

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム・技術開発個別課題  
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine・  
Projects for Technological Development
- 研究開発課題名 : (日本語) 移植免疫寛容カニクイザルコロニーの確立と再生医療への応用  
(英語) Establishment of a transplantation immunotolerant-cynomolgus  
monkey colony, and application to regenerative medicine
- 研究開発担当者 (日本語) 動物生命科学研究センター・センター長・小笠原 一誠  
所属 役職 氏名 : (英語) Research Center for Animal Life Science, Shiga University of Medical  
Science, Director, Kazumasa Ogasawara
- 実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 血液試料によるカニクイザル MHC タイピングと MHC ホモ個体の同定  
輸入および繁殖個体の MHC タイピング  
開発課題名 : (英語) Identification of MHC homozygous cynomolgus macaques by MHC genotyping  
using blood samples  
MHC genotyping of imported and breeding cynomolgus macaques
- 研究開発分担者 (日本語) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 准教授 椎名 隆  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Molecular Life Science, Division of Basic Medical Science  
and Molecular Medicine, Tokai University School of Medicine,  
Associate Professor, Takashi Shiina
- 分担研究 (日本語) MHC ホモのカニクイザル iPS 細胞の作製  
開発課題名 : (英語) Generation of cynomolgus fascicularis iPS cells from MHC homozygous  
研究開発分担者 (日本語) 京都大学 iPS 細胞研究所 未来生命科学開拓部門 講師 沖田 圭介  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Life Science Frontiers, Center for iPS Cell Research  
and Application, Kyoto University, Junior Associate Professor,  
Keisuke Okita

## II. 成果の概要（総括研究報告）

椎名隆准教授（東海大学医学部基礎医学系分子生命科学）及び沖田圭介講師（京都大学 iPS 細胞研究所 未来生命科学開拓部門）らのグループとともに、移植免疫に関わる主要組織適合遺伝子複合体（MHC）が2対とも同一であるMHCホモ接合個体、あるいは片方のみが同一であるMHCヘテロ接合個体の探索、および計画的な人工繁殖による作出を進めるとともに、MHCホモ接合個体由来細胞よりiPS細胞を作製することで、免疫拒絶反応がほとんど生じないiPS細胞由来細胞の移植システムの構築を進めてきた。

計画的な人工繁殖のために、以前にMHCホモ接合個体から電気刺激法により採取し、凍結保存していた精液を用いた。通常個体から腹腔鏡下に採取された卵子とMHCホモ接合個体から採取された精子を用いた顕微授精及び胚移植によるMHCヘテロ接合個体の計画的な人工繁殖を実施した。平成28年度には1頭が出生し（後に死亡）、8頭が妊娠継続中である（そのうち2頭は双胎妊娠であり、合計10頭出生予定である）。新生仔自動隔離システムを導入し、新生仔生存率の向上を試みた。

平成28年度以前に計画的な人工繁殖により滋賀医科大学にて出生したサル成長を待ち、今年度にて採血が行われた。この血液を用いてMHCタイピングを行ない、HT1ホモ接合個体が4頭確認された。

国内にて飼育されているフィリピン産の120頭（オス16頭、メス104頭）とフィリピンにて飼育されている繁殖用メス95頭（輸入停止以前に採血が行われた）の計215頭についてDNAタイピングによる初回検査を実施した。その結果、MHCホモ個体は認められなかったが、移植実験やMHC統御ザルの繁殖に不可欠な67頭のMHCヘテロ接合個体と23頭のコントロールザルを特定した。

MHCホモ接合サルの血液を用いてiPS細胞誘導の条件検討を行い、iPS細胞の樹立効率の向上に成功した。また、サルiPS細胞を標識するため、ヒトでsafe harborとして知られるAAVS1領域にGFP遺伝子を導入するためのターゲティングベクターを作製した。CRISPR/Cas9を利用し、このベクターをHT1、HT2及びHT8のホモ接合iPS細胞に導入し、GFPで標識されていることを確認した。また、同3株についてフィーダーフリー培養系に移行した。

MHCタイピングを終えたコントロール個体を「iPS細胞ストックによる再生医療」等の前臨床試験モデルとして、拠点内研究者に提供した。

To produce MHC matched heterozygous cynomolgus for transplantation of iPS cell-derived cells with an MHC homozygous haplotype, semen collected previously from MHC homozygous cynomolgus was used for in vitro fertilization using a micromanipulator. After embryo transplantation in surrogate mothers, one newborn monkey was delivered. Eight mothers are pregnant at present. We have used an automatic newborn isolation system to improve a survival rate of newborns.

We determined MHC haplotypes of cynomolgus born in early 2016 in Shiga University of Medical Science using blood samples. Four monkeys were identified as MHC haplotype HT1 homozygous cynomolgus. We also determined MHC haplotypes of cynomolgus raised in Japan and in the Philippines. We found 67 MHC heterozygous cynomolgus and 23 MHC unmatched control cynomolgus.

We improved the efficacy of establishment of iPS cells using blood samples of MHC

homozygous monkeys. We made MHC homozygous iPS cells expressing GFP using CRISPR/Cas9 genome editing. We established feeder-free culture for three iPS cell lines.

We provided two cynomolgus which MHC haplotypes were identified to the other institute for a preclinical study.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 4 件）

1. Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Maeda A, Kashiyama N, Kawamura A, Miki K, Okita K, Yoshida Y, Shiina T, Ogasawara K, Miyagawa S, Toda K, Okuyama H, Sawa Y. Cardiomyocytes Derived from MHC-Homozygous Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Reduced Allogeneic Immunogenicity in MHC-Matched Non-human Primates. *Stem Cell Reports*. 2016, 6 (3), 312-20.
2. Sugita S, Iwasaki Y, Makabe K, Kamao H, Mandai M, Shiina T, Ogasawara K, Hiram Y, Kurimoto Y, Takahashi M. Successful Transplantation of Retinal Pigment Epithelial Cells from MHC Homozygote iPSCs in MHC-Matched Models. *Stem Cell Reports*. 2016, 7:635-48.
3. Obara H, Kisu I, Kato Y, Yamada Y, Matsubara K, Emoto K, Adachi M, Matoba Y, Umene K, Nogami Y, Banno K, Tsuchiya H, Itagaki I, Kawamoto I, Nakagawa T, Ishigaki H, Itoh Y, Ogasawara K, Saiki Y, Sato S, Nakagawa K, Shiina T, Aoki D, Kitagawa Y. Surgical technique for allogeneic uterus transplantation in cynomolgus. *Scientific Reports*. 2016, 6:35989.
4. Adachi M, Kisu I, Nagai T, Emoto K, Banno K, Umene K, Nogami Y, Tsuchiya H, Itagaki I, Kawamoto I, Nakagawa T, Ogasawara K, Aoki D. Evaluation of allowable time and histopathological changes in warm ischemia of the uterus in cynomolgus monkey as a model for uterus transplantation. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2016, 95, 991-8.
5. 中村紳一郎, 土屋英明. MHC ハプロタイプの明らかなカニクイザルコロニーの確立を目指して. *LABIO21*, 2017, 67, 15-18.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Human leukocyte antigen (HLA)-matched cell transplantation for Parkinson's disease with induced pluripotent stem cells. ポスター、Morizane A, Kikuchi T, Doi D, Okita K, Mizuma H, Takara S, Onoe H, Hayashi T, Shiina T, Ishigaki H, Ogasawara K, Yamanaka S, Takahashi J, ISSCR, 2016/6/22-25, 海外

2. No tumorigenicity of allogeneic induced pluripotent stem cells in MHC-matched cynomolgus monkeys. ポスター, Ishigaki H, Nakayama M, Itoh Y, Ogasawara K, 第45回日本免疫学会学術集会, 2016/12/7, 国内.
3. カニクイザル iPS 細胞を用いた脳への神経細胞同種移植における MHC 適合と免疫抑制療法, 口頭, 森実飛鳥, 菊地哲広, 椎名 隆, 石垣宏仁, 小笠原一誠, 高橋 淳, 第16回日本再生医療学会, 2017/3/9, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
特になし。

(4) 特許出願  
特になし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム  
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine·  
Projects for Technological Development
- 研究開発課題名： (日本語) 移植免疫寛容カニクイザルコロニーの確立と再生医療への応用  
(英語) Establishment of a transplantation immunotolerant-cynomolgus  
monkey colony, and application to regenerative medicine
- 研究開発担当者 (日本語) 滋賀医科大学動物生命科学研究センター センター長小笠原 一誠  
所属 役職 氏名： (英語) Research Center for Animal Life Science, Shiga University of Medical  
Science, Director, Kazumasa Ogasawara
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) 血液試料によるカニクイザルMHCタイピングとMHCホモ個体の同定  
輸入および繁殖個体のMHCタイピング  
開発課題名 (英語) Identification of MHC homozygous cynomolgus macaques by MHC  
genotyping using blood samples  
MHC genotyping of imported and breeding cynomolgus macaques  
研究開発分担者 (日本語) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 准教授 椎名 隆  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Molecular Life Science, Division of Basic Medical Science  
and Molecular Medicine, Tokai University School of Medicine

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：小笠原一誠 (滋賀医科大学・病理学教室) 総括研究報告を参照。

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

1. Sugita S, Iwasaki Y, Makabe K, Kamao H, Mandai M, Shiina T, Ogasawara K, Hiramami Y, Kurimoto Y, Takahashi M. Successful Transplantation of Retinal Pigment Epithelial Cells from MHC Homozygote iPSCs in MHC-Matched Models. *Stem Cell Reports*. 2016 Oct 11;7(4):635-648.
2. Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I, Ikeda U. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature*. 2016 Oct 20;538(7625):388-391.
3. Shiina T, Blancher A, Inoko H, Kulski JK. Comparative genomics of the human, macaque and mouse major histocompatibility complex. *Immunology*. 2017 Feb;150(2):127-138.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. カニクイザル iPS 細胞を用いた脳への神経細胞同種移植における MHC 適合と免疫抑制療法、口頭、森実飛鳥、菊地哲広、椎名 隆、石垣宏仁、小笠原一誠、高橋 淳、第 16 回日本再生医療学会、2017/3/9、国内.

#### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

特になし

#### (4) 特許出願

特になし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム技術開発個別課題  
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine  
Projects for Technological Development
- 研究開発課題名： (日本語) 移植免疫寛容カニクイザルコロニーの確立と再生医療への応用  
(英語) Establishment of a transplantation immunotolerant-cynomolgus  
monkey colony, and application to regenerative medicine
- 研究開発担当者 (日本語) 滋賀医科大学動物生命科学研究センター センター長小笠原 一誠  
所属 役職 氏名： (英語) Research Center for Animal Life Science, Shiga University of Medical  
Science, Director, Kazumasa Ogasawara
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) MHC ホモのカニクイザル iPS 細胞の作製  
開発課題名： (英語) Generation of *cynomolgus fascicularis* iPS cells from MHC homozygous
- 研究開発分担者 (日本語) iPS 細胞研究所 未来生命科学開拓部門 講師 沖田 圭介  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Life Science Frontiers, Center for iPS Cell Research  
and Application, Kyoto University, Junior Associate Professor,  
Keisuke Okita

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 滋賀医科大学 教授 小笠原 一誠 総括研究報告を参照。

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

1. Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Maeda A, Kashiyama N, Kawamura A, Miki K, Okita K, Yoshida Y, Shiina T, Ogasawara K, Miyagawa S, Toda K, Okuyama H, Sawa Y. Cardiomyocytes Derived from MHC-Homozygous Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Reduced Allogeneic Immunogenicity in MHC-Matched Non-human Primates. Stem Cell Reports. 2016, 6 (3) 312-20.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Human leukocyte antigen (HLA)-matched cell transplantation for Parkinson's disease with induced pluripotent stem cells. ポスター、Morizane A, Kikuchi T, Doi D, Okita K, Mizuma H, Takara S, Onoe H, Hayashi T, Shiina T, Ishigaki H, Ogasawara K, Yamanaka S, Takahashi J, ISSCR, 2016/6/22-25, 海外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし