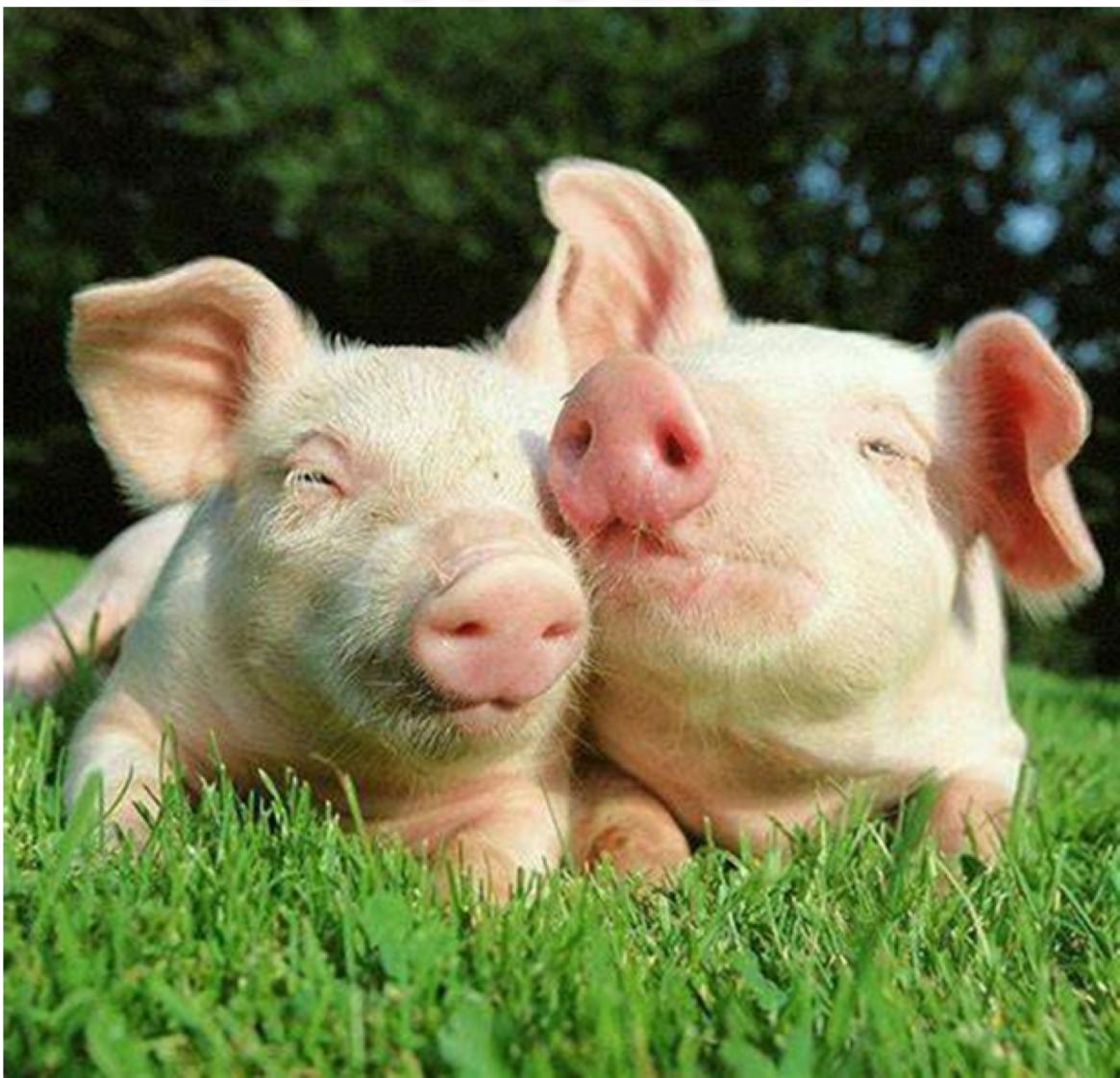


自治医科大学 先端医療技術開発センター シンポジウム2020



平成29年度文部科学省採択事業 共同利用・共同研究拠点形成事業

大型動物を用いた橋渡し研究拠点

研究代表者：先端医療技術開発センター センター長 花園 豊

日 時

2020年2月10日（月） 13:00～17:00

場所：自治医科大学医学部教育・研究棟1階 講堂
栃木県下野市薬師寺3311-1

参加費無料

ご挨拶

自治医科大学先端医療技術開発センター
センター長・教授
花園 豊



時下ますますご清祥のこととお慶び申し上げます。自治医科大学先端医療技術開発センターシンポジウム2020を令和2年2月10日(月)、本学にて開催する運びとなりました。

自治医科大学は、平成21年度先端医療技術開発センター（ポルコパーク、通称ピッグセンター）を設置し、ピッグを利用するユニークな教育・研究を推進しています。本センターは学外者にも開放しています（＊）。本センターは、平成29年度文科省から共同利用・共同研究拠点の認定を受けました。全国には多数の動物実験施設がありますが、拠点認定されたのは本センターが初めてです。平成30年度には全国から公募し採択した19課題のピッグ実験を行いました。現在、本センター利用グループの約半分が学外利用です。本シンポジウムは、拠点活動3年目の報告会の意味合いがあります。

本センターでは、ピッグを用いてiPS細胞治療、遺伝子治療、ゲノム編集治療、腸内細菌叢研究など、マウス等小動物では再現・検証できない医学研究が進められています。本センターで行われている研究は、知財化、治験あるいは上市につながっています。本シンポジウムでは、実用化の近い研究をいくつかご紹介します（慈恵医科大学横尾教授、本学黒尾教授、大森教授のご発表）。本センターでは、今後、医学以外にもコラボの輪を広げ、新領域・境界領域の開拓を進めます（本学原助教の医食協調研究）。

本年度、ピッグ繁殖実験が可能な新館が完成しました。これは、医学系の施設として本邦初です。ここでゲノム編集技術によって疾患モデルピッグ作りを展開できます。本シンポジウムでは、実際にゲノム編集ピッグを多数作成している徳島大学の谷原先生からお話を伺います。一方、ピッグと並びマーモセットも疾患モデル動物として注目されています。マーモセットの第一人者、実験動物中央研究所の佐々木先生からは、疾患モデルとしてのマーモセットのお話を伺います。

昨年は豚コレラが我が国で26年ぶりに発生し大流行しました。豚コレラよりさらに怖いアフリカ豚コレラも中国で猛威を振るっています。農水省や内閣府で食品安全の仕事に携わってこられた日本獣医生命科学大学の青木先生にこの辺りのお話を伺います。

横尾先生、佐々木先生、青木先生のお話は大学院特別講義としての受講が可能です。大学院生の方々もぜひ聴きにいらしてください。（懇親会も無料です！）

*本センターではピッグを用いた研究課題を広く全国から公募しています。

<http://www.jichi.ac.jp/cdamt/>

先端医療技術開発センターシンポジウム 令和2年2月10日(月) @教育研究棟講堂

13:00 ~ 13:05 永井 良三学長 開会の挨拶
13:05 ~ 13:15 花園センター長 イントロダクション

(進行役:阿部講師)

第1部 「医と食のコラボ」 (座長:國田教授)

13:15 ~ 13:30 原 弘真先生
腸内細菌叢ヒト化ピック

13:30 ~ 14:10 青木 博史先生(日本獣医生命科学大学)
再び豚コレラ撲滅に向けて:現状と課題

14:10 ~ 14:20 休憩(10分)

第2部 「モデル動物開発の最前線」 (座長:魚崎准教授)

14:20 ~ 14:50 谷原 史倫先生(徳島大学)
ゲノム編集ピックの作製

14:50 ~ 15:30 佐々木 えりか先生(実験動物中央研究所)
非ヒト靈長類コモンマーモセットモデルの今

15:30 ~ 15:40 休憩(10分)

第3部 「ピックで拓く新しい医療技術」(座長:花園教授)

15:40 ~ 15:55 大森 司先生
血友病ピックを作って遺伝子治療/ゲノム編集で治す

15:55 ~ 16:10 黒尾 誠先生
ピックが可能にした腎不全の新たな治療戦略

16:10 ~ 16:50 横尾 隆先生(東京慈恵会医科大学)
ピック胎仔腎臓原器を利用する腎臓“異種再生医療”

16:50 ~ 17:00 大槻マミ太郎副学長 閉会の挨拶

17:00 ~ 懇親会(地域医療情報研修センター)

【所属機関・講座・氏名】

自治医科大学分子病態治療研究センター再生医学研究部

原 弘真



【略歴】

2010年3月 信州大学纖維学部卒業

2012年3月 信州大学大学院工学系研究科 修士課程修了

2014年9月 信州大学大学院総合工学系研究科 博士課程修了
(農学博士)

2014年10月 日本学術振興会 特別研究員 (DC2→PDに資格変更)

2015年4月 自然科学研究機構 生理学研究所 NIPSリサーチフェロー

2016年3月 自治医科大学医学部 助教

【研究紹介・その他】

専門は、実験動物学および再生医学。現在は主に、先天性遺伝性疾患のゲノム編集治療法の実用化を目指し、マウスおよびピッグを用いた研究を行っている。また、我々が確立したピッグ無菌管理技術を応用し、腸内細菌研究におけるピッグのモデル動物化を目指している。メタジェン・腸内デザイン賞受賞。最近、運動不足の解消のために登山を再開した。

【発表論文】

1. Goto T, **Hara H**, Sanbo M, Masaki H, Sato H, Yamaguchi T, Hochi S, Kobayashi T, Nakauchi H, Hirabayashi M. Generation of pluripotent stem cell-derived mouse kidneys in *Sall1*-targeted anephric rats. *Nat Commun* 2019; 10(1): 451.
2. **Hara H**, Shibata H, Nakano K, Abe T, Uosaki H, Ohnuki T, Hishikawa S, Kunita S, Watanabe M, Nureki O, Nagashima H, Hanazono Y. Production and Rearing of Germ-Free X-SCID Pigs. *Exp Anim* 2018; 67(2): 139-146.
3. Yamaguchi T, Sato, H, Kato-Itoh M, Goto T, **Hara H**, Sanbo M, Mizuno N, Kobayashi T, Yanagida A, Umino A, Ota Y, Hamanaka S, Masaki H, Rashid ST, Hirabayashi M, Nakauchi H. Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. *Nature* 2017; 542(7640): 191-196.
4. **Hara H**, Goto T, Takizawa A, Sanbo M, Jacob HJ, Kobayashi T, Nakauchi H, Hochi S, Hirabayashi M. Rat blastocysts from nuclear injection and time-lagged enucleation and their commitment to embryonic stem cells. *Cell Reprogram* 2016; 18(2): 108-115.
5. **Hara H**, Tagiri M, Hwang IS, Takahashi M, Hirabayashi M, Hochi S. Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa. *Cryobiology* 2014; 68(3): 354-360.

腸内細菌叢ヒト化ピッグ

自治医科大学 分子病態治療研究センター 再生医学研究部

原 弘真

近年の無菌マウスを用いた研究により、腸内細菌叢はその宿主と密接な相互関係にあることが示されている。しかし、腸管のサイズや食事内容がヒトと大きく異なるマウスの実験系で得られた知見は、必ずしもヒトに敷衍できるわけではない。一方、ピッグは解剖生理学的にヒトに近いことから、腸内細菌研究におけるモデル動物として、より適していると考えられる。

これまでに我々は、ピッグを腸内細菌研究で利用する際に基盤技術となる、無菌ピッグの作出技術および無菌管理技術を確立した (Hara et al., *Exp Anim* 2018)。さらに、この技術により作出した無菌ピッグにヒト糞便移植を行うことで、ヒト腸内細菌が定着したピッグを作出することに成功している。現在、ヒト腸内細菌が定着したピッグの腸内細菌叢を解析することで、腸内細菌研究におけるピッグのモデル動物としての可能性を探っている。本日は、これまでに得られた知見について紹介する。

<<メモ>>

【所属機関・講座・氏名】

日本獣医生命科学大学・獣医学部・青木 博史



【略歴】

- 1997年3月 日本獣医畜産大学獣医学科
1997年4月 農林水産省動物医薬品検査所検査第一部 検査官
2003年7月 内閣府食品安全委員会事務局評価課 係長
2003年12月 北海道大学大学院 博士（獣医学）取得
2004年10月 農林水産省動物医薬品検査所検査第一部 主任検査官
2006年4月 日本獣医生命科学大学 獣医学部 講師
2011年4月 同大学 准教授

【研究紹介・その他】

専門はウイルス学・感染症疫学。主に牛・豚のウイルス感染症の基礎研究や疫学調査を進めながら、「実践的な研究」を心掛けて診断・ワクチン開発や感染対策評価にも取り組む。日本ウイルス学会員、日本獣医学会員、獣医疫学会幹事、トガ・フラビ・ペストウイルス研究会会員、豚病研究会員ほか。内閣府食品安全委員会専門委員、農林水産省豚コレラ経口ワクチン対策検討会委員、動物医薬品検査所バイオセーフティ委員、動物医薬品協会緊急ワクチン等安定供給委員会委員、動物薬器材協会監事、岐阜県豚コレラ有識者会議委員ほか多数。趣味はアクアリウム管理と動物や風景の写真撮影。

【発表論文】

- Shiokawa M, Omatsu T, Katayama Y, Nishine K, Fujimoto Y, Uchiyama S, Kameyama K, Nagai M, Mizutani T, Sakoda Y, Fukusho A, **Aoki H.** END-phenomenon negative bovine viral diarrhea virus that induces the host's innate immune response supports propagation of BVDVs with different immunological properties. *Virology* 2019; 583: 97-110.
- Hosono S, Shiokawa M, Kobayashi T, Fukusho A, **Aoki H.** Porcine circovirus type 2 induces a strong cytopathic effect in the serum-free culture cell line CPK-NS cells. *J Virol Methods* 2019; 273: 113706.
- Sunaga F, Masuda T, **Aoki H.**, Ito M, Sano K, Naoi Y, Katayama Y, Omatsu T, Oba M, Furuya T, Shirai J, Mizutani T, Oka T, Nagai M. Complete genome sequencing and genetic characterization of porcine sapovirus genogroup (G) X and GXI: GVI, GVII, GX, and GXI sapoviruses share common genomic features and form a unique porcine SaV clade. *Inf Gen Evol* 2019; 75: 103959.
- Aoki H.**, Sunaga F, Ochiai H, Masuda T, Ito M, Akagami M, Naoi Y, Sano K, Katayama Y, Omatsu T, Oba M, Sakaguchi S, Furuya T, Ouchi Y, Shirai J, Mizutani T, Oka T, Nagai M. Phylogenetic analyses of novel posaviruses detected in feces of Japanese pigs with posaviruses and posa-like viruses of vertebrates and invertebrates. *Arch Virol* 2019; 164: 2147-2151.
- Fukuhara T, Tamura T, Ono C, Shiokawa M, Mori H, Uemura K, Yamamoto S, Kurihara T, Okamoto T, Suzuki T, Yoshii K, Kurosu T, Igarashi M, **Aoki H.**, Sakoda Y, Matsuura Y. Host-derived apolipoproteins play comparable roles with viral secretory proteins Erns and NS1 in the infectious particle formation of *Flaviviridae*. *PLOS Path* 2018; 13: e1006475

再び豚コレラ撲滅に向けて：現状と課題

日本獣医生命科学大学・獣医学部

青木 博史

26年ぶりの豚コレラ：2018年9月に国内で26年ぶりに豚コレラが発生し、2019年11月11日現在までに48事例約15万頭の豚が殺処分された。今回の豚コレラは、過去に日本が経験したものとは様相が異なり、近年にアジア地域で流行する病勢が「中間型」のウイルスである。この型は、臨床症状に乏しいが伝搬力は豚コレラそのものという特徴をもつ。従って、症状による早期発見が難しく、早期摘発のシステム構築が課題の一つとなっている。

野生イノシシの関与：これほど豚コレラが拡大した要因の一つとして野生イノシシにおける流行が挙げられ、豚コレラ拡大阻止を著しく難しくしている。国内に生息する野生動物がここまで流行に関わった家畜重要伝染病は、これまでの日本では無いのではなかとも思う。養豚場における第一発生はインデックス・ケースであって、既に野生イノシシ群にウイルスが侵入し、感染イノシシから豚に伝播したと推察されている。その後も野生イノシシ間で連鎖的に豚コレラが伝播・拡大したこと、野生イノシシが豚にとっての感染源になっていることは明白である。野生イノシシの豚コレラ撲滅なくして養豚界の豚コレラ発生のリスクはなくならないが、野生イノシシの生態の理解なくして豚コレラ対策の効果は望めない。感染症、疫学及び野生イノシシの専門家が協力して解析・検討が続けられている。

豚コレラ撲滅に向けて・アフリカ豚コレラに備えて：2019年10月から豚への予防的ワクチン接種が始まった。しかし、飼養衛生管理の徹底を緩めて良いということではない。また、飼養衛生管理は、隣国で猛威を振るうアフリカ豚コレラに対する現時点での唯一の対策といつても過言ではなく、今こそ強化・徹底すべきである。見えないウイルスに対する対策の難しさを認識させられるが、豚へのあらゆる感染経路を断ち切るために、養豚農家、行政、関係団体、医薬品メーカー、研究者などがスクラムを組んで取り組むことが必須である。

<<メモ>>

【所属機関・講座・氏名】

徳島大学・社会産業理工学研究部・谷原 史倫



【略歴】

2010年3月 山口大学獣医学部卒業
2014年3月 山口大学大学院 連合獣医学研究科修了、
博士（獣医学）取得
2015年1月 徳島大学 糖尿病臨床・研究開発センター 特任助教
2016年4月 同大学 大学院生物資源産業学研究部 特任助教
2017年4月 同大学 大学院社会産業理工学研究部 特任助教

【研究紹介・その他】

専門は家畜の発生工学。現在は CRISPR/Cas9 システムをはじめとするゲノム編集技術により、実験動物として有用な遺伝子改変ピッグの作出に取り組んでいる。家畜として優れた産肉能力を持つピッグは、一方で解剖学的、生理学的にヒトに近い性質を持ち、実験動物としても注目されている。近年、急速な発展を遂げたゲノム編集技術を活用することで、ヒトの医療や再生医療分野の研究に活用できるピッグモデルの作製を目指している。

【発表論文】

1. **Tanihara F**, Hirata M, Nguyen NT, Le QA, Wittayarat M, Fahrudin M, Hirano T, Otoi T. Generation of CD163-edited pig via electroporation of the CRISPR/Cas9 system into porcine in vitro-fertilized zygotes. *Anim Biotechnol* 2019; 26:1-8.
2. **Tanihara F**, Hirata M, Iizuka S, Sairiki S, Nii M, Nguyen NT, Le QA, Hirano T, Otoi T. Relationship among ovarian follicular status, developmental competence of oocytes, and anti-Müllerian hormone levels: A comparative study in Japanese wild boar crossbred gilts and Large White gilts. *Anim Sci J* 2019; 90(6): 712-718.
3. **Tanihara F**, Hirata M, Nguyen TN, Le AQ, Hirano T, Otoi T. Effects of the concentration of CRISPR/Cas9 components on genetic mosaicism of cytoplasmic microinjected porcine embryos. *J Reprod Dev* 2019; 65(3): 209-214.
4. **Tanihara F**, Hirata M, Nguyen NT, Le QA, Hirano T, Takemoto T, Nakai M, Fuchimoto DI, Otoi T. Generation of a TP53-modified porcine cancer model by CRISPR/Cas9-mediated gene modification in porcine zygotes via electroporation. *PloS one* 2018; 13(10): e0206360.
5. **Tanihara F**, Takemoto T, Kitagawa E, Rao S, Do LT, Onishi A, Yamashita Y, Kosugi C, Suzuki H, Sembon S, Suzuki S, Nakai M, Hashimoto M, Yasue A, Matsuhisa M, Noji S, Fujimura T, Fuchimoto D, Otoi T. Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. *Sci Adv* 2016; 2(9): e1600803.

エレクトロポレーションを用いた胚への CRISPR/Cas9 システム導入による ゲノム編集ピッグの作製

徳島大学 社会産業理工学研究部

谷原 史倫

ピッグは生理学的、解剖学的性質や食生活も含めた生物学的特性がヒトに近く、実験により得られた知見をヒトへ外挿しやすいとされている。さらに寿命も長いため長期間の経過観察が可能な優れたヒトモデル動物である。従来、遺伝子改変ピッグの作製は、遺伝子改変を行った体細胞を用いた核移植によるクローンブタの作出（体細胞クローン法）によりなされてきた。体細胞クローン法を用いることではほぼ確実に目的とする遺伝子型を有する産子を得ることができる反面、高度な技術が必要であることから実施できる研究者・研究機関は限られている。私たちの研究グループは、エレクトロポレーションにより CRISPR/Cas9 システムをピッグの体外受精卵に導入することで、高効率に遺伝子改変を行う GEEP 法（genome editing by electroporation of Cas9 protein）を確立し、本法を用いて遺伝子改変ピッグの作製に成功した（谷原ら *Sci Adv* 2016）。CRISPR/Cas9 システムを胚に直接導入しているため、モザイク個体が作出される可能性はあるものの、エレクトロポレーション操作自体は非常に簡便で、容易に遺伝子改変胚を得ることが可能である。これまで、遺伝子のノックアウトにより腫瘍モデルをはじめとする複数種のゲノム編集ピッグを作出してきた他、現在は GEEP 法を用いた胚における点変異の導入にも取り組み、将来的に、より幅広いモデルピッグの作出に展開したいと考えている。本シンポジウムでは、私たちが徳島大学で作製してきた遺伝子改変ピッグについて詳しく紹介する。

<<メモ>>

【所属機関・講座・氏名】

公益財団法人実験動物中央研究所
マーモセット医学生物学研究部
佐々木えりか



【略歴】

- 1995年3月 筑波大学大学院農学研究科卒業 博士（農学）
1996年11月 カナダ オンタリオ州 ゲルフ大学 博士研究員
2001年1月 東京大学医科学研究所・リサーチアソシエイト
2003年4月 財団法人実験動物中央研究所・動物実験センター 研究員
2007年4月 財団法人実験動物中央研究所 応用発生生物学研究室 室長
2010年4月 財団法人実験動物中央研究所・応用発生学研究部 部長
2013-2018年 学校法人慶應義塾大学先導研究センター・特任教授
2014年4月- 公益財団法人実験動物中央研究所・マーモセット研究部 部長
2014年4月- 独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター 客員主管研究員

【研究紹介・その他】

学部生時はヤギ、大学院時代はニワトリ、そして2001年よりマーモセットをモデルに繁殖生理学、人工繁殖、初期発生の研究をしています。意図したわけではありませんが、マウスを使った実験をしたことは殆どありません。

【発表論文】

1. Watanabe T, Yamazaki S, Yoneda N, Shinohara H, Tomioka I, Higuchi Y, Yagoto M, Ema M, Suemizu H, Kawai K, and **Sasaki E**. Highly efficient induction of primate iPS cells by combining RNA transfection and chemical compounds. *Genes Cells* 2019; 24(7): 473-484.
2. Ogonuki N, Abe Y, Kurotaki YK., Nakao K, Aiba A, **Sasaki E**, and Ogura A, Birth of a marmoset following injection of elongated spermatid from a prepubertal male. *Mol Reprod Dev* 2019; 86(8): 928-930.
3. Kumita W, Sato K, Suzuki Y, Kurotaki Y, Harada T, Zhou Y, Kishi N, Sato K, Aiba A, Sakakibara Y, Feng G, Okano H, and **Sasaki E**. Efficient generation of Knock-in/Knock-out marmoset embryo via CRISPR/Cas9 gene editing. *Sci Rep* 2019; 9(1): 12719.
4. Sato K, Oiwa R, Kumita W, Henry R, Sakuma T, Ito R, Nozu R, Inoue T, Katano I, Sato K, Okahara N, Okahara J, Shimizu Y, Yamamoto M, Hanazawa K, Kawakami T, Kametani Y, Suzuki R, Takahashi T, Weinstein EJ, Yamamoto T, Sakakibara Y, Habu S, Hata J, Okano H, and **Sasaki E**. Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing. *Cell Stem Cell* 2016; 19(1): 127-38.
5. **Sasaki E**. Prospects for genetically modified non-human primate models, including the common marmoset. *Neurosci Res* 2015; 93: 110-5.

非ヒト靈長類コモンマーモセットモデルの今

公財) 実験動物中央研究所 マーモセット医学生物学研究部
佐々木 えりか

コモンマーモセット（マーモセット）は、非ヒト靈長類のモデル動物の一種であり、遺伝的、解剖学的、生理学的にヒトとの類似性が高く、マウスでは再現できない疾患などのモデルの一つとして期待されている。マーモセットは小型なため、取扱いが容易であること、創薬の安全性試験などにおいて少ない試料で安全性・有効性の検討が可能であること、野生個体にヒトに危険な人獣共通感染症の報告がなく安全な動物を使用可能であること、に加え、2009年に遺伝子改変マーモセットの作製が可能となり(Sasaki et al., *Nature* 2009)、トランスレーショナルリサーチのモデル動物としての期待も高まっている。

これまでにマーモセットでは、トランスジェニック技術およびゲノム編集技術(Sato et al., *Cell Stem Cell* 2016)による標的遺伝子ノックアウト技術が確立しており、複数種のモデルが作製されてきた。特に近年のゲノム編集の開発により、キメラ個体作製可能な胚性幹細胞を持たない非ヒト靈長類においても標的遺伝子ノックアウトモデル作製が可能になった意義は大きい。しかしながら一方で、胚のゲノム編集では、標的遺伝子のノックアウト改変がモザイクとなって始祖個体で表現型を示さない、標的遺伝子の改変をコントロールできないため、ホモ変異が生じると胎生致死になるという問題がある(Kumita et al., *Sci Rep* 2019)。マウスでは次世代個体を得て解析することは比較的容易であり、この点は大きな問題とはならないが、非ヒト靈長類の中で繁殖力の高いマーモセットでも性成熟までに2年、妊娠期間が約145日必要であり、モザイク改変個体の繁殖を行ない改変遺伝子が均一となっている個体を得るまでには約3年を要する。そのためマウスのように次世代個体を得て多数の個体を用いた解析を行なうことは難しい。この点が遺伝子改変モデル靈長類を用いたトランスレーショナルリサーチを行うための課題であり、この時間的制限を解決するには非遺伝子改変型モデルの開発も重要であると考えている。本シンポジウムでは、これらの問題を解決するための現在の我々の取組みについて紹介する。

<<メモ>>

【所属機関・講座・氏名】

自治医科大学医学部生化学講座病態生化学部門 大森 司



【略歴】

平成 6 年 3 月 自治医科大学卒業

平成 6 年より平成 16 年まで山梨県内の病院・診療所に勤務

平成 8 年より 山梨医科大学 臨床検査医学講座 研究生

平成 16 年 5 月 自治医科大学分子病態治療研究センター分子病態研究部 助教

平成 19 年 11 月 同 講師

平成 27 年 4 月 自治医科大学医学部生化学講座病態生化学部門 准教授

平成 29 年 4 月 自治医科大学医学部生化学講座病態生化学部門 教授

【研究紹介・その他】

血栓止血学一般、特に血友病に対する遺伝子治療の開発に従事。国内初の血友病遺伝子治療製剤の上市を目指し、企業との共同研究を行っている。小児期の根本治療としてゲノム編集の応用も視野にいれている。血液科医員として血友病患者・血栓症患者の診療も行い、患者ニーズを基礎研究に活かすように心がけている。日本血液学会では、プログラム委員、教育企画委員、臨床血液編集委員、診療委員、代議員；日本血栓止血学会では代議員、ありかた委員、保険診療委員を務める。平成12年 日本血栓止血学会学術奨励賞、平成18年 血液血管オルビス最優秀賞、平成19年 血液血管オルビス優秀賞、平成29年 日本血液学会国際シンポジウム Oral Presentation Award Platinum。

【発表論文】

1. Shiraishi Y, Kimura A, Matsuo O, Sakara Y, Takeshita K, and **Ohmori T**. Short-term inhibition of fibrinolytic system restores locomotor function after spinal cord injury in mice. *Sci Rep* 2019; 9: 16024.
2. **Ohmori T**. Advances in gene therapy for hemophilia: basis, current status, and future perspectives. *Int J Hematol* (in press) (invited review).
3. **Ohmori T**, Mizukami H, Katakai Y, Kawai S, Nakamura H, Inoue M, Shu T, Sugimoto H, and Sakata Y. Safety of intra-articular transplantation of lentivirally transduced mesenchymal stromal cells for haemophilic arthropathy in a non-human primate. *Int J Hematol* 2018; 108: 239-45.
4. **Ohmori T**, Nagao Y, Mizukami H, Sakata A, Muramatsu S, Ozawa K, Tominaga S, Hanazono Y, Nishimura S, Nureki O, and Sakata Y. CRISPR/Cas9-mediated genome editing via postnatal administration of AAV vector cures haemophilia B mice. *Sci Rep* 2017; 7: 4159
5. **Ohmori T**, Mizukami H, Ozawa K, Sakata Y, and Nishimura S. New approaches to gene and cell therapy for hemophilia. *J Thromb Haemost* 2015; 13: S133-S142 (invited review).
6. Kashiwakura Y, Mimuro J, Onishi A, Iwamoto M, Madoiwa S, Fuchimoto D, Suzuki S, Suzuki M, Sembon S, Ishiwata A, Yasumoto A, Sakata A, **Ohmori T**, Hashimoto M, Yazaki S, Sakata Y. Porcine model of hemophilia A. *PLoS One* 2012; 7: e49450.

血友病ピッグをつくって遺伝子治療/ゲノム編集で治す

自治医科大学医学部生化学講座病態生化学部門

大森 司

血友病は血液凝固第 VIII 因子、または第 IX 因子異常による遺伝性出血疾患である。近年、血友病に対する根治治療としてアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた遺伝子治療が注目されている。AAV ベクターは凝固因子産生部位である肝臓への遺伝子導入効率が高く、1 回の経静脈投与により、長期にわたり肝臓での遺伝子発現が可能である。我々は、ブタを用いて、効果的・実践的な遺伝子治療法ストラテジーの開発を続けている。

- 1) ブタ血友病の作製：ブタ凝固第 VIII 因子は、ヒト血友病治療にも使用される程、その生理機能はヒト第 VIII 因子と類似している。2012 年、農業生物資源研究所（現 農研機構 動物機能改変ユニット）との共同研究で、クローン技術によって血友病ピッグモデルの作製に成功した。出生した血友病ブタは、重度の出血傾向をしめし、出血傾向はヒト凝固因子製剤の投与により改善した。農研機構では、安定した血友病ブタの供給のため、マウス体内で血友病ブタ精子を成熟させ、ヘテロブタの産出に成功している。
- 2) ブタを用いたベクター投与法の開発：先端医療技術開発センターとの協力により、AAV ベクターによるブタへの遺伝子治療効果を IVIS イメージングシステムによって可視化することに成功した。また、げっ歯類では不可能なベクター門脈投与の安全性についてブタを用いて検討している。門脈を介したベクター注入法は、抗 AAV 抗体陽性個体における遺伝子導入に優れているが、ブタを用いて効果と安全性を評価することで、実際のヒト臨床試験の SOP に反映できるデータを蓄積する予定である。

<<メモ>>

【所属機関・講座・氏名】

自治医科大学分子病態治療研究センター抗加齢医学研究部

黒尾 誠



【略歴】

- 1985年3月 東京大学医学部医学科卒業
1987年3月 東京大学医学部附属病院第三内科入局
1991年3月 学位取得（医学博士・東京大学）
1998年6月 テキサス大学サウスウェスタンメディカルセンター病理学助教授
2006年9月 テキサス大学サウスウェスタンメディカルセンター病理学准教授
2012年9月 テキサス大学サウスウェスタンメディカルセンター病理学教授
2013年10月 自治医科大学分子病態治療研究センター抗加齢医学研究部教授

【研究紹介・その他】

1960年栃木県黒磯町生まれ。1978年東京教育大学附属高校卒業。東京大学医学部医学科卒後、同第三内科に入局して循環器内科医を目指すも、高血圧のモデルマウスの開発のためにマウスの遺伝子操作中、偶然早老症を呈する突然変異マウス（Klotho マウス）を作ってしまったのをきっかけに、老化の基礎研究に転職して渡米。テキサス大学サウスウェスタンメディカルセンター病理学で15年余り Klotho 遺伝子の機能について研究。2013年より自治医科大学分子病態治療研究センター抗加齢医学研究部教授。現在もまだ Klotho マウスがなぜ早く老いるのか、について研究している。趣味は日本史と日本酒。Irvine H. Page Arteriosclerosis Research Awards for Young Investigators, American Heart Association (1997年) ベルツ賞 (1998年)、Jack W. Coburn Endowed Lectureship, American Society of Nephrology (2008年)、日本腎臓財団学術賞 (2017年)。

【発表論文】

1. **Kuro-o M.** The Klotho proteins in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2019; 15: 27-44.
2. Miura Y, Iwazu Y, Shiizaki K, Akimoto T, Kotani K, Kurabayashi M, Kurosu H & **Kuro-o M.** Identification and quantification of plasma calciprotein particles with distinct physical properties in patients with chronic kidney disease. *Sci Rep* 2018; 8: 1256.
3. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP & **Kuro-o M.** Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. *Science* 2005; 309: 1829-33.
4. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW & **Kuro-o M.** Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem* 2006; 281: 6120-3.
5. **Kuro-o M.**, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R & Nabeshima Y. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390: 45-51.

ピックが可能にした腎不全の新たな治療戦略

自治医科大学 分子病態治療研究センター 抗加齢医学研究部

黒尾 誠

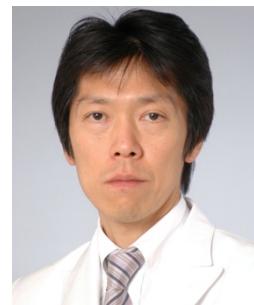
Klotho 遺伝子は 1997 年、早老症を呈する突然変異マウスの原因遺伝子として同定された。Klotho 欠損マウスは、生後 4 週頃からサルコペニア、骨量減少、心肥大、血管石灰化、認知症などの症状を呈してフレイルの状態となり、8 週齢前後で早死にする。その後の研究で、Klotho 遺伝子はリン利尿ホルモン FGF23 の受容体をコードしていることが分かった。すなわち、Klotho 欠損マウスの病態の本質は、尿中リン排泄障害に起因するリン恒常性の破綻と考えられる。実際、Klotho 欠損マウスは高リン血症を呈するが、低リン食で飼育すれば全ての症状が軽快することから、「リンが老化を加速する」という概念が生まれた。

Klotho 欠損マウスの症状・病態は透析患者と良く似ている。しかし、Klotho 欠損マウスは尿中ヘリンが排泄できないだけで他の腎機能は正常であり、腎不全の状態ではない。これは、リンが最も重要な「尿毒症性毒素」であることを示唆する。リンが老化様症状を引き起こすメカニズムを追求していく中で、リンの細胞毒性はカルシウムの存在下でしか発揮されないことを見出し、リンそのものではなくリン酸カルシウムがリン毒性の原因物質であることを突き止めた。血中では、リン酸カルシウムは血清蛋白 Fetuin-A と結合して CPP と呼ばれるコロイド粒子として存在する。そこで我々は、「CPP が老化様症状の原因物質である」という仮説を立て、これを検証するために血中から CPP を吸着除去する「CPP 吸着力ラム」を開発し、ミニブタ血液透析モデルを用いてその有効性を検証中である。本講演では、腎不全に対する新たな治療標的としての CPP について解説する。

<<メモ>>

【所属機関・講座・氏名】

東京慈恵会医科大学 腎臓・高血圧内科 横尾 隆



【略歴】

- 1991年 3月 東京慈恵会医科大学医学部卒業
1993年 5月 英国 University College London 医科大学留学
1996年10月 東京慈恵会医科大学大学院医学系研究科修了、博士
(医学) 取得
1997年 1月 帰国、東京慈恵会医科大学第二内科（現腎臓高血圧内科）助教
2007年 4月 東京慈恵会医科大学DNA医学研究所プロジェクト研究部腎臓再生研究室
室長（兼務）
2010年 3月 東京慈恵会医科大学腎臓・高血圧内科 講師
2013年 4月 東京慈恵会医科大学腎臓・高血圧内科 主任教授

【研究紹介・その他】

日々腎臓病患者の診療を行い、何とか透析に代わる次世代治療法の開発ができないかと 20 年以上にわたり腎臓再生研究に従事している。開始当初から腎臓再生は不可能であると批判されてきたが、楽観的な性格のためか絶対に可能であると信じて進めてきた。臨床と研究を両立させることでモチベーションを維持できると考えている。日本腎臓学会理事、NPO 法人日本腎臓病協会監事などを務める。日々のストレス解消はジョギングで月 250 キロ前後走る。フルマラソン の自己ベストは 50 歳時の 3 時間 48 分。年々衰えを感じつつ自己ベスト更新が目下の目標となっている。

【発表論文】

- Yamanaka S, Saito Y, Fujimoto T, Takamura T, Tajiri S, Matsumoto K, **Yokoo T**. Kidney Regeneration in Later-Stage Mouse Embryos via Transplanted Renal Progenitor Cells. *J Am Soc Nephrol* 2019; 30(12): 2293-305.
- Fujimoto T, Yamanaka S, Tajiri S, Takamura T, Saito Y, Matsumoto K, Takase K, Fukunaga S, Okano HJ, **Yokoo T**. In vivo regeneration of interspecies chimeric kidneys using a nephron progenitor cell replacement system. *Sci Rep* 2019; 6:9(1): 6965.
- Saito Y, Yamanaka S, Fujimoto T, Tajiri S, Matsumoto N, Takamura T, Matsumoto K, **Yokoo T**. Mesangial cell regeneration from exogenous stromal progenitor by utilizing embryonic kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 2019; 520(3): 627-33.
- Tajiri S, Yamanaka S, Fujimoto T, Matsumoto K, Taguchi A, Nishinakamura R, Okano HJ, **Yokoo T**. Regenerative potential of induced pluripotent stem cells derived from patients undergoing haemodialysis in kidney regeneration. *Sci Rep* 2018; 8(1): 14919.
- Yamanaka S, Tajiri S, Fujimoto T, Matsumoto K, Fukunaga S, Kim BS, Okano HJ, **Yokoo T**. Generation of interspecies limited chimeric nephrons using a conditional nephron progenitor cell replacement system. *Nat Commun* 2017; 8(1): 1719.

ピッグ胎仔腎臓原器を利用する腎臓 “異種再生医療”

東京慈恵会医科大学 腎臓・高血圧内科

横尾 隆

近年、免疫抑制剤の進歩やブタ遺伝子改変技術の向上によって、ブタ腎臓を用いた異種移植の臨床応用が期待されるようになってきた。すでに完成された腎臓をそのまま使えるので免疫制御が可能であれば同種移植のように腎機能が保持できると想定されるが、現時点では長期生着は難しく、また強力な免疫抑制下のレシピエントの管理も大きな問題である。一方、幹細胞から臓器を作る再生医療は、iPS 細胞樹立法の開発とともに飛躍的に進歩してきた。しかし固有臓器に成功するにはまだ長い道のりが残されている。我々はこの両者の欠点を相殺し、より現実的な腎臓再生法の開発を進めてきた。この“異種再生医療”とは、異種胎仔内の腎臓発生ニッチに iPS 細胞由来腎臓前駆細胞を注入した Kidney Seed を移植し、レシピエントの体内で成熟した腎臓を作るものである。既存の異種前駆細胞は遺伝子操作により成熟過程で除去することで iPS 細胞由来ネフロンが完成する。この再生腎臓はすでに齧歯類で尿が生成できることが確認されており、ブタを用いた検証を開始している。この方法では、移植後 5 週間程度の異種細胞が体内に残る期間のみの免疫抑制剤使用でよく、また iPS 細胞から成熟した固有臓器を作成することができる。本シンポジウムでは、この異種再生医療という新しい概念を提唱しそれぞれの分野でご活躍の先生方とその有効性と問題点についてディスカッションしたい。

<<メモ>>



本センターでは、再生医療、遺伝子治療、ゲノム編集治療、腸内細菌叢研究など、マウス等小動物だけでは再現・検証できない新領域の研究が進められています。この中には、知財化、治験、上市につながった研究もあります。

本センターは学外の皆様にもご利用いただけます。お申し込みいただくと、ブタの購入から麻酔管理、術後管理なども請け負います。施設見学は随時受け付けています。

センター既存設備・使用可能機材について

自治医大附属病院と同等レベルの設備・機材

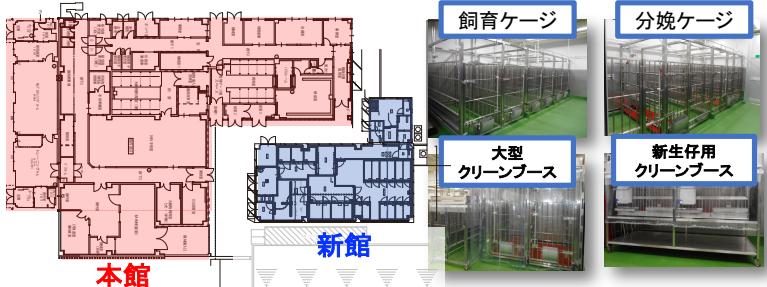


既存設備・使用可能機材として、本センターにはピッグ専用の手術室、手術支援ロボット（ダ・ヴィンチ）、1.5テスラMRI、検出器128列のCT、CアームX線撮影装置等を整備しています。これらは、全て自治医大附属病院と同等レベルのものです。また、病院の細胞調整室と同じシステムのセルプロセッシングセンターや集中治療室を有しています。セルプロセッシングセンターと手術室の間はパスボックスを介して細胞やサンプルの受け渡しが可能です。

ピッグ繁殖実験が可能な新館が本年度完成しました。これは、医学系の動物実験施設として本邦初です。ここでゲノム編集技術によって疾患モデルピッグ作りを展開できるようになります。また、この増築によって、ピッグ収容頭数が27頭から54頭に倍増し、体重200kgまでのピッグや仮親ピッグの飼育ができるようになります。これにより長期飼育の必要な研究課題を受け入れやすくなります。さらに、クリーンブース型大型ケージを設置しました。SCIDピッグの長期飼育も可能です。

新館の増築によって…

- センター全体のピッグ収容頭数が27頭→54頭に倍増
→長期飼育に伴うケージ不足の解消
- クリーンブース型大型ケージの設置
→免疫抑制や骨髓抑制を行ったピッグ、免疫不全ピッグの長期飼育に対応
- 200kgまでのピッグ・仮親ピッグの飼育に対応
→長期試験が可能に
- ゲノム編集ピッグ作出に対応
→「疾患モデル作出～疾患研究」の一連の実験が可能に



利用法・利用料金について

共同利用・共同研究課題の公募 (年1回公募)

- 公募方法：ホームページに公示（3月頃）
(<http://www.jichi.ac.jp/cdamt/index.html>)
日本外科学会、日本先進医工学ブタ研究会の推薦があれば隨時受付
- 応募資格：大学、公的研究機関等に属する研究者
- 審査結果：申請者へ採否を通知（6月頃）

<費用例>AAVベクター髄腔内投与による安全性検証実験

実験期間3ヶ月、ベクター投与時にCアームを使用し、脳のMRI撮像を2回行った場合 = 1頭あたり約60万円（税込）

センター利用料金（一部抜粋）

経費項目	共同利用料金
センター利用料	60円/人
スクラブ（上下着）料	170円/組
手術室使用料	10,000円/日
ピッグ購入費	実費 + 手数料 (10%)
検疫費用	7,700円/頭
術後飼育管理費	1,100円/頭/日
前麻酔処置	7,700円/頭
MRI使用料	38,900円/頭
CT使用料	31,800円/頭
Cアーム使用料	18,100円/頭

企業の方は、共同利用とは別にセンター利用のご相談に随時応じています。お気軽にお問い合わせください。