

医療分野研究成果展開事業/研究成果最適展開支援プログラム (AMED・A-STEP)

平成 27 年度成果報告書(公開)

プロジェクトリーダー (企業責任者)	株式会社イナリサーチ 代表取締役 中川 賢司
研究責任者	学校法人東海大学 医学部 准教授 椎名 隆
参加機関	株式会社イナリサーチ、学校法人東海大学、 国立大学法人滋賀医科大学、学校法人慶應義塾
研究開発課題	MHC 統御カニクイザルの有用性評価と計画生産の検討

## 1. 研究開発の目的

### (1)最終的に目指す事業化

- ① カニクイザル MHC 遺伝子の新規タイピング法を開発することによる MHC 遺伝子のタイピング検査の受託ビジネスへの展開
- ② MHC 遺伝子ホモ接合体から作製した iPS 細胞および誘導分化細胞は、同じハプロタイプを持つ MHC ヘテロ接合体に生着する可能性が高いことを利用した MHC ヘテロ接合体カニクイザルの生産販売供給ビジネスへの展開
- ③ MHC 遺伝子ホモ接合体から作製した iPS 細胞および誘導分化細胞は、異なるハプロタイプを持つ MHC ヘテロ接合体に拒絶する可能性が高いことを利用したコントロールカニクイザルの生産販売供給ビジネスへの展開
- ④ MHC 統御カニクイザルモデルを用いた移植実験の受託ビジネスへの展開

### (2)本技術がインパクトを与える用途、利用分野、市場

- ① 臨床研究への橋渡し実験動物モデルとした iPS 細胞研究、再生医療研究、がん研究、感染症研究、免疫研究、臓器移植研究、医薬品開発研究への利用
- ② 移植による免疫寛容を示す生物学的にヒトに近縁・類似した霊長類は他に競合するものがないことによる独占的な市場
- ③ MHC 統御ザルの強い生産・供給要望と今後の大きな需要の見込みと事業性の増大

## 2. 研究開発の概要；

### (1)効率的、経済的な新規 MHC タイピング法の開発とその検証

本計画以前に確立したカニクイザル MHC 遺伝子の DNA タイピング法は、それに使用する次世代シーケンサーの試薬、修理・保守などの商業サービスが中止されることになった。そこで本項目では、新規の DNA タイピング法開発の必要性から、手法の簡略化、時間短縮や経済性を加味した別の次世代シーケンサーを用いた DNA タイピング法を開発する。

### (2)MHC ホモ接合体カニクイザルにおける遺伝学的ならびに免疫学的情報の収集

検出した数種類の MHC ホモ接合体から採取した RNA サンプルを対象に次世代シーケンシングと定量 PCR 解析により得られた MHC 各遺伝子における相対的な発現量比較や、MHC ホモ接合体のリンパ球を用いたペアーワイズな MLR による MHC ハプロタイプ間における免疫応答能の相違を明ら

かにすることで MHC ホモ接合体の間での遺伝学的ならびに免疫学的な差異を検討する。

### (3) 臓器・iPS 細胞移植実験による MHC 統御カニクイザルザルの有用性の検証

間葉系幹細胞(MSC)は免疫抑制効果を有することで移植寛容を増強するツールとして使用が期待されていることから、MHC ホモ接合体由来 iPS 細胞から樹立した MSC を iPS 細胞由来の腫瘍細胞と同時移植して腫瘍の生着期間の延長を評価する。さらに、同じ MHC ハプロタイプを有する 2 頭の MHC ヘテロ接合体個体の子宮の同種移植の実験を行い、超音波診断検査、生体反応、病理組織学的検査などから子宮の生着性を評価することによる MHC 統御カニクイザルの有用性を、免疫抑制剤のプロトコール作成と併せてヒトへの臨床応用を見据えた橋渡し検証を行う。

### (4) MHC 統御ザルの系統確立および安定供給体制の確立

再生医療、臓器移植医療、感染症研究、がん研究、ワクチンや医薬品開発研究などに需要が想定される MHC ヘテロカニクイザルや特定のアレルを持たないコントロールサルの人為的作出のために 4 種類の MHC ハプロタイプに集約した繁殖生産コロニーを設置して将来の供給に備える。また、現存で検出が希少な繁殖用オス親(MHC ホモ接合体)のため設置できるコロニー数が限られており、補助的な人工繁殖として、貴重な授精胚を有効活用する分割クローン胚の作出検討および顕微鏡を用いない人工授精法の開発も同時に進める。

## 3. 研究開発の成果(平成 27 年度)

### (1) 効率的、経済的な新規 MHC タイピング法の開発とその検証(東海大学、株式会社イナリサーチ)

- ①次世代シーケンサー IonPGM system を用いた新しい DNA タイピング法の開発を進め、新規試薬、シーケンシング反応条件、アレル判定法などの検討を終えて MHC タイピングのためのプロトコールの概略を完成させた。
- ②24 サンプルの DNA タイピングを同時に検査するための IonPGM system 用のプライマーを設計して PCR 増幅を行ったところ良好な増幅を確認した。今後、一部のプライマーの再設計を施した上で DNA タイピング法の検証実験に取り掛かる。

### (2) MHC ホモ接合体における遺伝学的ならびに免疫学的情報の収集(東海大学、滋賀医科大学)

- ①Mafa-E、Mafa-F の多型解析:特異的に増幅するプライマーを設計して PCR および次世代シーケンスの結果、12 種類の Mafa-E ハプロタイプ、7 種類の Mafa-F アレルを同定した。
- ②MHC ホモ接合体におけるゲノムワイドな多型解析:MHC ホモ接合体における MHC 遺伝子以外の ABO 型遺伝子など 17 種類の血液型遺伝子、MHC プロセッシングに関与する 6 種類の MHC 関連遺伝子、CCR1 や CXCL10 など 38 種類のケモカイン遺伝子、CD4 や CD8 など 17 種類の細胞表面分子遺伝子、MX1 や TLR7 などの 12 種類の自然免疫関連遺伝子、IFNAI や IL6 など 87 種類のサイトカイン遺伝子の計 177 種類の遺伝子をシーケンスキャプチャ法による多型解析を進めている。
- ③MHC ハプロタイプ間の MHC 遺伝子の相対的発現量の比較解析:iPS 再生細胞や移植片などにおける MHC 遺伝子発現を精度高く測定する方法として次世代シーケンス法と定量 PCR 法を併用した手法を検討して有用性を確認した。
- ④移植時の拒絶反応を予測する *in vitro* 試験としての ERISPOT 法による IL-2 を測定する MLR が確

立した。MLR stimulator として MHC ホモ接合体由来の新鮮血単球から iPS 細胞由来のマクロファージを誘導して増殖性の良好な不死化細胞を作出することでの試験の効率化・利便性を検討している。

(3) 臓器・iPS 細胞移植実験による MHC 統御ザルの有用性の検証(滋賀医科大学、慶應大学)

- ①MHC ホモ接合体由来 iPS 細胞から iMSC および血管内皮細胞(iVEC)を作製し、同由来の腫瘍細胞と B6 マウスに共移植して腫瘍の生着性の延長を確認した。また、MHC ヘテロ接合体カニクイザルに iMSC と iVEC と共に皮膚移植実験の検討を進めている。
- ②子宮移植:体躯の小さいカニクイザルの子宮移植手術をより太い血管吻合への術式や術中の麻酔管理の変更などにより手術手技は確立した。MHC ミスマッチのカニクイザルを用いた同種他家移植の結果、子宮は生着したが、免疫抑制剤の摂取不良により術後3か月での拒絶反応を認めた。現在、MHC 半合致移植のための準備を進めている。

(4)MHC 統御ザルの系統確立および安定供給体制の確立(株式会社イナリサーチ、滋賀医科大学)

- ①MHC ハプロタイプの検出頻度から4種類のハプロタイプに集約して MHC ホモ接合体や2種類のハプロタイプを併せ持つ MHC ヘテロ接合体のオスと複数のメスを核とした繁殖コロニーを設置し、自然交配による繁殖生産方式にて MHC ヘテロ接合体の産児を得ている。
- ②分割クローン胚による単数胚由来複数胚の作出検討:  
胚の有効活用法として、卵巣刺激により採取した成熟未授精卵子に顕微授精を行い、2細胞期胚の段階で割球して分割クローン胚を作製し、実験室内で胚盤胞にまで発生させた後にレシピエントサルに移植することにより着床・妊娠を確認した。
- ②人工授精法の開発:顕微授精法を用いず繁殖生産場現場で実施できる補助的経腔的人工授精法を試行中である。ところが、カニクイザル特有の屈曲した子宮頸管のためカニキュレを通過させられず子宮体内への精液注入が困難であることから子宮口への精液注入法の条件検討を進めている。