

氏名	むら かし ひろし 村 上 博
学位の種類	博士 (農 学)
学位記番号	論農博第 2506 号
学位授与の日付	平成 15 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	異種臓器移植モデル家畜の作製に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 今井 裕 教授 佐々木義之 教授 廣岡博之

論 文 内 容 の 要 旨

近年、臓器移植が必要な患者に対して供給されるヒト臓器が絶対的に不足した状況が続いている。その解決策の一つとして、異種動物臓器を利用することが考えられ、その動物の候補として、生理・解剖学的にもヒトと類似点が多いブタが有望視されている。しかし、ブタの臓器をヒトに移植すると、ヒトが持つ異種組織に対する自然抗体が移植片と結合し、連鎖的に補体が活性化される結果、短時間で移植片は拒絶される。この超急性拒絶反応を抑える手段の一つとして、ヒトの補体制御因子をブタの臓器で過剰発現させ、補体反応を抑制する方法が提唱されている。本論文は、遺伝子導入によりヒトの補体制御因子である Decay accelerating factor (hDAF) をブタに発現させ、異種臓器移植研究に供試するモデル家畜を作製することを目的としたものである。

まず、遺伝子組換え家畜の効率的な作製方法を確立するため、ウサギをモデルとして 3 種類の遺伝子による遺伝子導入実験を行い、遺伝子組換え個体の効率的生産に影響を及ぼす種々の要因について検討した。遺伝子導入胚を種々の月齢の受胎雌へ移植して産子生産率を比較したところ、生産率は加齢ともなって低下し、遺伝子組換え個体が得られたのは若齢の受胎雌に限られた。また、胚を採取した供胎雌を遺伝子導入後の胚移植に再利用する、いわゆるドナー／レシピエント法の有用性を検討したところ、発情を同期化した通常の受胎雌を用いた場合とほぼ同等の遺伝子組換え個体の生産効率を得られた。これらの結果から、遺伝子組換え家畜の作製効率の改善には、産子生産効率の高い受胎雌を選抜することが重要であるとともに、胚移植にドナー／レシピエント法を利用することによって供試動物数を大幅に削減できることを示した。

次に、遺伝子組換えブタに使用するプロモーターとして、ブタの補体制御因子である pMCP のプロモーターを用い、遺伝子組換えマウスにおける導入遺伝子の発現効率について検討した。0.9kb 及び 5.4kb の長さの pMCP プロモーター領域を hDAF の cDNA と結合した融合遺伝子を用いて、遺伝子組換えマウスを作製した。これらマウスの遺伝子導入効率および主要臓器における hDAF の発現率は、長さの異なる 2 種類の pMCP プロモーターで同等であった。すなわち、hDAF は血管内皮細胞で最も強く発現するとともに、結合組織、神経細胞などで広範囲に発現していた。血管内皮細胞における hDAF の発現量をヒト細胞での発現量と比較したところ、hDAF を最も強く発現する細胞での発現量はヒトの約 2 倍を示した。対照として作製した、hDAF プロモーターによる遺伝子組換えマウスにおける hDAF の発現は、主として精巣または脳に局限して認められたにすぎなかった。本研究の結果から、pMCP プロモーターは遺伝子組換えマウスにおいて、血管内皮細胞を中心に効率的に hDAF を発現することが認められ、異種臓器移植モデルブタの開発にも有用であることが示された。

最後に、pMCP プロモーターを用いて hDAF を発現する遺伝子組換えブタの作製を行った。マウスと同様、2 種類の pMCP プロモーターをもつ遺伝子をブタ受精卵への遺伝子導入に用いたところ、0.9kb の pMCP プロモーターと hDAF をもつ遺伝子組換えブタの作製に成功した。作製した初代遺伝子組換えブタを継代繁殖させたところ、伝達率は一定ではなかったものの、全ての系統が後代に hDAF 遺伝子を伝達した。遺伝子組換えブタの主要臓器における hDAF の m-RNA 及び蛋白質の発現を RT-PCR、免疫組織化学、ELISA、フローサイトメトリーによって検討したところ、hDAF は全ての臓器で広

範囲に発現しており、血管内皮細胞での発現量はヒトの血管内皮細胞の約2倍を示した。また、遺伝子組換えブタの血管内皮細胞に対して、ヒト補体による異種細胞傷害性試験をおこなったところ、強い抵抗性を示すことを認めた。以上の結果から、pMCPプロモーターを用いて、hDAFを遺伝子組換えブタの全身に強く発現させることが可能となった。

これらのことから、pMCPプロモーターを用いて作製したhDAF遺伝子組換えブタは、各種臓器においてhDAFをヒト以上のレベルで発現しており、その細胞はヒトの補体による攻撃を抑制することを認めたことから、今後異種臓器移植用モデル動物として有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

ヒト臓器移植における絶対的なドナー不足に対して、異種動物である家畜ブタを代替臓器として利用しようとする試みがある。ブタが生理・解剖学的にヒトに類似することがその主たる要因となっているが、異種間臓器移植であるため免疫拒絶反応を避けることができない。特に、ヒトが持つブタ組織に対する自然抗体は、移植組織片と結合し、補体を介した超急性拒絶反応が短時間で起こり、移植片は拒絶される。この拒絶反応を抑える手段の一つとして、ヒトの補体制御因子 (hDAF) をブタ臓器で過剰発現させ、補体反応を抑制する方法が提唱されている。本論文は、遺伝子組換え技術により、hDAFをブタの各種臓器で発現させ、異種臓器移植研究に供試するモデル家畜を作製することを目的としたものである。本研究によって得られた主な成果は、以下のように要約できる。

1. 遺伝子組換えブタの効率的な作製方法を確立するため、ウサギをモデルとして3種類の遺伝子による遺伝子導入実験を行った。遺伝子組換え産子の生産効率は、受胎雌の月齢に依存し、加齢にもなって生産効率は顕著に低下した。遺伝子導入胚を採取するためのドナーと胚移植用のレシピエントとして、全く同一の動物を用いることにより、従来の手法と同程度の遺伝子組換え個体の生産効率が得られた。この手法はブタにも適応が可能であり、大型家畜における遺伝子組換え個体作製の生産コストを低減するために有用であると考えられる。

2. ブタにおいて、広範な臓器でhDAFを効率的に発現させるためのプロモーターの選抜を行った。血管内皮細胞を中心に全身性に発現しているブタ補体制御因子 (pMCP) のプロモーターを、hDAFと融合した遺伝子から遺伝子組換えマウスを作製した。hDAF遺伝子は主要臓器で広範囲に発現しており、発現量もヒトの血管内皮細胞での発現量の約2倍を示す個体もあった。一方、hDAF遺伝子のプロモーターを用いた遺伝子組換えマウスにおけるhDAFの発現は精巣や脳に限られ、補体制御因子の全身性の発現にはブタ補体制御因子のpMCPプロモーターが有効であることを示した。

3. pMCPプロモーターを用いてhDAF遺伝子を発現する遺伝子組換えブタを作製した。これらのブタは導入遺伝子を後代に伝達したが、伝達効率はそれぞれの遺伝子導入ラインで異なることから、遺伝子組換えブタの生殖細胞においてhDAF遺伝子がモザイクで導入されていることが示唆された。

4. 遺伝子組換えブタでのhDAF遺伝子の発現は、主要臓器で広範囲に認められた。また、血管内皮細胞での発現量はヒトのそれに比べ2倍の発現量を示した。これらのブタの血管内皮細胞に対して、ヒト補体による細胞障害性試験を行ったところ、ヒト補体に対する強い抵抗性を示すことが明らかとなった。

以上のように、本研究では、hDAFを広範な臓器で発現する遺伝子組換えブタの作出に成功するとともに、それがヒト補体に対して強い抵抗性を示したことから、今後異種臓器移植研究のための有用なモデル動物として利用できることを示した。この成果は、家畜の新たな利用分野を開拓するとともに、遺伝子組換え家畜の生産技術の進展に有用な情報を与え、家畜遺伝学、家畜繁殖学、実験動物学などの分野の発展に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成15年10月23日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。