferase targeting vector





**$\alpha$ -1,3-GalT knockout pigs** → **Xenotransplantation**

## b)ブタ異種抗原転移酵素に対するアンチセンス RNA 導入によるブタ細胞の異種抗原抑制の試み

### I. はじめに

わが国において脳死移植が行われ始めて数年経ち、移植医療が臓器不全に対する有効的な治療法の一つとして受け入れられつつあるが、未だ移植希望者に対して提供者が非常に少なく移植臓器の不足を解消するにはほど遠い状態である。すでに移植医療普及している欧米においても慢性的な移植臓器不足が大きな問題となっている。この解決方法の一つとして以前から研究が行われているのが、ヒヒ、ブタなど異種動物からヒトへ臓器を移植する異種移植である。異種移植の最大の利点としては、移植臓器を安定して供給できることである。そのドナーとしてはまず発生学的にヒトに近い霊長類が挙げられるが、繁殖力が弱く必要数を確保するのは不可能に近い。さらに後天性免疫不全症候群(AIDS)のような人畜共通感染症の問題も多く、家畜でない動物をドナーとすることは倫理的に問題となる。そこで現在のところ生物学的、解剖学的特性の面からもブタがドナーとして最も有力視とされている。

しかし、異種移植の系においては移植後数分から数時間以内に微小循環障害からくる血流の途絶より、移植臓器が壊死に陥る超急性拒絶反応が起こる。この超急性拒絶反応が起こる動物種の組み合わせを discordant の異種移植という。近年の研究で超急性拒絶反応は移植臓器の血管内皮表面に存在する糖鎖抗原 galactose  $\alpha$  - 1,3 - galactose(以下  $\alpha$ -Gal)に対してヒト血清中に存在する自然抗体である anti-Gal が反応し、引き続いて補体の活性化がおこり血管内皮傷害をおこすということが明らかになった。この  $\alpha$ -Gal は new world monkey 以下の哺乳類の細胞表面に存在し、old world monkey 以降ヒトにいたるまで不活化され、逆に血清中に自然抗体として anti-Gal 抗体が存在している<sup>1)2)</sup>。

この異種抗原に対する反応を抑えるために i). ヒト抗異種抗体を除去する、ii). 補体活性を抑える、iii). 移植臓器の抗原を除去する、などの方法が考えられる。当教室ではこれまでに、 $\alpha$ -Gal を化学的に合成しヒト血清中の自然抗体を中和する in vitro の実験を行い良好な結果を得たが、莫大な経費がかかることや、いったん抗体を不活化してもすぐに抗体が産生されるといった問題があり臨床応用にはいたらなかった<sup>3)</sup>。 $\alpha$ -Gal は  $\alpha$  - 1,3 - galactosyltransferase (以下  $\alpha$ 1,3GT) という酵素によって糖鎖を形成する<sup>4)5)</sup>。そこで、 $\alpha$ 1,3GT と競合阻害させ  $\alpha$ -Gal を減らすためにヒト糖転移酵素をトランスジェニックしたブタが作出されており<sup>6)7)8)9)10)</sup>、また  $\alpha$ 1,3GT 遺伝子(以下 GGTA1)をノックアウトすることも世界各地で試みられている。一方、アンチセンス RNA 法は相補的塩基配列を持つ RNA が対象遺伝子の発現を阻害する方法であり、遺伝子機能を調べることを目的として広く使われている<sup>11)12)</sup>。われわれは今回、超急性拒絶反応を抑制することを目的として、 $\alpha$ 1,3GT ノックアウトブタの作製を目指す

一方で、このアンチセンス RNA 法を用い、 $\alpha$ 1,3GT 遺伝子のアンチセンス RNA をブタ細胞に発現させることで $\alpha$ -Gal の発現を抑えられると考え、アンチセンスベクターを作成しその有効性を検討した。本研究においては、分化誘導で細胞移植の可能性も有している多分化能を持ったブタ脱出胚盤胞由来細胞を用いた<sup>13)</sup>。

## 研究目的

1. ブタ細胞における細胞表面の異種抗原である $\alpha$ -Gal を測定し、ならびに遺伝子導入効率を測定する。
2.  $\alpha$ 1,3GT 遺伝子(GGTA1)のアンチセンス RNA ベクターを作製する。
3. アンチセンスベクターをブタ脱出胚盤胞由来細胞へ遺伝子導入し、アンチセンス RNA の発現及び $\alpha$ -Gal の発現の変化を解析する。



## 研究方法

### 遺伝子導入に用いた細胞

ブタ脱出胚盤胞由来細胞（東北大学大学院農学系研究科動物生殖学分野より供与）は Dulbecco's modified Eagle's medium(以下 DMEM) (Life Technologies, Inc., Rockville, MD)、20% fetal bovine serum (以下 FBS)(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、50U/ml ペニシリン G カリウム(BANYU PHARMACHEUTICAL CO., LTD., Tokyo, Japan)、50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン(MEIJI SEIKA KAISHA, LTD., Tokyo, Japan)、1mM Glutamine(Life Technologies)、0.1mM 2-メルカプトエタノール(Life Technologies)、0.1mM MEM 非必須アミノ酸溶液(ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH)、ヌクレオシド溶液[0.03mM アデノシン(Sigma)、0.03mM グアノシン(Sigma)、0.03mM シチジン(Sigma)、0.03mM ウリジン(Sigma)、0.01mM チミジン(Sigma)]、1000IU/ml recombinant mouse leukemia inhibitory factor(CHEMICON International, Inc., Temecula, CA) の培地(pH 7.2)で培養した。

クラウンミニブタ由来線維芽細胞(農業生物資源研究所ゲノム研究グループより供与)は HamF 10(Life Technologies)、20% FBS、50U/ml ペニシリン G カリウム、50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンの培地で培養した。

### 遺伝子導入法

ベクターは LIPOFECTOAMINE PLUS Reagent (Life Technologies)を用いてリポフェクション法にて遺伝子導入を行った。DNA 2 $\mu$ g を FBS(-)DMEM 250 $\mu$ l で溶解し PLUS Reagent 8 $\mu$ l を加え 15 分室温で放置。これを LIPOFECTOAMINE 12 $\mu$ l の入った FBS(-)DMEM 250 $\mu$ l に混ぜ、さらに 15 分室温で放置した。これを FBS(-)DMEM 2ml を入れておいたブタ脱出胚盤胞由来細胞 70%コンフルエントの状態の 6cm 細胞培養皿(FALCON No.3002)に加えた。37°C、5%CO<sub>2</sub>、95%空気で 3 時間培養後、FBS と抗生剤を通常濃度に加えた。翌日から二日毎に培地を交換した。

### 1.ブタ細胞における細胞表面の異種抗原である $\alpha$ -Gal の測定、ならびに遺伝子導入効率の測定

#### $\alpha$ -Gal の同定方法

$\alpha$ -Gal に特異的に親和性のあるレクチンである fluorescein isothiocyanate-conjugated(以下 FITC) 標識 isolectin B<sub>4</sub> from Griffonia simplicifolia 1 (以下 GS-IB<sub>4</sub>) (Sigma)を用いて、ブタ脱出胚盤胞由来細胞とクラウンミニブタ由来線維芽細胞の  $\alpha$ -Gal を解析した<sup>14)</sup>。細胞を 0.1% ウシ血清アルブミン(以下 BSA) (Sigma)入り phosphate-buffered saline(以下 PBS)で洗浄後、FITC 標識

GS-IB<sub>4</sub> 20  $\mu$ g/ml の濃度で氷上で 30 分反応させ、PBS で 2 回洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。

### 遺伝子導入効率の測定

クラウンミニブタ由来ブタ線維芽細胞ならびにブタ脱出胚盤胞由来細胞に pCAG-EGFP(農業生物資源研究所ゲノム研究グループより供与)を遺伝子導入し、48 時間後に蛍光顕微鏡の 200 倍の視野で観察し、全細胞中の EGFP 発現細胞の割合を示す導入効率を測定した。

## 2. $\alpha$ 1,3GT 遺伝子(GGTA1)アンチセンス RNA ベクターの作製

### アンチセンス RNA 発現ベクターの作製

ブタ  $\alpha$ 1,3GT 遺伝子(GGTA1)の cDNA はブタ cDNA ライブラリー(農業生物資源研究所ゲノム研究グループより供与)を用いて PCR 法にて合成した。GGTA1 のエクソン 4 とエクソン 9 上にそれぞれ U36 (5'-ggttctgtca atgctgcttg tctcaac-3') と L958 (5'-tagatggctttcatcatgccactcggc-3')のプライマーを設定し、その二つのプライマー対で増幅された 1.1 k b p のフラグメントを使用した。得られたフラグメントの 5'末端、3'末端を T4 DNA ポリメラーゼ (TAKARA SHUZO CO., LTD., Otsu, Japan)によって平滑化し、pCAG - GS [(農業生物資源研究所ゲノム研究グループより供与)、cytomegalovirus(CMV)の Early エンハンサーと chicken  $\beta$  - actin 遺伝子プロモーター、並びにウサギ  $\beta$  - グロビン遺伝子 poly(A)付加シグナルを持つプラスミド] の EcoRI 消化部位を平滑化したものに、T4 DNA リガーゼ (TAKARA) を用いサブクローニングした。得られたクローンについて、塩基配列を確認しアンチセンスベクターとした。プラスミドはアルカリ - SDS 法に準じた plasmid maxi kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)にて調整した。

## 3. アンチセンスベクターの遺伝子導入とアンチセンス RNA の発現及び $\alpha$ -Gal の発現の変化の解析

### total RNA 抽出、RT-PCR

細胞より塩化グアニジン法に準じて total RNA を抽出した。抽出試薬には TRIZOLreagent(Life Technologies)を用い、DNase I(NIPPON GENE CO., LTD., Toyama, Japan)処理を行った後、クロロホルム抽出、エタノール沈殿にて得られたペレットを 75%エタノールで洗浄した後、DEPC 処理水に溶解した。

逆転写反応は RNA 1  $\mu$ g にプライマー (1  $\mu$ M) oligo(dT)<sub>17</sub>-R<sub>1</sub>-R<sub>0</sub> (5'-aaggatcgcgcacatcgataatacgcactatagggatttttttttttttt-3')を加え 70°C で 10

分反応後氷上に移し、Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase(TOYOBO CO., LTD., Osaka, Japan)、1×RTase buffer、500 μM each dNTPs、RNase inhibitor で全量 20 μl とし、42°C 60分、51°C 30分、99°C 5分反応させた。

RT産物 2 μl を ampliTaq DNA polymerase(Applied Biosystems, Foster City, CA) 1U、1mM each dNTPs、1×Taq reaction buffer、1mM MgCl<sub>2</sub> プライマーをそれぞれ 0.8 μM で全量 20 μl とし PCR を 94°C 1分、(94°C 30秒、60°C 30秒、72°C 1分) を 30 サイクル、72°C 10分で行った<sup>5)</sup>。プライマーは R<sub>0</sub>(5'-gacatcgataatacgac-3') と L207(5'-ttgcctatagcgtctcttctctcgtgg) の組み合わせで mRNA の GGTA1 アンチセンス鎖を同定した。イントロンを挟んだエクソン 8 とエクソン 9 のプライマー対である U296 (5'-aggctgtagcaccataaccagatggaagg-3') と L1125 (5'-ctgctggcacaatttaaag TCAgatg-3') で mRNA の GGTA1 センス鎖を同定した。L1125 はアンチセンスベクターに用いた cDNA に含まれない領域のものである。PCR 産物 5 μl をエチジウムブロマイド含有 2% アガロースゲルに電気泳動し、紫外線下で観察した。

### α-Gal の発現の解析

ブタ脱出胚盤胞由来細胞にアンチセンスベクターを遺伝子導入し、1週間後に細胞をフローサイトメトリーで解析した。コントロールとして pCAG-GS を遺伝子導入した。各々 4 回遺伝子導入を行った。約 10<sup>5</sup> 個の細胞を FITC 標識 GS-IB<sub>4</sub> で染色し、FACScan cell analyzer (BD Bioscience, San Jose, CA) で 3×10<sup>4</sup> 個の細胞を解析した。解析ソフトに CELLQuest (BD Bioscience) を使用した。

FL1-H を x 軸にしたヒストグラムで蛍光強度の平均を測定した。アンチセンスベクターを遺伝子導入し二層性になったものはヒストグラムからコントロールのヒストグラムの差を出し、その割合と蛍光強度の平均を測定した。

### 異種抗原性の測定

ブタ脱出胚盤胞由来細胞にアンチセンスベクターおよびピューロマイシン耐性遺伝子を持ったベクター(PGK-puro-pA) (農業生物資源研究所ゲノム研究グループより供与) を 10 : 1 の比で co-transfection し、ピューロマイシン(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 3 μg/ml で 1 週間選別した薬剤耐性細胞について、異種抗原性を測定した。約 10<sup>5</sup> 個の細胞を用い、正常ヒト血清を一次抗体として PBS で 20% に希釈し 4°C で 1 時間反応させ、細胞を 0.1% BSA 入り PBS で 2 回洗浄後、FITC 標識抗ヒト IgG 抗体(ICN Biomedicals) を二次抗体として 40 μg/ml で 4°C で 30 分反応させた。細胞を PBS で 2 回洗浄後、フローサイトメトリーで細胞の異種抗原に付着した抗体量を測定した。遺伝子導入を行って得られた 4 種類の薬剤耐性細胞について測定を行った。コントロールとして二次抗体のみで反応を行った。

### 安定型発現細胞株の樹立

ブタ脱出胚盤胞由来細胞にアンチセンスベクターおよびPGK-puro-pA を 10 : 1 の比で co-transfection し、ピューロマイシン 3  $\mu$ g/ml で 1 週間選別しコロニー分離法にてクローニングを行い、上記の解析を行った。

### 結果の記載

数値は平均値  $\pm$  標準偏差で表した。

## 研究結果

### 1. ブタ細胞における細胞表面の異種抗原である $\alpha$ -Gal の測定、ならびに遺伝子導入効率の測定

クラウンミニブタ由来ブタ線維芽細胞では  $\alpha$ -Gal の発現量少なく、ブタ脱出胚盤胞由来細胞では  $\alpha$ -Gal は高発現であった(図 1)。

クラウンミニブタ由来ブタ線維芽細胞とブタ脱出胚盤胞由来細胞に pCAG-EGFP を遺伝子導入し 48 時間後に蛍光顕微鏡で観察すると、共に EGFP 発現細胞を認めた(図 3、4)。EGFP 発現細胞の割合は、クラウンミニブタ由来ブタ線維芽細胞とブタ脱出胚盤胞由来細胞でのおおの 5.5 $\pm$ 0.1%、9.0 $\pm$ 4.5%であった(表 1)。

### 2. $\alpha$ 1,3GT 遺伝子(GGTA1)アンチセンス RNA ベクターの作製

ブタ  $\alpha$ 1,3GT 遺伝子(GGTA1)の cDNA から PCR 法にて合成した 1.1 kb のフラグメントを pCAG-GS サブクローニングし、GGTA1 アンチセンスベクターを作製した(図 4)。

### 3. アンチセンスベクターの遺伝子導入とアンチセンス RNA の発現及び $\alpha$ -Gal の発現の変化の解析

#### RT-PCR

ブタ脱出胚盤胞由来細胞コントロール、アンチセンスベクターを遺伝子導入した細胞、pCAG-GS (コントロール) を遺伝子導入した細胞のいずれも GGTA1 のセンス鎖のバンドの増幅がみられ、逆転写反応が正しく行われていることが示された。アンチセンスベクターを遺伝子導入したものにおいてのみ GGTA1 のアンチセンス鎖のバンドの増幅がみられた(図 5)。

#### $\alpha$ -Gal の発現の解析

ブタ脱出胚盤胞由来細胞(図 6a)を FITC 標識 GS-IB<sub>4</sub> で染色するとほぼ均一の蛍光強度の細胞集団となった(図 6b)。アンチセンスベクターを遺伝子導入したものでは蛍光強度が低下した細胞集団ができ、ヒストグラムでは 2 相性になった(図 6c)。cDNA を連結していない pCAG-GS (コントロール) を遺伝子導入したものでは遺伝子導入しないものとほぼ変化がなかった(図 6d)。この結果をふまえて、アンチセンスベクターを遺伝子導入した時の変化を解析するため、アンチセンスベクターを遺伝子導入したヒストグラム(図 7b)から遺伝子導入しないもの(図 7a)を引いた差をヒストグラムで表した(図 7d)。この細胞集団の数は 1770 $\pm$ 743 個で、全体に対する割合は 11.9 $\pm$ 4.3%であった(表 2)。この細胞集団と遺伝子導入しないものをヒストグラム上に示したゲートで平均蛍光強度を測定した。平均蛍光強度はそれぞれ 270 $\pm$ 122、1440 $\pm$ 339 となっ

た(表 3)。

### 異種抗原性の測定

ブタ脱出胚盤胞由来細胞において、二次抗体(FITC 標識抗ヒト IgG 抗体)のみ反応させたものでは蛍光強度はほとんど変化しなかったのに対し(図 8a,b)、正常ヒト血清を一次抗体とし二次抗体を反応させたものでは蛍光強度の増大をみた(図 8c)。アンチセンスベクターを遺伝子導入した薬剤耐性細胞株では 4 種類ともに、遺伝子導入していない細胞と比較して蛍光強度の変化は認めなかった(図 8d)。

### 安定型発現細胞株の樹立

GGTA1 のアンチセンス RNA が発現する安定型発現細胞株を一株樹立できたが、 $\alpha$ -Gal の発現ならびに異種抗原性はコントロールと著変なかった。

## 考察

ブタからヒトへの異種移植において、超急性拒絶反応を抑制するために多くの施設でこれまでにさまざまな研究が行われている。近年、ヒト補体制御因子やヒト糖転移酵素を遺伝子導入したトランスジェニックブタが数施設で作り出され、ある程度のグラフト生着期間の延長が報告されている<sup>10)16)17)</sup>。また、超急性拒絶反応を有効に抑制する目的で、糖鎖抗原である $\alpha$ -Galを除去するためには $\alpha$ 1,3GT 遺伝子(GGTA1)をノックアウトすることがもっとも効果的であると考えられており、世界各地でノックアウト遺伝子ベクターの作成ならびに、遺伝子導入が試みられている。2002年初頭、二施設で $\alpha$ 1,3GT ノックアウトしたヘテロ接合体のブタが誕生と発表された<sup>18)</sup>。しかし、 $\alpha$ 1,3GT ノックアウトマウスでは白内障を発症することが知られており<sup>19)20)</sup>、羊でも $\alpha$ 1,3GT ノックアウトが試みられたが、生きた個体は産まれなかった<sup>21)</sup>。ブタではマウスよりも $\alpha$ -Gal の数が多く、 $\alpha$ 1,3GT ノックアウトホモ接合体の個体では致死あるいは重度な障害を持つ可能性がある。したがって、 $\alpha$ 1,3GT ノックアウトブタの作製を目指す一方で、他の超急性拒絶反応抑制のための戦略も考えておく必要がある。そこで今回われわれはアンチセンス RNA 法を用い GGTA1 のアンチセンスベクターのブタ細胞への遺伝子導入効果を検討することとした。

遺伝子導入方法としては一過性発現ならびにその後の安定型発現細胞株の樹立を目指すため、効率が良く、手技が簡便で細胞毒性の低いとされるリポフェクション法を用いた<sup>22)</sup>。まず、クラウンミニブタ由来ブタ線維芽細胞とブタ脱出胚盤胞由来細胞で $\alpha$ -Gal の発現とリポフェクション法による遺伝子導入効率を調べた。ブタ脱出胚盤胞由来細胞で $\alpha$ -Gal は高発現であり、FITC 標識 GS-IB<sub>4</sub> で染色後の $\alpha$ -Gal の解析には適当と思われた。また遺伝子導入効率もリポフェクション法でクラウンミニブタ由来ブタ線維芽細胞で約 6%、ブタ脱出胚盤胞由来細胞で約 9%と良好であった。よって今回の GGTA1 のアンチセンスベクターのブタ細胞への遺伝子導入効果検討には、ブタ脱出胚盤胞由来細胞にアンチセンスベクターを遺伝子導入することにした。

これまでマウスの細胞で $\alpha$ 1,3GT 遺伝子のアンチセンス RNA 法による $\alpha$ -Gal の発現の低下や<sup>23)24)</sup>、GGTA1 のアンチセンスのトランスジェニックマウスにおいて異種抗原性の低下が証明されており<sup>25)</sup>、異種移植を前提とするとブタ細胞における評価が必要とされる。本研究では GGTA1 のアンチセンスベクターをブタ細胞へ遺伝子導入することによって FITC 標識 GS-IB<sub>4</sub> の染色後の蛍光強度が変化した細胞集団が作成できた。この細胞集団の割合は遺伝子導入効率とほぼ同等であり、遺伝子導入された集団と推測された。この細胞の FITC 標識 GS-IB<sub>4</sub> 染色後の平均蛍光強度はコントロールに比べ低下しており、アンチセンスベクターの遺伝子導入によって $\alpha$ -Gal の発現が低下したと考えられた。また今回の検討で RT-PCR の結果より、アンチセンスベクターの遺伝子導入によって GGTA1 のアンチセンス RNA が発現することが証明された結果からも、GGTA1 アンチセンスベクターの遺伝子導入によって一過性にアン

チセンス RNA が発現しセンス RNA の翻訳が阻害されることで、 $\alpha$ -Gal 発現の低下があったと考えられる。アンチセンス RNA の作用機序については完全には明らかになっていないが、アンチセンス鎖は細胞内でセンス鎖と相補的な結合を行い、リボソームへの結合を阻害することで翻訳が阻害されると考えられている。今回、GGTA1 アンチセンスベクターの導入により  $\alpha$ -Gal の発現が低下したことから、この手法が有効であることが示唆された。しかしながら、これまでの報告から、アンチセンス RNA のタンパク発現抑制効率は 80% 程度であり、完全にはその遺伝子の働きを抑制することができなかった<sup>26)</sup>。加えて、アンチセンス鎖の発現量の調節は困難であるとの問題もあるが、さらに検討を重ねることにより、遺伝子ノックアウトと同等の効果が得られる可能性があると考えられる。

異種抗原である  $\alpha$ -Gal に対する抗体は、現在入手が困難なため、 $\alpha$ -Gal に特異的に親和性のある FITC 標識 GS-IB<sub>4</sub> の染色 (レクチン染色) による  $\alpha$ -Gal の定量が一般的である<sup>14)</sup>。しかし、anti-Gal と GS-IB<sub>4</sub> の認識するものは若干異なることに加え<sup>27)</sup>、フローサイトメトリーにおいて通常 FITC 標識の二次抗体で測定する方法と異なるため、FITC 標識レクチンによる  $\alpha$ -Gal 発現の評価は厳密にいうと相対的なものであり、既存の方法で異種抗原量の定量を行うことは困難である。そこでアンチセンスベクターが遺伝子導入された細胞の異種抗原性を調べるため、アンチセンスベクターと薬剤耐性ベクターを co-transfection し薬剤選択した細胞で測定を行った。ヒトの自然抗体である anti-Gal はヒト血清中に大量に存在し、ヒトの IgG 抗体の約 1% を占めている<sup>1)</sup>。そこでブタ細胞に正常ヒト血清を一次抗体として反応させ、その後抗ヒト IgG 抗体を二次抗体として反応させることで、ブタ細胞の異種抗原に付着した異種抗体量を測定し異種抗原性の変化を検討した。anti-Gal はヒトの抗ブタ異種抗体の 70 から 90% を占めているので<sup>28)</sup>、 $\alpha$ -Gal が低下することで異種抗原性も低下すると考えられたが、今回の実験ではアンチセンスベクターの導入により異種抗原性の有意な低下をみることができなかった。

また、遺伝子組換え動物を作製するためには、アンチセンス RNA 発現ベクターが動物のゲノムに組み込まれていることが必要不可欠である。そのためにはまず、GGTA1 アンチセンス RNA 安定型発現細胞株を樹立したうえで、詳細な細胞表面抗原の解析を行わなければならない。しかし、本研究において現在までのところ得られた安定型発現細胞株では  $\alpha$ -Gal の発現および異種抗原性も変化がなかった。それらの原因としてアンチセンスの発現量が少ない可能性が考えられ、アンチセンス発現の多い安定細胞株の樹立が必要であると思われた。今後さらなる GGTA1 アンチセンス RNA 安定型発現細胞株の樹立への努力が必要である。

今回の検討においてはブタ脱出胚盤胞由来細胞を用いたが、超急性拒絶反応を起こす異種抗原の発現を減少させた細胞株を樹立することができれば、トランスジェニック動物の作製だけでなく、分化誘導による細胞移植の可能性も開ける<sup>29)</sup>。今回我々の



検討において、GGTA1 のアンチセンスRNAベクターの導入により約 1 割の細胞に異種抗原の低下が認められたことから、GGTA1 のアンチセンスRNAベクターの導入が超急性拒絶反応を抑える戦略の一つとなりうる可能性が示された。超急性拒絶反応を乗り越えても急性、慢性拒絶反応、人畜共通感染症、ブタ内在性レトロウィルス (PERV) などの課題は残るものの<sup>30)</sup>、異種抗原ノックアウトブタの作成が困難な現状においては、本法が異種移植実現への第一歩となると考えられる。

## 結論

1. ブタ脱出胚盤胞由来細胞において細胞表面の異種抗原  $\alpha$ -Gal は高発現であり、リポフェクション法による遺伝子導入効率は良好であった。
2.  $\alpha$ 1,3GT 遺伝子(GGTA1)のアンチセンス RNA ベクターを作製した。
3. ブタ脱出胚盤胞由来細胞へ 2. で作成したベクター導入によりアンチセンス RNA の一過性発現と  $\alpha$ -Gal の発現低下を認めた。

本研究により  $\alpha$ 1,3GT 遺伝子(GGTA1)のアンチセンス RNA ベクター導入法は超急性拒絶反応を抑制し、異種臓器移植、異種細胞移植を行う戦略の一つとなる可能性が示唆された。

## 文献

- 1) Galili U, Rachmilewitz EA, Peleg A, Flechner I. A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *J Exp Med.* 1984 Nov 1;160(5):1519-31.
- 2) Galili U, Swanson K. Gene sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug 15;88(16):7401-4.
- 3) Haga I, Satake M, Ohrui H, Ohkohchi N, Satomi S. Enzyme-assisted synthesis of disaccharides to inhibit binding of human anti-alpha Gal antibody. *Transplant Proc.* 1999 Nov;31(7):2826-30.
- 4) Strahan KM, Gu F, Preece AF, Gustavsson I, Andersson L, Gustafsson K. cDNA sequence and chromosome localization of pig alpha 1,3 galactosyltransferase. *Immunogenetics.* 1995;41(2-3):101-5.
- 5) Katayama A, Ogawa H, Kadomatsu K, Kurosawa N, Kobayashi T, Kaneda N, Uchimura K, Yokoyama I, Muramatsu T, Takagi H. Porcine alpha-1,3-galactosyltransferase: full length cDNA cloning, genomic organization, and analysis of splicing variants. *Glycoconj J.* 1998 Jun;15(6):583-9.
- 6) Sharma A, Okabe J, Birch P, McClellan SB, Martin MJ, Platt JL, Logan JS. Reduction in the level of Gal(alpha1,3)Gal in transgenic mice and pigs by the expression of an alpha(1,2)fucosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jul 9;93(14):7190-5.
- 7) Koike C, Katayama A, Kadomatsu K, Hiraiwa N, Hayashi S, Kobayashi T, Hayash S, Yokoyama I, Takagi H. Reduction of alpha-Gal epitopes in transgenic pig by introduction of human alpha 1-2 fucosyltransferase. *Transplant Proc.* 1997 Feb-Mar;29(1-2):894.
- 8) Costa C, Zhao L, Burton WV, Bondioli KR, Williams BL, Hoagland TA, Ditullio PA, Ebert KM, Fodor WL. Expression of the human alpha1,2-fucosyltransferase in transgenic pigs modifies the cell surface carbohydrate phenotype and confers resistance to human serum-mediated cytolysis. *FASEB J.* 1999

Oct;13(13):1762-73.

- 9) Tanemura M, Miyagawa S, Koyota S, Koma M, Matsuda H, Tsuji S, Shirakura R, Taniguchi N. Reduction of the major swine xenoantigen, the alpha-galactosyl epitope by transfection of the alpha2,3-sialyltransferase gene. *J Biol Chem.* 1998 Jun 26;273(26):16421-5.
- 10) Miyagawa S, Murakami H, Takahagi Y, Nakai R, Yamada M, Murase A, Koyota S, Koma M, Matsunami K, Fukuta D, Fujimura T, Shigehisa T, Okabe M, Nagashima H, Shirakura R, Taniguchi N. Remodeling of the major pig xenoantigen by N-acetylglucosaminyltransferase III in transgenic pig. *J Biol Chem.* 2001 Oct 19;276(42):39310-9.
- 11) Coleman J, Hirashima A, Inokuchi Y, Green PJ, Inouye M. A novel immune system against bacteriophage infection using complementary RNA (micRNA). *Nature.* 1985 Jun 13-19;315(6020):601-3.
- 12) Izant JG, Weintraub H. Constitutive and conditional suppression of exogenous and endogenous genes by anti-sense RNA. *Science.* 1985 Jul 26;229(4711):345-52.
- 13) Miyoshi K, Taguchi Y, Sendai Y, Hoshi H, Sato E. Establishment of a porcine cell line from in vitro-produced blastocysts and transfer of the cells into enucleated oocytes. *Biol Reprod.* 2000 Jun;62(6):1640-6.
- 14) Oriol R, Ye Y, Koren E, Cooper DK. Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation. *Transplantation.* 1993 Dec;56(6):1433-42.
- 15) Michael A. Rapid amplification of cDNA Ends(RACE):User-friendly cDNA cloning. *amplifications A forum for PCR users.*1990 Sep;5:11-15.
- 16) Rosengard AM, Cary NR, Langford GA, Tucker AW, Wallwork J, White DJ. Tissue expression of human complement inhibitor, decay-accelerating factor, in transgenic pigs. A potential approach for preventing xenograft rejection.

- Transplantation. 1995 May 15;59(9):1325-33.
- 17) McCurry KR, Kooyman DL, Alvarado CG, Cotterell AH, Martin MJ, Logan JS, Platt JL. Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat Med.* 1995 May;1(5):423-7.
  - 18) Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase Knockout Pigs by Nuclear Transfer Cloning. *Science.* 2002 Jan 3
  - 19) Thall AD, Maly P, Lowe JB. Oocyte Gal alpha 1,3Gal epitopes implicated in sperm adhesion to the zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required for fertilization in the mouse. *J Biol Chem* 1995 Sep 15;270(37):21437-40
  - 20) Tearle RG, Tange MJ, Zannettino ZL, Katerelos M, Shinkel TA, Van Denderen BJ, Lonie AJ, Lyons I, Nottle MB, Cox T, Becker C, Peura AM, Wigley PL, Crawford RJ, Robins AJ, Pearse MJ, d'Apice AJ. The alpha-1,3-galactosyltransferase knockout mouse. Implications for xenotransplantation. *Transplantation.* 1996 Jan 15;61(1):13-9.
  - 21) Denning C, Burl S, Ainslie A, Bracken J, Dinnyes A, Fletcher J, King T, Ritchie M, Ritchie WA, Rollo M, de Sousa P, Travers A, Wilmut I, Clark AJ. Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat Biotechnol.* 2001 Jun;19(6):559-62.
  - 22) Sambrook J, Russell DW. Introducing cloned genes into cultured mammalian cells. In *Molecular Cloning.* Sambrook J, Russell DW (eds) 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, vol 3 chapter 16 p1-62.
  - 23) Xing L, Xia GH, Bai XF, Fei J, Guo LH. Adenovirus-mediated expression of antisense RNA transcripts complementary to pig alpha(1,3) galactosyltransferase mRNA inhibits expression of Gal alpha(1,3) Gal epitope. *Acta Pharmacol Sin.* 2000 Nov;21(11):1005-10.
  - 24) Hayashi S, Nagasaka T, Koike C, Kobayashi T, Hamada H, Yokoyama I, Saito

- I. Takagi H. Effect of antisense ribozyme to alpha (1,3)galactosyl transferase gene on the expression of Gal alpha (1,3)Gal epitope. *Transplant Proc.* 1997 Feb-Mar;29(1-2):893.
- 25) Ma YH, Zhou XG, Hu JH, Fei J, Xia GH, Guo LH. Human xenoreactivity is reduced in mice bearing porcine antisense alpha(1,3) galactosyltransferase cDNA. *Acta Pharmacol Sin.* 2001 Mar;22(3):231-8.
- 26) Katsuki M, Sato M, Kimura M, Yokoyama M, Kobayashi K, Nomura T. Conversion of normal behavior to shiverer by myelin basic protein antisense cDNA in transgenic mice. *Science.* 1988 Jul 29;241(4865):593-5.
- 27) Goldstein IJ, Winter HG. The Griffonia simplicifolia I-B4 Isolectin: A probe for  $\alpha$ -D-galactosyl end groups. In  $\alpha$ -Gal and Anti-Gal. Galili U and Avila JL (eds) 1999, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 127-141.
- 28) Kobayashi T, Cooper DKC. Anti-Gal,  $\alpha$ -Gal Epitopes, and Xenotransplantation. In  $\alpha$ -Gal and Anti-Gal. Galili U and Avila JL (eds) 1999, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 229-246.
- 29) Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science.* 1999 Jul 30;285(5428):754-6.
- 30) Butler D. Europe is urged to hold back on xenotransplant clinical trials. *Nature.* 1999 Jan 28;397(6717):281-2.

## 図の説明

### 図 1. プタ細胞の FITC 標識 レクチン染色像

a はクラウンミニプタ由来プタ線維芽細胞、b はプタ脱出胚盤胞由来細胞である。蛍光顕微鏡の倍率は 200 倍である。

### 図 2 pCAG-EGFP 遺伝子導入像 (クラウンミニプタ由来プタ線維芽細胞)

リポフェクション法で遺伝子導入後 4 8 時間での a は光顕写真、b は蛍光写真である。顕微鏡の倍率はともに 200 倍である。

### 図 3 pCAG-EGFP 遺伝子導入像 (プタ脱出胚盤胞由来細胞)

図 2 と同様に遺伝子導入後 4 8 時間での a は光顕写真、b は蛍光写真である。顕微鏡の倍率はともに 200 倍である。

### 図 4 $\alpha$ 1,3GT 遺伝子アンチセンスベクター

a. はベクター作製に用いたプラスミド pCAG - GS である。b. は遺伝子導入効率に用いた pCAG - EGFP である。c. は作製したアンチセンスベクターである。

### 図 5 RT-PCR

a. は R<sub>0</sub> と L207 のプライマー対で、b. は U296 と L1125 のプライマー対で PCR を行ない電気泳動したものである。a. で 800bp のバンドは GGTA1 のセンス鎖を、b. で 400bp のバンドは GGTA1 のアンチセンス鎖をあらわす。a.、b. と一番上のバンドはマーカーとして  $\phi$ X174/Hinc II (ニッポンジーン) を用いた。以下プタ脱出胚盤胞由来細胞コントロール(pig cell と表記)、アンチセンスベクターを遺伝子導入したもの(pCAG-antisense と表記)、pCAG-GS を遺伝子導入したもの(pCAG-GS と表記)を各々逆転写したもの(RT+)と逆転写しないもの(RT-)で順番に示した。一番下の段はサンプルを超純水にし PCR を行ったものである。

### 図 6 フローサイトメトリーによる $\alpha$ -Gal の発現の解析 1

左のグラフは x 軸を FSC、y 軸を SSC としたドットプロット、真ん中の図は x 軸を FL1-H、y 軸を FL2-H としたドットプロット、右の図は x 軸を FL1-H、y 軸を細胞数としたヒストグラムである。ドットプロットは実際に測定した細胞の 10% をグラフ上に表した。ヒストグラムは a. 左のドットプロットで囲んだ領域 R1 のものを表した。a. はプタ脱出胚盤胞由来細胞の染色してないもので、b. c. d. は FITC 標識 GS-IB<sub>4</sub> で染色したものである。b. は遺伝子導入してないもの、

c.はアンチセンスベクターを遺伝子導入したもの、d.はpCAG-GSを遺伝子導入したものを示す。

図7 フローサイトメトリーによる $\alpha$ -Galの発現の解析2

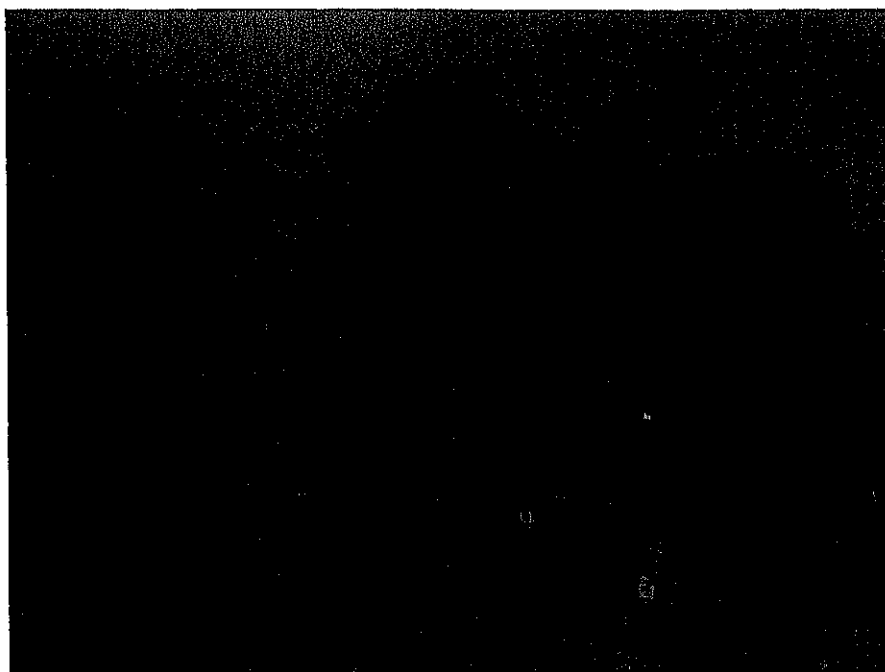
図6で示したブタ脱出胚盤胞由来細胞をFITC標識GS-IB<sub>4</sub>で染色した後のヒストグラムである。a.はブタ脱出胚盤胞由来細胞の遺伝子導入していないもの、b.はブタ脱出胚盤胞由来細胞にアンチセンスベクターを遺伝子導入したもの、c.は上の2つを重ねあわせたもの、d.はb.のヒストグラムからa.のヒストグラムを引いた差をヒストグラムにしたものである。a.のM1のゲートの部位をブタ脱出胚盤胞由来細胞コントロールとし、d.のM1のゲートの部位をアンチセンスベクター遺伝子導入後変化した細胞群としそれぞれで平均蛍光強度を測定した。

図8 フローサイトメトリーによる異種抗原性の測定

a.b.c.はブタ脱出胚盤胞由来細胞の遺伝子導入していないもの、d.はブタ脱出胚盤胞由来細胞にアンチセンスベクターと薬剤耐性ベクターを遺伝子導入し薬剤選択したもののヒストグラムである。a.は反応なし、b.は二次抗体(FITC標識抗ヒトIgG抗体)のみ反応させたもの、c.とd.は一次抗体(正常ヒト血清)と二次抗体(FITC標識抗ヒトIgG抗体)を反応させたものである。



a



b

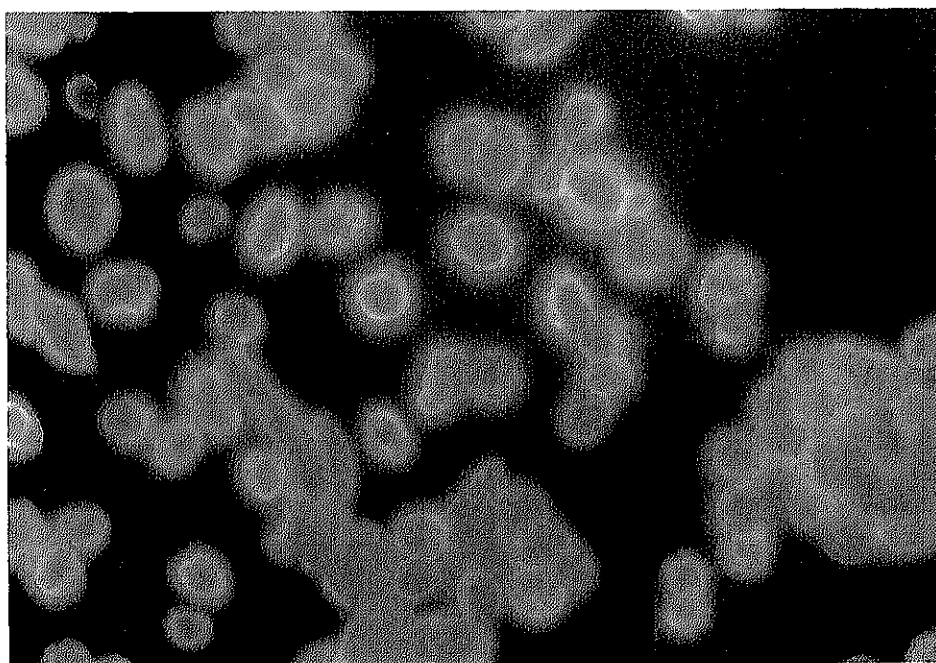
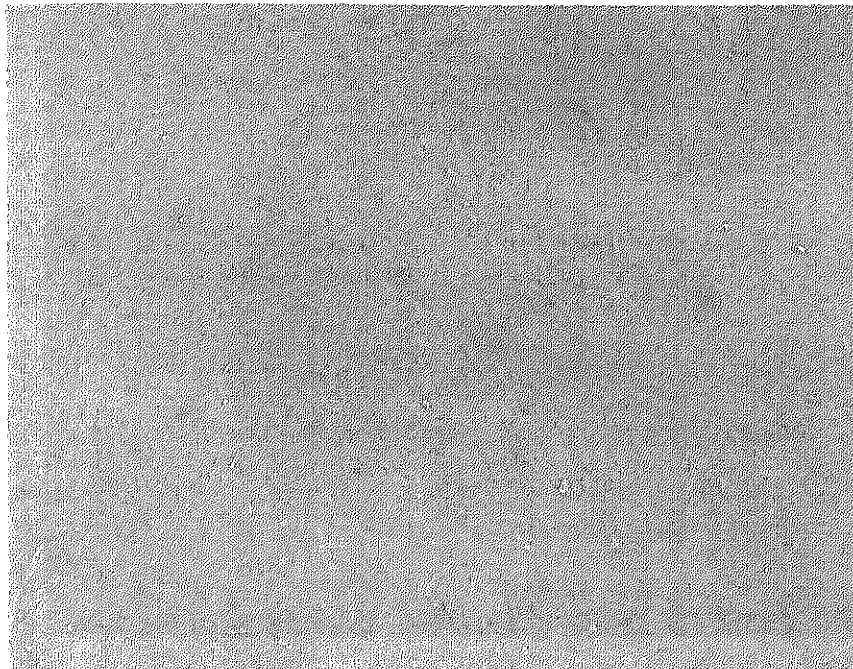


図1 ブタ細胞のFITC標識 レクチン染色像

a

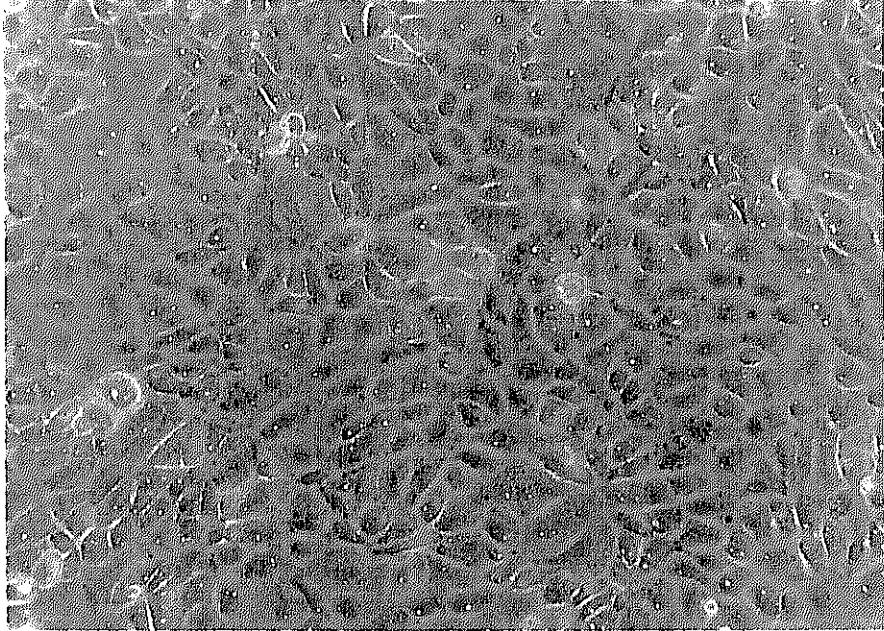


b



図2 pCAG-EGFP 遺伝子導入  
(クラウンミニブタ線維芽細胞)

a

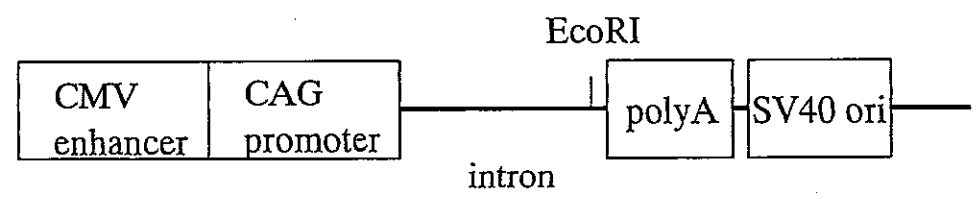


b

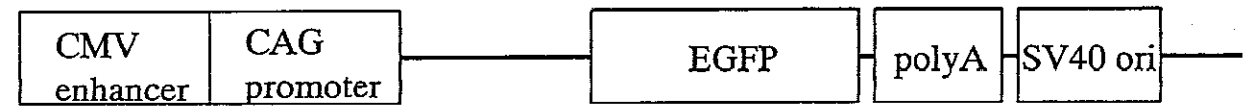


図3 pCAG-EGFP 遺伝子導入  
(ブタ脱出胚盤胞由来細胞)

a. pCAG-GS  
(4790bp)



b. pCAG-EGFP



c. pCAG-antisense

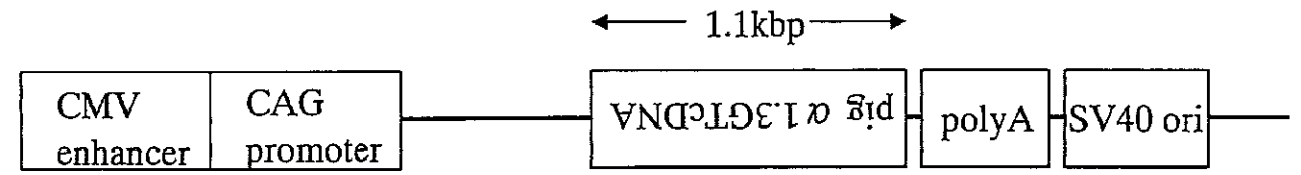


図4 α 1,3GT遺伝子アンチセンスベクター

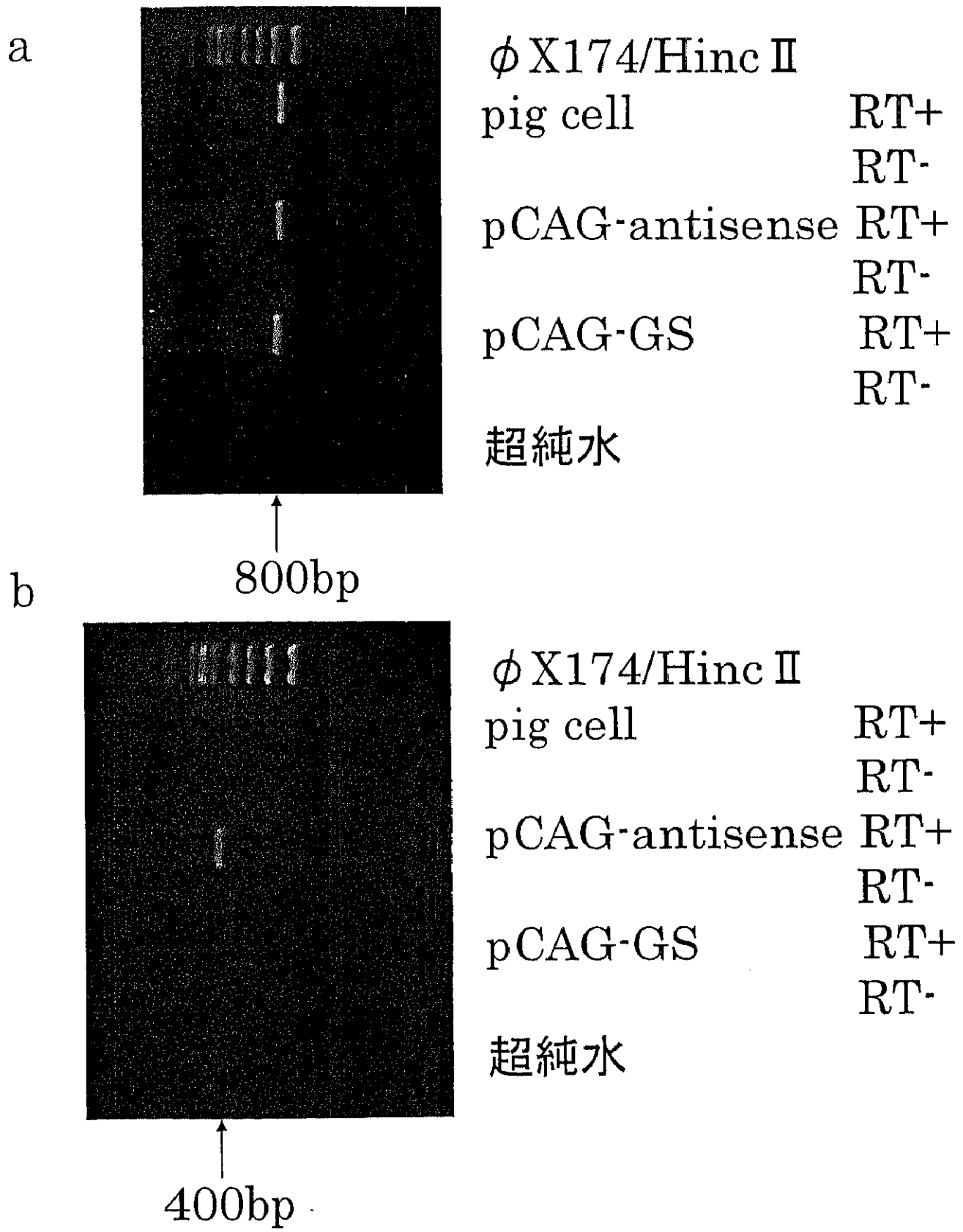


図5 RT-PCR

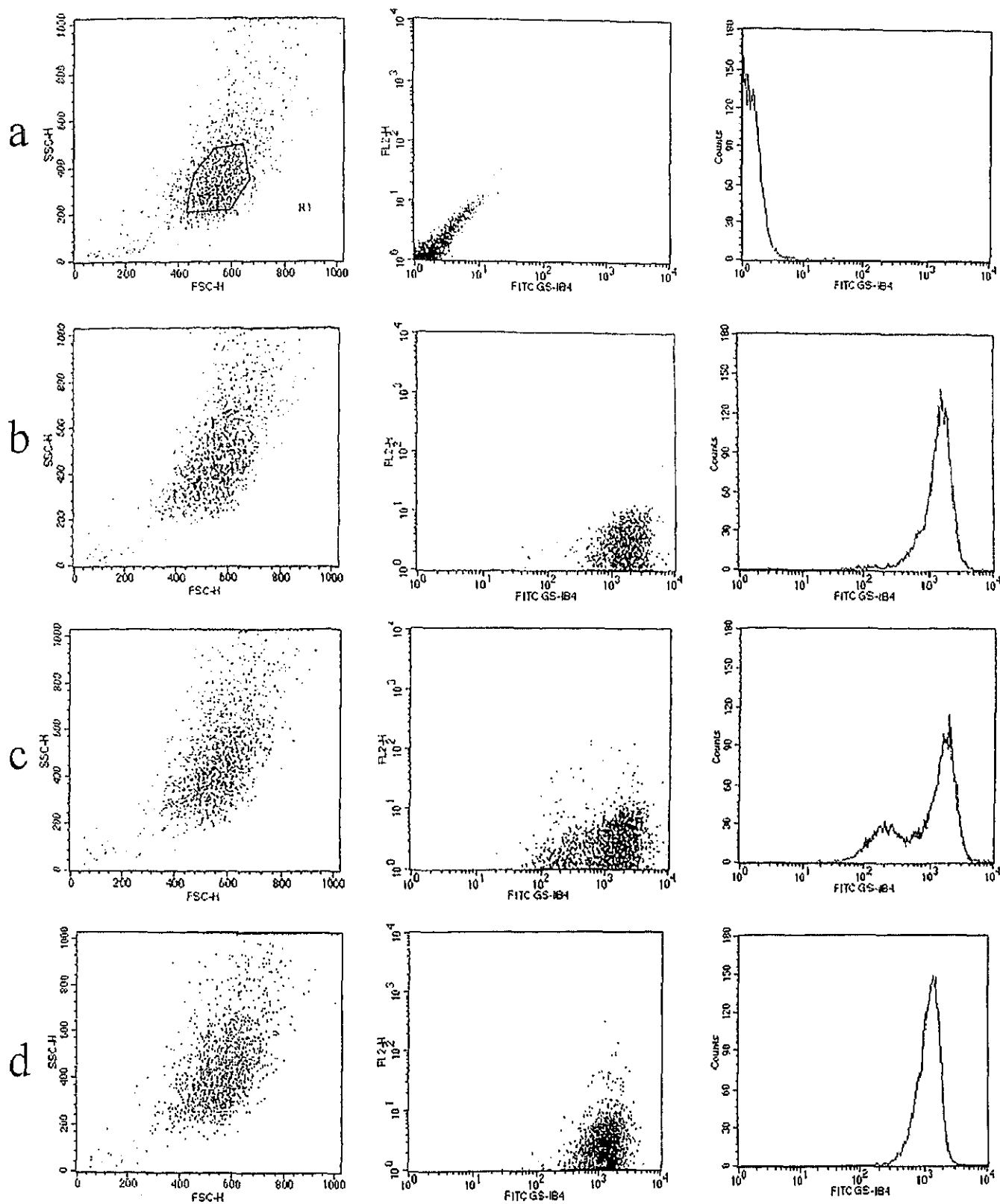


図6 フローサイトメリーによる  
 $\alpha$ -Galの発現の解析1

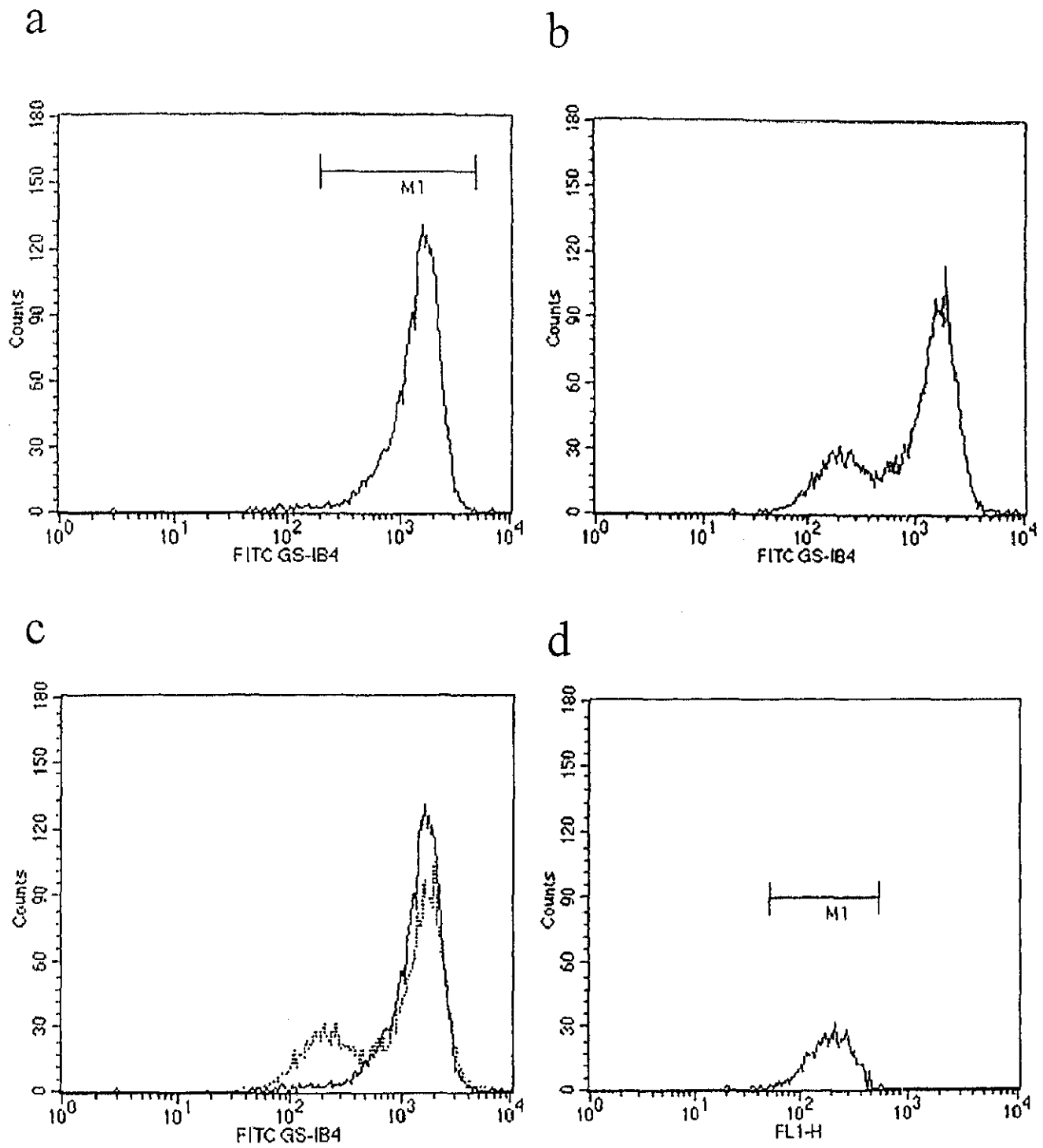
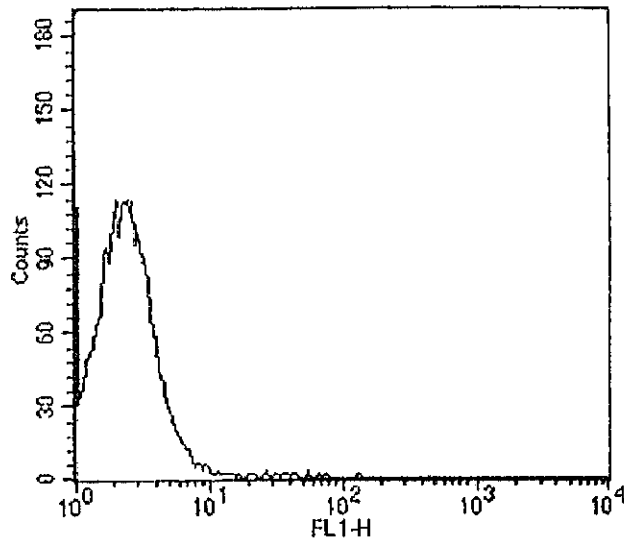
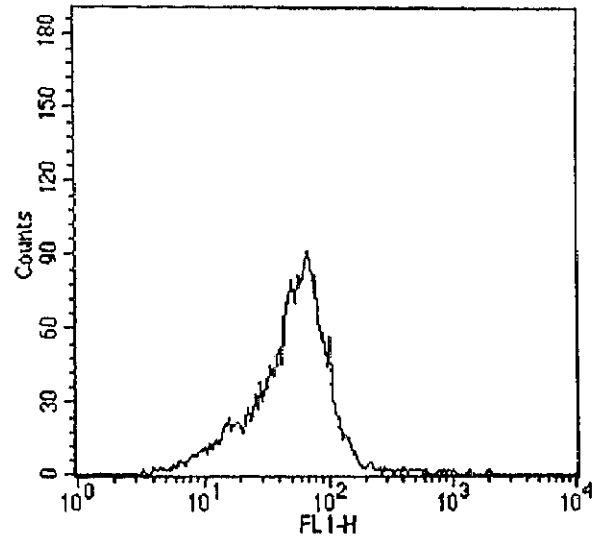


図7 フローサイトメリーによる  
 $\alpha$ -Galの発現の解析2

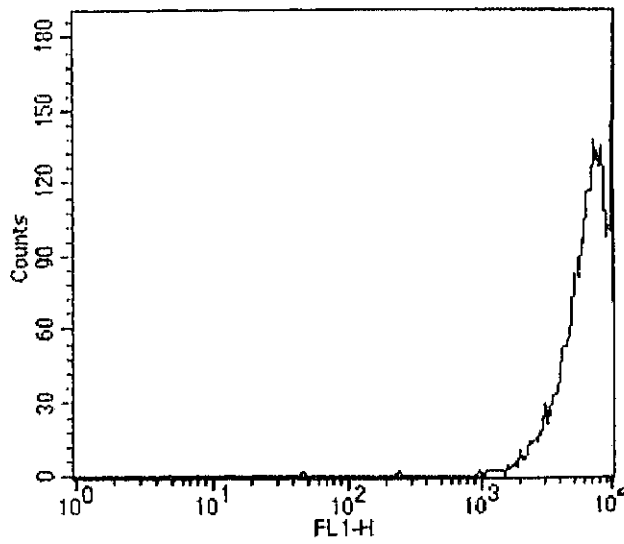
a



b



c



d

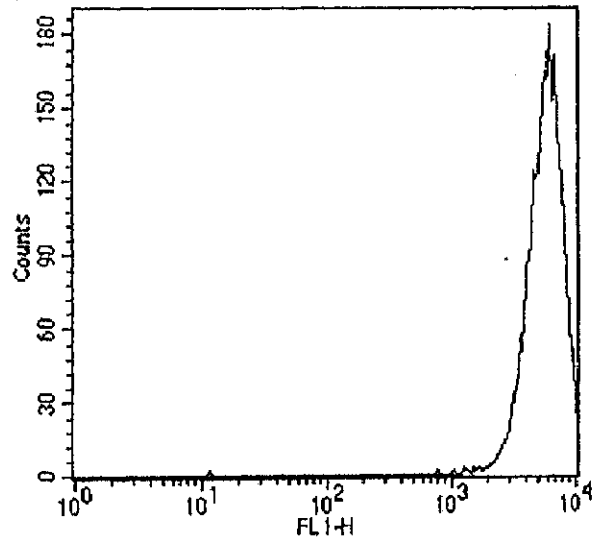


図8 フローサイトメトリーによる  
異種抗原性の測定



# 表1 ブタ細胞のEGFP発現率

	EGFP発現率
クラウンミニブタ由来線維芽細胞 (n=2)	5.5±0.1 %
ブタ脱出胚盤法由来細胞 (n=2)	8.9±4.5 %

注:クラウンミニブタ由来ブタ線維芽細胞とブタ脱出胚盤胞由来細胞において、リポフェクション法でpCAG-EGFP遺伝子を導入48時間後のEGFP陽性細胞数の割合である。

表2 アンチセンスベクター-遺伝子導入後変化した細胞群

アンチセンスベクター-遺伝子導入後 変化した細胞群の個数	1770±743 個
上記の全体に対する割合	11.9±4.3 %

注: 図7d.で示したアンチセンスベクター-遺伝子導入後変化した細胞群の数と、その細胞群の全体に占める割合である。

表3 平均蛍光強度

	平均蛍光強度
ブタ脱出胚盤胞由来細胞コントロール (n=4)	1440±339
アンチセンスベクター遺伝子導入後 変化した細胞群(n=4)	270±122

注: 図7a. d. で示したブタ脱出胚盤胞由来細胞コントロールとアンチセンスベクター遺伝子導入後変化した細胞群の平均蛍光強度をそれぞれ測定し(n=4)平均を出したものである。

discordant 異種移植



超急性拒絶反応

ヒトの自然抗体(anti-Gal)



補体の活性化

内皮傷害

ブタ糖鎖抗原



UDP

$\alpha$ -1,3-galactosyltransferase ( $\alpha$ 1,3GT)

UDP-Gal



discordant 異種移植



超急性拒絶反応

ヒトの自然抗体(anti-Gal)

- ・合成糖鎖抗原による中和(芳賀)
- ・血漿交換

補体の活性化

内皮傷害

ブタ糖鎖抗原

MCP, DAF, CD59 transgenic pig

Gal  $\alpha$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc-R ( $\alpha$ Gal)

・knockout

Endo Gal Cによる切断

・アンチセンスRNA法

UDP

$\alpha$ -1,3-galactosyltransferase ( $\alpha$ 1,3GT)

UDP-Gal

GnT-III transgenic pig

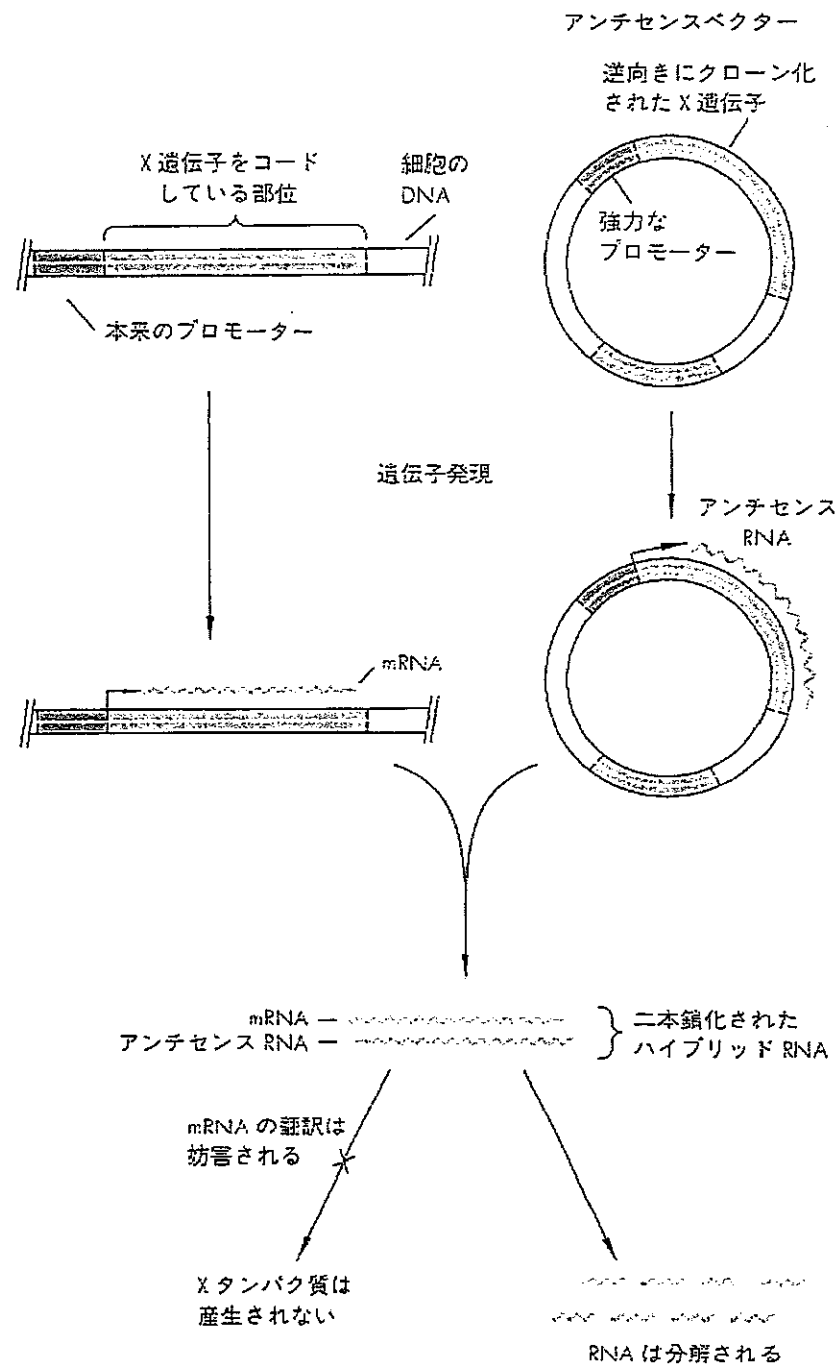
Gal  $\beta$  1-4GlcNAc-R

・ $\alpha$ -1,2-fucosyltransferase

・ $\alpha$ -2,3-sialyltransferase

59

# アンチセンスRNAによる遺伝子発現制御



(J.D.Watson:Recombinant DNA)

# ブタ異種抗原転移酵素に対するアンチセンス RNA 導入による ブタ細胞の異種抗原抑制の試み

小ヶ口 恭介・白幡 康弘・里見 進

東北大学大学院医学系研究科先進外科学分野

大河内 信宏

筑波大学消化器外科

安江 博

独立行政法人農業生物資源研究所ゲノム研究グループ

(2003・2・28 受領；2003・8・1 受理)

2003・10 発行  
移 植 (Vol. 38 No. 5)  
＜日本移植学会雑誌＞  
別 刷

## ブタ異種抗原転移酵素に対するアンチセンス RNA 導入による ブタ細胞の異種抗原抑制の試み

小ヶ口 恭介<sup>1</sup> 白幡 康弘<sup>1</sup> 大河内 信宏<sup>2</sup> 安江 博<sup>3</sup> 里見 進<sup>1</sup>

### Reduction of the Porcine Xenoantigen by Transfection of Antisense $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase RNA

Kyosuke KOKAGUCHI<sup>1</sup>, Yasuhiro SHIRAHATA<sup>1</sup>, Nobuhiro OHKOHCHI<sup>2</sup>,  
Hiroshi YASUE<sup>3</sup>, Susumu SATOMI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Division of Advanced Surgical Science and Technology, Graduate School of Medicine  
Tohoku University, Sendai, Japan*

<sup>2</sup>*Department of Surgery, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan*

<sup>3</sup>*Genome Research Department, National Institute of Agrobiological Sciences, Ibaraki, Japan*

#### [Summary]

**Objective:** In pig-to-human xenotransplantation, the hyperacute rejection triggered by human xenoreactive natural antibody and complement is a big barrier for clinical application. In order to control the hyperacute rejection, we investigated whether the antisense RNA vector could decrease the major xenoantigen of galactose  $\alpha$ -1,3-galactose.

**Methods:** We made the antisense  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase RNA vector and analyzed expression of the porcine xenoantigen after transfection in pig cells.

**Result:** Although it was transient expression, it was able to decrease the xenoantigen of a pig cell.

**Conclusion:** The method that reduced of galactose  $\alpha$ -1,3-galactose by transfection of antisense RNA and prevented translation of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase protein has a possibility that would be one of the means to control hyperacute rejection in xenotransplantation.

**Key words:** Porcine xenoantigen,  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase, Antisense RNA

#### I. はじめに

移植医療の問題点の1つである移植臓器不足の解決法のひとつとして、異種動物からヒトへ臓器を移植する異種移植が挙げられる。このドナー動物としてブタが最も有望とされているが、ブタからヒトへの異種移植においては移植臓器の血管内皮表面に存在する糖鎖抗原 galactose  $\alpha$ -1,3-galactose (以下  $\alpha$ -Gal) に対してヒト血清中に存在する自然抗体である抗  $\alpha$ -Gal 抗体が反応して引き起こされる超急性拒絶反応が大きな

障壁となっている。この  $\alpha$ -Gal は進化の過程で old world monkey 以降ヒトにいたるまで不活化され、逆に血清中に自然抗体として抗  $\alpha$ -Gal 抗体が存在している<sup>1,2)</sup>。

この異種抗原に対する反応を抑えるためにさまざまな研究が試みられているが、 $\alpha$ -Gal の転移酵素である  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase (以下  $\alpha$ 1,3GT) 遺伝子をノックアウトすることが最も有効な戦略として考えられており世界各地で試みられている<sup>3-5)</sup>。一方、アンチセンス RNA 法は相補的塩基配列をもつ RNA が対象遺伝子の発現を阻害する方法であり、遺伝子機能を調べることを目的として広く使われている<sup>6,7)</sup>。われわれは今回、このアンチセンス RNA 法を用い、 $\alpha$ 1,3GT 遺伝子のアンチセンス RNA をブタ細胞に発現させるこ

<sup>1</sup>東北大学大学院医学系研究科先進外科学分野, <sup>2</sup>筑波大学消化器外科, <sup>3</sup>独立行政法人農業生物資源研究所ゲノム研究グループ

(2003・2・28 受領; 2003・8・1 受理)



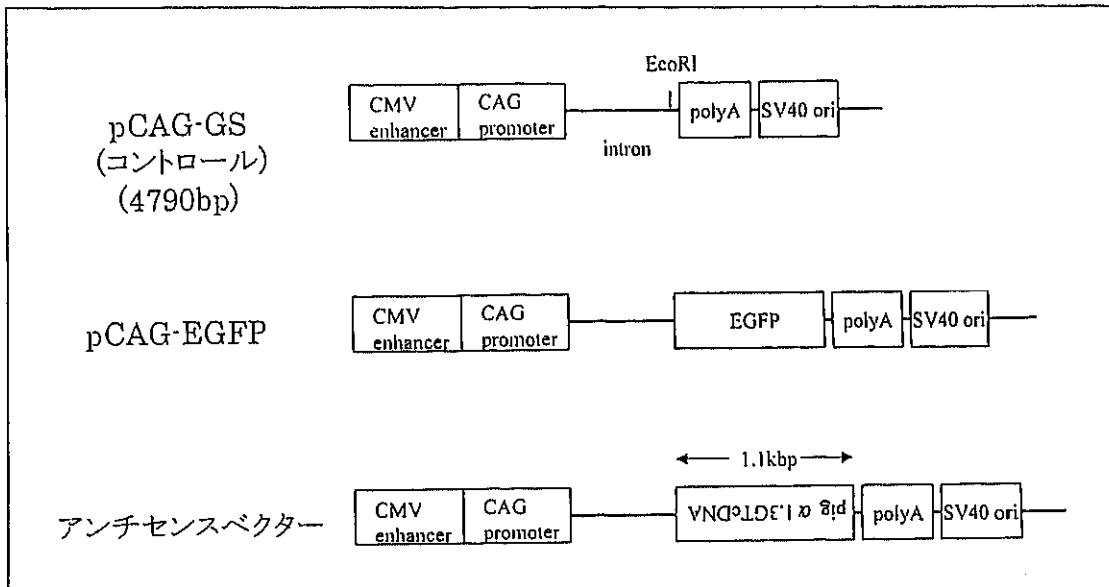


図1  $\alpha$ 1,3GT 遺伝子アンチセンスベクター

とで  $\alpha$ -Gal の発現を抑えられると考え、アンチセンスベクターを作成しその有効性を検討した。

## II. 対象および方法

### 1. 遺伝子導入に用いた細胞

ブタ脱出胚盤胞由来細胞（東北大学大学院農学系研究科動物生殖学分野より供与）を Dulbecco's modified Eagle's medium, 20% fetal bovine serum, 50 U/ml ペニシリン G カリウム, 50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン, 1 mM グルタミン, 0.1 mM 2-メルカプトエタノール, 0.1 mM MEM 非必須アミノ酸溶液, ヌクレオシド溶液 (0.03 mM アデノシン, 0.03 mM グアノシン, 0.03 mM シチジン, 0.03 mM ウリジン, 0.01 mM チミジン), 1000 IU/ml LIF の培地 (pH 7.2) で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。

### 2. $\alpha$ 1,3GT 遺伝子アンチセンス RNA ベクターの作製

ブタ  $\alpha$ 1,3GT 遺伝子の cDNA はブタ cDNA ライブラリー（農業生物資源研究所ゲノム研究グループより供与）を用いて PCR 法にて合成した。 $\alpha$ 1,3GT 遺伝子のエクソン 4 とエクソン 9 上にそれぞれ U36 (5'-ggttctgtca atgctgcttg tctcaac-3') と L958 (5'-tagatg-gctttcatcatgccactcggc-3') のプライマーを設定し、その 2 つのプライマー対で増幅された 1.1 kbp のフラグメントを使用した。得られたフラグメントの 5' 末端, 3' 末端を T4 DNA ポリメラーゼによって平滑化し, pCAG-GS [(農業生物資源研究所ゲノム研究グループ

より供与), cytomegalovirus (CMV) の Early エンハンサーと chicken  $\beta$ -actin 遺伝子プロモーター, ならびにウサギ  $\beta$ -グロビン遺伝子 poly(A) 付加シグナルを持つプラスミド] の EcoRI 消化部位を平滑化したものに, T4 DNA リガーゼを用いてサブクローニングした。得られたクローンについて, 塩基配列を確認しアンチセンスベクターとした。遺伝子導入効率の測定にはプラスミド pCAG-EGFP (農業生物資源研究所ゲノム研究グループより供与) を用いた (図 1)。

### 3. 遺伝子導入法

ブタ脱出胚盤胞由来細胞にアンチセンスベクターならびにコントロールとして pCAG-GS (DNA 2  $\mu$ g 相当) を LIPOFECTOAMINE PLUS Reagent (Life Technologies) を用いて遺伝子導入を行い 72 時間ならびに 1 週間培養し解析した。

### 4. total RNA 抽出, RT-PCR

細胞より塩化グアニジン法に準じて TRIZOL reagent を用い total RNA を抽出した。

逆転写反応は RNA 1  $\mu$ g にプライマー (1  $\mu$ M) oligo (dT) 17-R<sub>1</sub>-R<sub>0</sub> (5'-aaggatccgctgacatcgataatagactcactatagggatttttttttttttttt-3') を加え 70°C で 10 分反応後, MMLV reverse transcriptase, 1 $\times$ RTase buffer, 500  $\mu$ M each dNTPs, RNase inhibitor で全量 20  $\mu$ l とし, 42°C 60 分, 51°C 30 分, 99°C 5 分反応させた。

RT 産物 2  $\mu$ l を ampliTaq DNA polymerase 1U, 1 mM each dNTPs, 1 $\times$ Taq reaction buffer, 1 mM

MgCl<sub>2</sub>, プライマーをそれぞれ 0.8 μM で全量 20 μl とし PCR を (94°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C 1 分) 30 サイクル行った。プライマーは R<sub>0</sub> (5'-gacatcgataatac-gac-3') と L207 (5'-ttgcctatagcgtcttcttcttctgtgg) の組み合わせで mRNA の α1,3GT 遺伝子アンチセンス鎖を同定した。イントロンを挟んだエクソン 8 とエクソン 9 のプライマー対である U296 (5'-aggctcgaccata-accagatggaagg-3') と L1125 (5'-ctgctggcacaatttaaag TCAGatg-3') で mRNA の α1,3GT 遺伝子センス鎖を同定した。

### 5. フローサイトメトリー解析

α-Gal の発現の解析には抗 α-Gal 抗体は現在入手が困難なため isolectin B4 from *Griffonia simplicifolia* I (GS-IB4) というレクチンを用いた。レクチンは糖鎖を特異的に認識して結合、架橋形成するタンパク質であり、GS-IB4 は α-Gal に特異的である。

細胞を 0.1% ウシ血清アルブミン入り phosphate-buffered saline で洗浄後、FITC 標識 GS-IB<sub>4</sub> 20 μg/ml の濃度で氷上で 30 分反応させ、2 回洗浄後、FACS-can cell analyzer で 3×10<sup>4</sup> 個の細胞を解析した (n=4)。

FL1-H を x 軸にしたヒストグラムで蛍光強度の平均を測定した。アンチセンスベクターを遺伝子導入し二相性になったものはヒストグラムからコントロールのヒストグラムの差を出し、その割合の平均を測定した。

### 6. 安定型発現細胞株の樹立

ブタ脱出胚盤胞由来細胞にアンチセンスベクターおよびピューロマイシ耐性プラスミドを 10:1 の比で co-transfection し、ピューロマイシン 3 μg/ml で 1 週間選別しコロニー分離法にてクローニングを行い、上記の解析を行った。

### 7. 結果の記載

数値は平均値あるいは平均値±標準偏差で表した。

## III. 結 果

### 1. 遺伝子導入効率の測定

ブタ脱出胚盤胞由来細胞に pCAG-EGFP を遺伝子導入し 48 時間後に蛍光顕微鏡で観察すると、EGFP 発現細胞の割合は 8.8% であった (n=2) (図 2)。

### 2. RT-PCR

ブタ脱出胚盤胞由来細胞に遺伝子導入してないもの、アンチセンスベクターを遺伝子導入した細胞、pCAG-GS (コントロール) を遺伝子導入した細胞のい

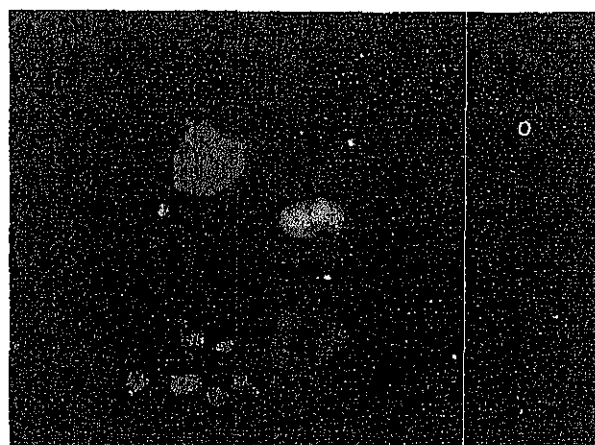


図 2 ブタ脱出胚盤胞由来細胞に対して pCAG-EGFP 遺伝子導入後 48 時間後の蛍光写真 (×200 倍)

ずれも α1,3GT 遺伝子のセンス鎖のバンドの増幅がみられた。アンチセンスベクターを遺伝子導入したものであるのみ α1,3GT 遺伝子のアンチセンス鎖のバンドの増幅がみられた (図 3)。

### 3. フローサイトメトリー解析

ブタ脱出胚盤胞由来細胞を FITC 標識 GS-IB<sub>4</sub> で染色するとほぼ均一の蛍光強度の細胞集団となった (図 4a)。アンチセンスベクターを遺伝子導入し 48 時間培養したものではほぼ変化がなかったが、1 週間培養したものでは蛍光強度が低下した細胞集団ができ、ヒストグラムでは二相性になった (図 4b)。pCAG-GS (コントロール) を遺伝子導入したものでは遺伝子導入しないものとほぼ変化がなかった (図 4c)。この結果をふまえて、アンチセンスベクターを遺伝子導入した時の変化を解析するため、アンチセンスベクターを遺伝子導入したヒストグラム (図 4b) から遺伝子導入しないもの (図 4a) を引いた差を求めると、その集団の全体に対する割合は 11.9±4.3% であった (n=4)。

### 4. 安定型発現細胞株の樹立

α1,3GT 遺伝子のアンチセンス RNA を発現する安定型発現細胞株を数株樹立したが、いずれも α-Gal の発現はコントロールと著変なかった。

## IV. 考 察

ブタからヒトへの異種移植において、超急性拒絶反応を有効に抑制する目的で、糖鎖抗原である α-Gal を除去するためには α1,3GT 遺伝子をノックアウトすることがもっとも効果的であると考えられており、世界各地でノックアウト遺伝子ベクターの作成ならびに遺伝子導入が試みられている。2002 年初頭、2 施設で

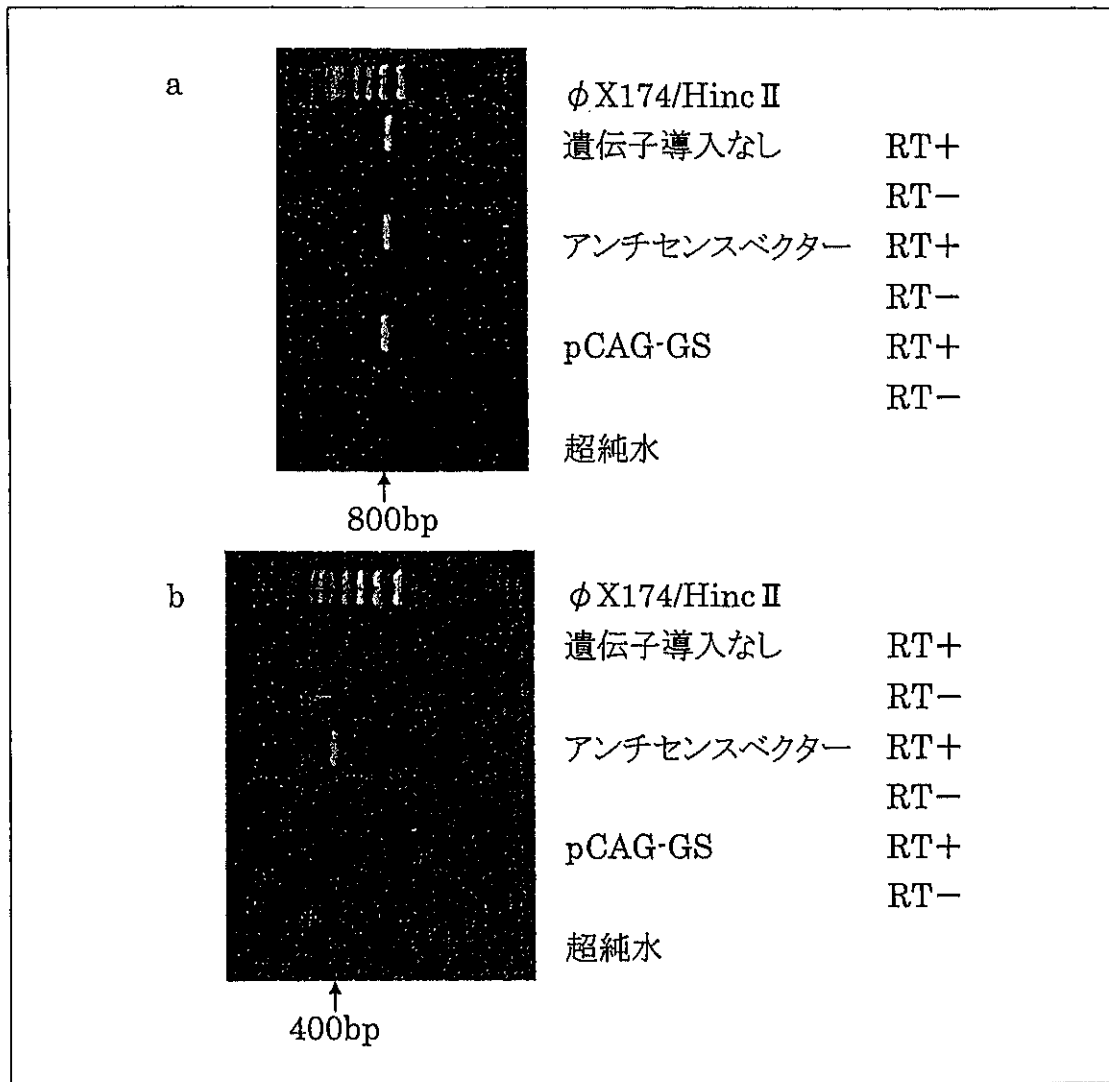


図3 RT-PCR

aは $\alpha$ 1,3GT遺伝子のセンス鎖を, bは $\alpha$ 1,3GT遺伝子のアンチセンス鎖を表す RT+, RT- は逆転写反応の有無を表す

$\alpha$ 1,3GT ノックアウトしたヘテロ接合体のブタが誕生と発表された<sup>3,4)</sup>。しかし,  $\alpha$ 1,3GT ノックアウトマウスでは白内障を発症することが知られており<sup>5,9)</sup>, ブタではマウスよりも $\alpha$ -Galの数が多く,  $\alpha$ 1,3GT ノックアウトホモ接合体の個体では致死性あるいは重度な障害を持つ可能性がある。したがって他の超急性拒絶反応抑制のための戦略も考えておく必要がある。そこで今回, われわれはアンチセンスRNA法を用いて $\alpha$ 1,3GT遺伝子のアンチセンスベクターのブタ細胞への遺伝子導入効果を検討することとした。これまでマウスの細胞で $\alpha$ 1,3GT遺伝子のアンチセンスRNA法による $\alpha$ -Galの発現の低下や<sup>10,11)</sup>,  $\alpha$ 1,3GT遺伝子のアンチセンスのトランスジェニックマウスにおいて

異種抗原性の低下が証明されており<sup>12)</sup>, 異種移植を前提とするとブタ細胞における評価が必要とされる。

$\alpha$ 1,3GT遺伝子のアンチセンスベクターをブタ細胞へ遺伝子導入することによってFITC標識GS-IB<sub>4</sub>の染色後の蛍光強度が変化した細胞集団が作成できた。この細胞集団の割合は遺伝子導入効率とほぼ同等であり, 遺伝子導入された集団と推測された。これらの細胞集団ではコントロールに比べて約1/10の輝度の低下がみられることから, 約90%の $\alpha$ -Galエピトープが抑制されている可能性が考えられる。またRT-PCRの結果より, アンチセンスベクターの遺伝子導入によって $\alpha$ 1,3GT遺伝子のアンチセンスRNAが発現することが証明されたことから,  $\alpha$ 1,3GT遺伝子アンチセ

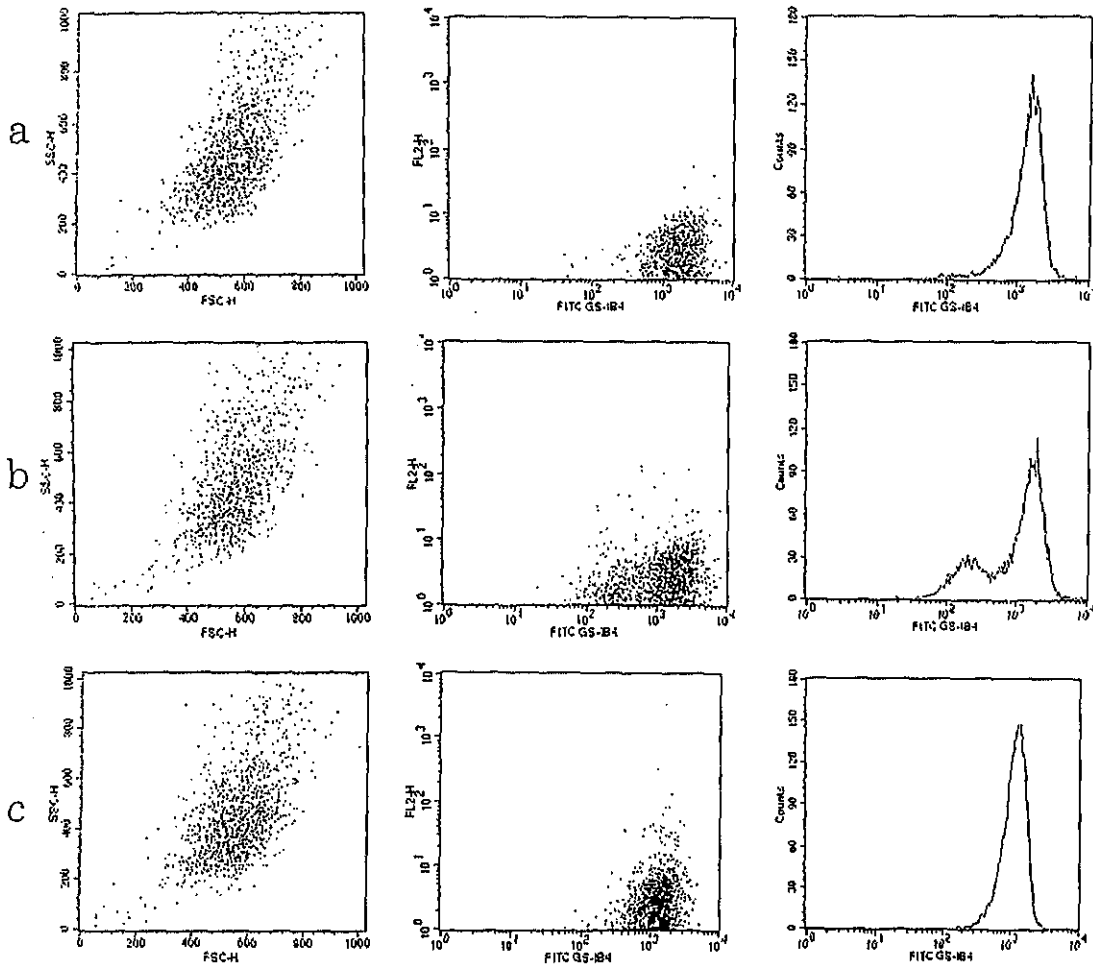


図4 フローサイトメトリー解析  
 aは遺伝子導入していないもの、bはアンチセンスベクターを遺伝子導入したもの、cはpCAG-GSを遺伝子導入したものを示す

ンスベクターの遺伝子導入によってアンチセンス RNA が発現しセンス RNA の翻訳が阻害されることで、 $\alpha$ -Gal 発現の低下が認められたと考えられる。

アンチセンス RNA の作用機序については完全には明らかになっていないが、アンチセンス鎖は細胞内でセンス鎖と相補的な結合を行い、リボソームへの結合を阻害することで翻訳が阻害されると考えられている。今回、 $\alpha$ 1,3GT 遺伝子のアンチセンスベクターの導入により  $\alpha$ -Gal の発現が低下したことから、この手法が有効であることが示唆された。しかしながら、これまでの報告からアンチセンス RNA のタンパク発現抑制効率は 80% 程度であり、完全にはその遺伝子の働きを抑制することができなかった<sup>13)</sup>。加えて、アンチセンス鎖の発現量の調節は困難であるとの問題もあり、さらにアンチセンス部位やプロモーターなどアンチセンスベクターの構造の検討を重ねる必要がある。

また、 $\alpha$ 1,3GT 遺伝子のアンチセンス RNA 安定型発現細胞株を樹立したうえで、詳細な細胞表面抗原の解析を行わなければならない。しかし、 $\alpha$ 1,3GT 遺伝子のアンチセンス RNA が発現する安定型発現細胞株を数株樹立したが、いずれも  $\alpha$ -Gal の発現は変化がなかった。その原因としてアンチセンスの発現量が少ない可能性が考えられ、遺伝子導入法の検討やベクターに付加遺伝子を加えるなどの方法でアンチセンス発現の多い安定細胞株の樹立が必要であると思われる。

現在までのところ、ブタの ES 細胞は樹立されていないが、今回の検討に用いたブタ脱出胚盤胞由来細胞は ES 細胞と同様の方法で樹立されたものであり、多分化能を有している可能性がある<sup>14)</sup>。超急性拒絶反応を起こす異種抗原の発現を減少させた細胞株を樹立することができれば、トランスジェニック動物の作製だけでなく、分化誘導による細胞移植の可能性も開けると思われる。

今回われわれの検討において、 $\alpha$ 1,3GT 遺伝子のアンチセンスRNAベクター導入法は、ブタ異種抗原を減弱させる方法として有効であることが示唆された。

#### 文 献

- 1) Galili U, Rachmilewitz EA, Peleg A, Flechner I. A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *J Exp Med* 1984; 160: 1519-31.
- 2) Galili U, Swanson K. Gene sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7401-7404.
- 3) Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of {alpha}-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002; 295: 1089-1092.
- 4) Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL. Targeted disruption of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 251-255.
- 5) Strahan KM, Gu F, Preece AF, Gustavsson I, Andersson L, Gustafsson K. cDNA sequence and chromosome localization of pig alpha 1,3 galactosyltransferase. *Immunogenetics*. 1995; 41: 101-105.
- 6) Coleman J, Hirashima A, Inokuchi Y, Green PJ, Inouye M. A novel immune system against bacteriophage infection using complementary RNA (micRNA). *Nature* 1985; 315: 601-603.
- 7) Izant JG, Weintraub H. Constitutive and conditional suppression of exogenous and endogenous genes by anti-sense RNA. *Science* 1985; 229: 345-352.
- 8) Thall AD, Maly P, Lowe JB. Oocyte Gal alpha 1,3Gal epitopes implicated in sperm adhesion to the zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required for fertilization in the mouse. *J Biol Chem* 1995; 270: 21437-21440.
- 9) Tearle RG, Tange MJ, Zannettino ZL, Katerelos M, Shinkel TA, Van Denderen BJ, Lonie AJ, Lyons I, Nottle MB, Cox T, Becker C, Peura AM, Wigley PL, Crawford RJ, Robins AJ, Pearse MJ, d'Apice AJ. The alpha-1,3-galactosyltransferase knockout mouse. Implications for xenotransplantation. *Transplantation* 1996; 61: 13-19.
- 10) Xing L, Xia GH, Bai XF, Fei J, Guo LH. Adenovirus-mediated expression of antisense RNA transcripts complementary to pig alpha (1,3) galactosyltransferase mRNA inhibits expression of Gal alpha(1,3) Gal epitope. *Acta Pharmacol Sin* 2000; 21: 1005-1010.
- 11) Hayashi S, Nagasaka T, Koike C, Kobayashi T, Hamada H, Yokoyama I, Saito I, Takagi H. Effect of antisense ribozyme to alpha(1,3) galactosyl transferase gene on the expression of Gal alpha (1,3)Gal epitope. *Transplant Proc* 1997; 29: 893.
- 12) Ma YH, Zhou XG, Hu JH, Fei J, Xia GH, Guo LH. Human xenoreactivity is reduced in mice bearing porcine antisense alpha(1,3) galactosyltransferase cDNA. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22: 231-238.
- 13) Katsuki M, Sato M, Kimura M, Yokoyama M, Kobayashi K, Nomura T. Conversion of normal behavior to shiverer by myelin basic protein antisense cDNA in transgenic mice. *Science* 1988; 241: 593-595.
- 14) Miyoshi K, Taguchi Y, Sendai Y, Hoshi H, Sato E. Establishment of a porcine cell line from in vitro-produced blastocysts and transfer of the cells into enucleated oocytes. *Biol Reprod* 2000; 62: 1640-1646.