

移植臓器生産トランスジェニックブタの開発

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者名	佐藤,英明
発行元	農林水産技術情報協会
巻/号	23巻5号
掲載ページ	p. 15-20
発行年月	2000年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



移植臓器生産トランスジェニックブタの開発

— 作出戦略と研究の現状 —

佐藤 英明

東北大学 大学院農学研究科

ブタの臓器をヒトに移植するためには、トランスジェニックにより補体抑制タンパク質を発現させるのみならず、超急性拒絶反応を誘起する糖鎖抗原を欠失させることが必要である。そのため、いわゆる遺伝子ノックアウトブタの開発が世界的な競走になっている。筆者らは次のような核移植による戦略でノックアウトブタを開発しようとしている。①卵巣から採取した卵母細胞を体外成熟させ、除核未受精卵をつくる。②また体外成熟卵を体外受精・体外発生させ、胚盤胞をつくり、そのような胚盤胞から胚由来細胞株を樹立する。③相同組換えにより標的遺伝子改変細胞をつくり、④これを除核未受精卵に移植し、発生胚を仮親に移植し、糖鎖抗原を持たないブタをつくる。現在まで①、②を解決し、③及び④について緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子導入細胞を用いて基礎技術を開発しているので紹介したい。

1. はじめに

臓器移植は、臓器不全の末期患者に対する治療法として普及してきているが、需要に供給が追いつかないのが現状である²⁾。このようなことから異種臓器移植の研究が本格的に進められるようになってきている。

異種移植の研究は長い歴史をもっている。1960年代にチンパンジー、ヒトの腎臓、心臓、肝臓をヒトへ移植したケースでは、きわめて短期間の生存しか示せなかったものが、1992年のヒトの例では肝臓移植で70日間の生存という成績を出すようになってきている。霊長類以外の異種臓器移植では、ヤギ、ブタの腎臓、肝臓をヒトへ移植した例が知られているが、いずれも短時間ながら生存延長が認められている。異種移植における生存日数の延長は、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、シクロスポリン、FK506などの優れた免疫抑制剤の開発が大きく貢献して

Eimei Saro: Transgenic pig for xenotransplantation

いる。このような免疫抑制剤の臨床応用が、臓器移植を一般的な治療法に押し上げたともいえるし、異種移植が構想されるようになった基盤でもある。現在、異種移植の分野では移植臓器生産トランスジェニックブタの開発が研究の焦点になっている。

2. 移植臓器生産動物としてブタが選ばれる理由

分類学や免疫学の知識にもとづけば、移植臓器生産動物として霊長類が推奨されるが、現実的には霊長類を用いることはきわめて困難である。まず、霊長類の繁殖はきわめて難しい。いかに霊長類の生殖生物学や発生工学が発達しても、繁殖して必要数を用意することは不可能に近い。また、霊長類は、今後、希少動物あるいは絶滅危惧種として保護されようになると予想されるし、霊長類に対する人類の感情からして、きわめて限定された医療にしか使用できなくなるだろう。野生の動物は、霊長類に限らず、

捕獲しても病気の管理ができないことから移植臓器生産動物としては対象外である。

一方、異種臓器移植の研究を進める場合、倫理的な規制を踏まえることが重要であるが、国際移植学会倫理委員会の見解は次の通りである。

- (1) 臨床応用の前に十分な動物実験を行い、成功の可能性が示されていること
- (2) 準備の十分整っているグループによって行われること
- (3) 国、地域、施設などの倫理委員会で承認が得られていること
- (4) レシピエントのインフォームドコンセントが得られていること
- (5) 動物愛護の精神に留意すること

(1)～(4)については、研究者サイドの努力や移植を受ける患者や家族の協力によって解決される事項であるが、(5)は市民の感情に係わる問題であり、宗教や文化に影響され、論理的には簡単に解決できない。西欧的な倫理観によるとイヌなどの愛玩動物は除外され、家畜が対象となる。家畜の中から選抜する場合、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギなどが候補となるが、こうした中でブタがもっとも有力な候補となっている。名古屋大学の高木弘名誉教授は「ブタは愛玩動物として飼われることは例外的で心理的抵抗も少ないと考えられる」とした上で、ブタの適性を次のようにまとめている⁸⁾。

- ・ヒトに適した大きさの臓器が得やすい。
- ・家畜や実験動物としての歴史が長い。
- ・特有の疾患についての解明が進んでいる。
- ・飼育に必要なスペースが比較的小さくてよい。
- ・周年発情で多産である。
- ・養豚が産業となっており、米国では年間8,900万頭、わが国でも年間2,000万頭が屠殺されている。飼育管理に係わる技術の蓄積がある。
- ・心・血管系においては、解剖学的にも、生理学的にもヒトとの類似点が多い。

- ・悪性腫瘍の発生率が低い。
- ・末梢血球数やその大きさがヒトに近く、またヒトと同じく雑食性で血液生化学値や電解質の平均値がヒト正常値に近い。
- ・ヒト肝不全治療にブタ肝による体外灌流の実績がある。また、最近では人工肝としてブタ肝細胞が用いられ、市販されようとしている。

3. 異種臓器移植に伴う超急性拒絶反応

異種臓器移植は2つに分けられる。サルやヒトからヒトというように比較的近縁どうしの組合せを concordant xenotransplantation、一方、ブタからヒトのようなかけ離れた組合せを discordant xenotransplantation と呼ぶ。

ブタ臓器のサルへの移植、これは discordant な組合せであり、ブタからヒトへの移植を考える上でモデルになるが、この場合、移植された臓器に対して臓器を受け入れた個体の補体や抗体が強く反応して、いわゆる超急性拒絶反応を生じる。ブタ腎臓をサルに移植した場合³⁾、血流再開後、腎臓には「血の気」が戻り、同時に尿も排出し始める。しかし、数分もすると、腎臓表面には暗黒色の斑点が出現する。次第に尿の流出も悪くなり、やがて停止する。

このような超急性拒絶反応のメカニズムは次のように考えられている。ブタに対して生まれながらに持っているヒト自然抗体とブタ抗原とが反応して抗原抗体反応が起こり、ヒトの補体系が活性化する。その結果、ブタの腎臓の血管内皮細胞膜が傷害されるとともに凝固系が作動して臓器への血流が途絶する。この結果、移植臓器は壊死に陥る。

4. 超急性拒絶反応の抑制法

discordant な組合せでも、種の組合せによって超急性拒絶反応の発症様式が異なるが、基本的な超急性拒絶反応の抑制方法として、(1) 異種反応抗体の除去、(2) 補体抑制物質の活性化の抑制、(3) ドナー臓器の抗原性の低下などが

試みられている。

(1)の抗体の除去について、血しょう交換やブタ臓器を用いた体外灌流法による試みがあるが、これのみでは移植臓器の生着延長は認められない。一方、ヒトのもつ自然抗体が反応する活性部位がGal α 1-3Galであることが明らかになったことから、この二糖を合成し、大量にヒトに注射すれば、この二糖はヒトの自然抗体と反応するので、自然抗体の機能が中和され、ブタの抗原と反応する自然抗体の数がきわめて減少すると期待される。実際、こうしたオリゴサッカライドを大量に注射すると臓器の生着が大きく延長することが確かめられているが、その量は1時間当たり数10gも必要のため、レシピエントは肺水腫や腎不全に陥る。

(2)について、ヒト補体抑制蛋白の一つであるdecay accelerating factor (DAF)の遺伝子をブタ受精卵に導入し、いわゆるトランスジェニックブタを作り、その心臓をカニクイザルに移植した例がある。通常のブタの心臓は平均5日で拒絶されるが、トランスジェニックブタの心臓を用いた場合、対照を大きく上回ることが明らかにされている。

(3)がもっとも有力な戦略であるが、ブタ臓器の抗原性を低下させるため、細胞性免疫の標的となるMHC Class I抗原あるいは抗原エピトープであるGal α 1-3Galの産生酵素である糖鎖転換酵素(GalT)遺伝子⁹⁾を破壊する方法である。いわゆる遺伝子ノックアウトブタの作出である。今、その開発が世界で激しい競走となっているが、未だ成功例はない。筆者らのグループは核移植技術を用いる戦略をたて研究を進めている。

5. モデルマウスの成果

ヒトの補体抑制蛋白遺伝子を導入したマウスにヒトの血しょうを注射しても、ショック死は免がれる⁹⁾。このことは補体抑制蛋白を発現させると超急性拒絶反応が抑制されることを示唆し

ているが、補体抑制蛋白はいったん抗原抗体反応が起きてから抑制するという戦略であるので、その戦略には自ずから限界がある。それゆえ、遺伝子ノックアウトにより、抗原抗体反応が起きることを抑制しようとする戦略は、マウスにおける研究からも妥当性のある構想として支持されている。

GalT遺伝子ノックアウトマウスが作製されているが、生後4~6週間で白内障を誘発するものの、正常臓器をもつ生存産仔が得られ、発育も順調であることが明らかにされている¹⁰⁾。すなわち、GalT遺伝子をノックアウトしても臓器生産は可能である。

6. 遺伝子ノックアウトブタ作出戦略と研究の進展状況

GalT遺伝子を破壊すると超急性拒絶反応を示さない臓器をもつブタの作出が可能となる。超急性拒絶反応を誘起しない臓器は同種間移植における臓器と同等に扱えると予想されており、GalT遺伝子をノックアウトしたブタが開発されれば、異種移植は実現に向けて大きく前進すると考えられる。

このような遺伝子ノックアウトブタの作出は遺伝子の相同組換えを利用した標的遺伝子改変法の応用により可能となる。私のグループは、この3年ほど、遺伝子ノックアウトブタ作出技術の開発に力を注いでいる。どのように遺伝子ノックアウトブタを作るかについて、私は、核移植を用いる次のような戦略をたてている(図1)。

①卵巣から採取した卵母細胞を体外成熟させ、除核未受精卵をつくる。また②体外成熟卵を体外受精・体外発生させ、胚盤胞をつくり、そのような胚盤胞から胚由来細胞株を樹立する。③胚由来細胞を用い標的遺伝子改変によりGalT遺伝子ノックアウト細胞をつくり、これを除核未受精卵に移植する。④このような再構築胚を体外で培養し、⑤生存胚を仮親に移植する。

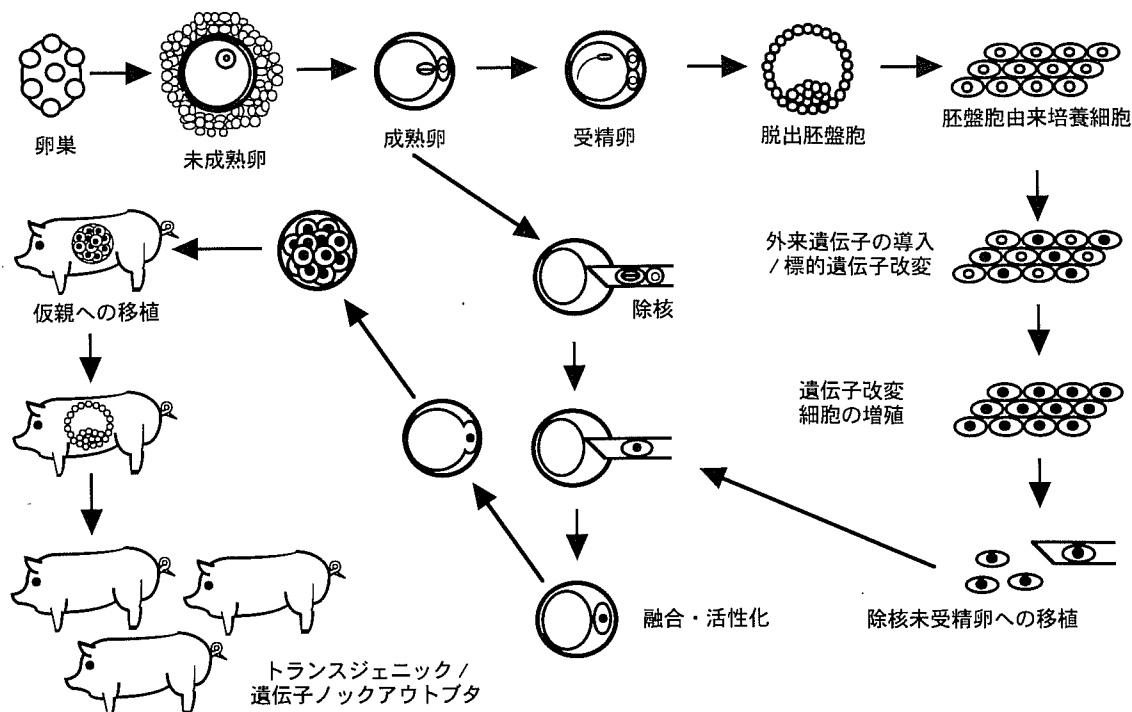


図1 核移植を用いるトランスジェニック，遺伝子ノックアウトブタの作出戦略

現在までに、①、②に係わる技術を確認し、遺伝子操作が可能な胚由来細胞を樹立した。GalT 遺伝子ノックアウト細胞を用いる前段階として緑色蛍光蛋白質遺伝子を導入した細胞を用いて③、④の技術を開発し、再構築胚を脱出胚盤胞期まで発生させることに成功している（図2）。茨城県三和町にあるハムリー（株）の施設を用い、麻布大学の柏崎直巳博士の協力を得て⑤の移植実験を行っている（図3）。

7. GalT 遺伝子ノックアウトブタの開発に向けた研究の現状

前述した戦略で、従来のキメラブタを経由する戦略よりも、短期に、開発費用も安く、さほど大きな飼育施設を併設しなくても移植用臓器をつくるブタを作出できる。個々の技術開発の現状は次の通りである。

1) 除核未受精卵

体外成熟卵を除核し、核移植のレシピエント卵として使うことが可能である。また、培養液の改良により、未成熟卵子の20～30%を体外成

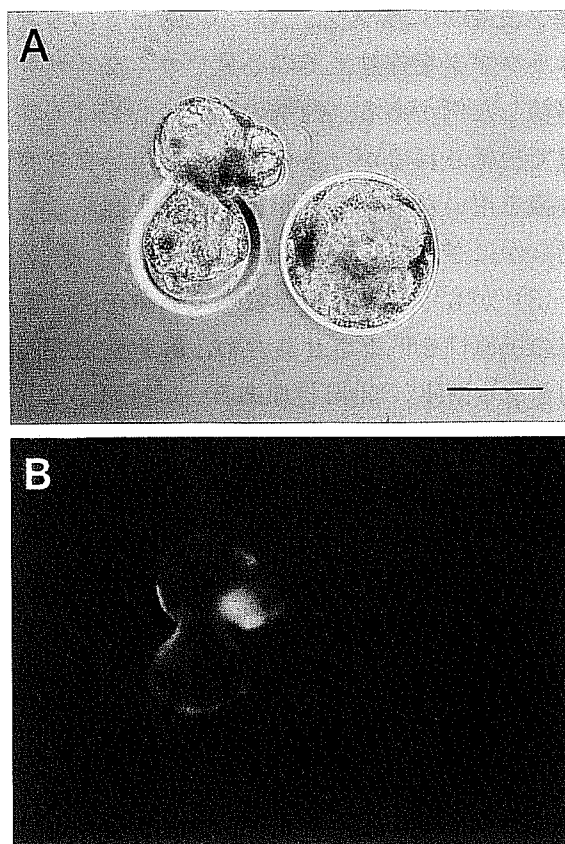


図2 核移植により作成し、脱出胚盤胞まで發育した再構築胚

右側は共培養に用いた単為発生胚。A, Bは同一視野で、Aは普通光下、Bが紫外線下で撮影。バーは100μm。

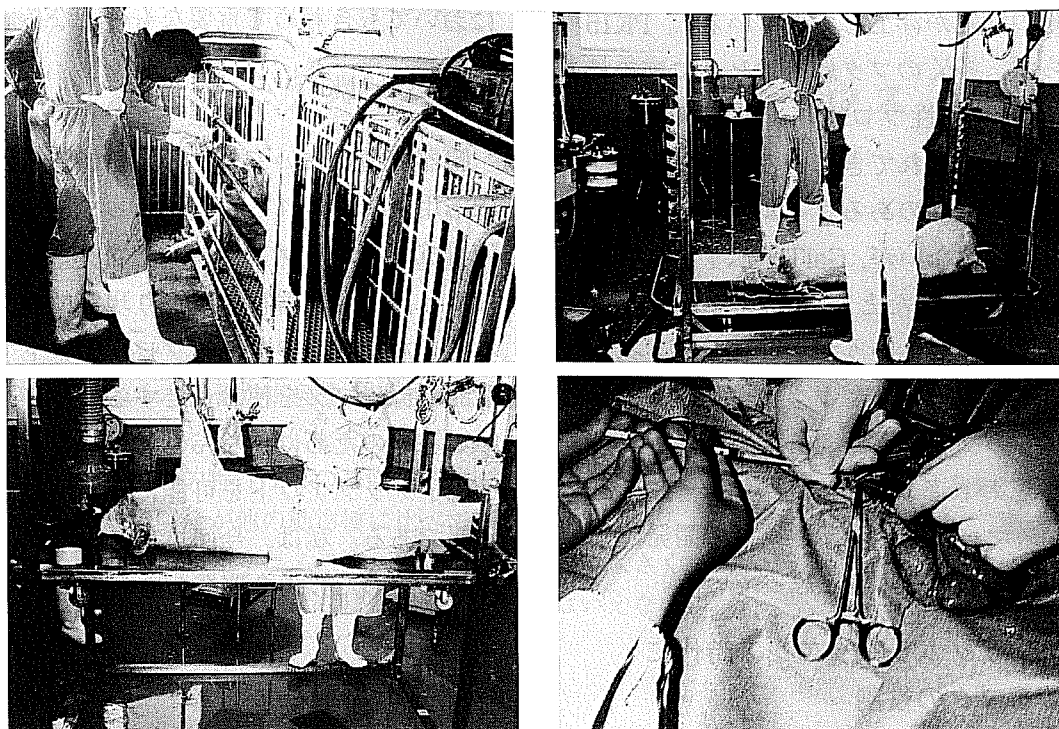


図3 核移植胚の仮親への移植

ハムリー(株)の施設にて。(左上)保定し麻酔をかける。(右上)手術用テーブルに乗せ、手術室へ移動する。(左下)手術台に保定し、(右下)卵管を露出させ、核移植胚を移植する。

熟・体外受精・体外発生により胚盤胞まで発生させることが可能となった⁵⁾。さらに、このような培養液を用いることにより、核移植胚の脱出胚盤胞への発生も可能である。

2) 遺伝子操作が可能な細胞株

筆者らは、卵母細胞の体外成熟・体外受精・体外発生によりつくった胚盤胞から胚由来細胞株を樹立した。この細胞はneo 耐性遺伝子・G418による遺伝子操作が可能であるが、実際に緑色蛍光蛋白質 (GFP) 遺伝子を導入し、遺伝子導入細胞だけ選抜することができた⁶⁾。

3) 核移植

ブタにおいては核移植による再構築胚の産仔への発生は限られており、4細胞期胚の割球を除核未受精卵に移植して1頭の個体が得られているのみである⁷⁾。しかし、私達はGFP遺伝子導入細胞を除核未受精卵と電気融合し活性化する条件を明らかにし、脱出胚盤胞まで発生させ

ることに成功した(図2)。いくつかの点を改良する必要があるが、個体への発生に希望のもてる成果を得ている。

4) 核移植胚の仮親への移植

私は、ブタにおいて、体内受精由来の胚を子宮から回収し、それを仮親に移植し、産仔を得た経験をもつが、現時点では、核移植により作出したブタ胚盤胞の産仔への発生には成功していない。しかしながら、体外成熟・体外受精により作出した2細胞期胚を移植すると産仔が得られる¹⁾。これらの結果は、2細胞期胚の仮親への移植方法が優れていると思われるので、現在、核移植により作製した2細胞期胚を仮親へ移植し、胎子への発育を観察している。

8. ブタ臓器の感染性ウイルス

最近、ブタ腎臓細胞株の一つ、PK15がタイプCのレトロウイルスを産生し、ヒトの細胞株に感染することが指摘され、異種移植によるウイ

ルス感染の問題が浮上してきている⁴⁾。PK15株のみならず、多くのブタ組織にヒトに感染性のある2種の内在性プロウイルス (PVRV-A, PVRV-B)が同定されてきている。どちらのプロウイルスが感染性のあるウイルスの産生に係わるか明らかではないが、GalT遺伝子ノックアウトブタが作出できたとしてもプロウイルスフリーのブタの作製という大きな課題が、次に、待っていると考えた方がよく、異種臓器移植ドナーとしてのブタの開発競争は、今後、長く続くものと思われる。目前の勝敗に一喜一憂せず、よりスマートな発生工学技術の開発競争と考へ、研究を進めるべきと思っている。

9. ポストゲノムシーケンス時代におけるブタの役割

30億塩基対からなるヒトの遺伝子の全構造を解明しようとするゲノムプロジェクトが急速に展開し、今後数カ月で全配列が決定されるころまで進展してきた。ゲノム地図を作成し、それをもとにゲノムDNAクローンの分離と整列化、遺伝子の塩基配列決定へと進む戦略がとられてきた成果である。すべての配列が決定すると、マウスや家畜のゲノムDNAの全塩基配列の決定にも影響を与えることになるが、研究の焦点は次に動物個体を用いる遺伝子の機能解析へと進むことになる。その中で器官形成などはマウスで、脳などの高次機能についてはブタで解析がなされるようになる。臓器生産ブタ開発技術はこのようなポストゲノムシーケンス時代

においてもきわめて重要なものとなる。

10. おわりに

臓器移植においてブタの臓器が注目され、臨床応用が構想される時代になってきているが、臓器抗原をノックアウトしたブタ系統が樹立されると、異種臓器移植はより現実的なものとなる。また、ヒトのゲノムプロジェクトでも高次機能解析にブタを使おうとする動きが出てきている。そのために、なんとしてもブタにおいて遺伝子ノックアウトを可能にする技術の開発が必要である。私は、今回述べたように、核移植法を応用した技術を開発したいと思っている。

参考文献

- 1) Funahashi, H., et al. (1997) *Biol. Reprod.*, 57: 49-53.
- 2) 川内基裕 (1995) 第5回CSKセミナー抄録集, p.6.
- 3) 小池千裕・他 (1995) *臨床科学*, 31: 862-867.
- 4) Le Tissier, P. et al. (1997) *Nature*, 389: 681-682.
- 5) Miyoshi, K. and Sato, E. (1999) *Theriogenology*, 51: 777-784.
- 6) Miyoshi, K. and Sato, E. (2000) *Biol. Reprod.*, 62: 印刷中.
- 7) Prather R.S. et al. (1989) *Biol. Reprod.*, 41: 414-418.
- 8) 高木 弘 (1995) 医学のあゆみ (別冊, メデチカルトピックス), 22: 152-153.
- 9) 玉置 透 (1995) 第5回CSKセミナー抄録集, p. 8
- 10) Tearle R.G. et al. (1996) *Transplantation*, 61: 13-19.

〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1