

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) 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(A-STEP)
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer
Adaptable and Seamless Technology Transfer Program Through Targetdriven R&D (A-STEP)

研究開発課題名 : (日本語) MHC 統御カニクイザルの有用性評価と計画生産の検討
(英語) Evaluation for Availability and Reproduction of MHC controlled Cynomolgus monkey

研究開発担当者 (日本語) 株式会社イナリサーチ 代表取締役社長 中川 賢司
所属 役職 氏名 : (英語) Ina Research Inc. President and CEO Kenshi Nakagawa

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) 効率的、経済的な新規 MHC タイピング法の開発とその検証
開発課題名 : (英語) Development of efficient and economical novel MHC genotyping method and its validation

研究開発分担者 (日本語) 株式会社イナリサーチ 代表取締役社長 中川 賢司
所属 役職 氏名 : (英語) Ina Research Inc. President and CEO Kenshi Nakagawa

分担研究 (日本語) MHC 統御ザルの系統確立および安定供給体制の確立
開発課題名 : (英語) Establishment of certain MHC typed cynomolgus monkeys and its stable supply

研究開発分担者 (日本語) 株式会社イナリサーチ 代表取締役社長 中川 賢司
所属 役職 氏名 : (英語) Ina Research Inc. President and CEO Kenshi Nakagawa

II. 成果の概要（総括研究報告）

MHC 統御カニクイザル（MHC 統御ザル）の有用性評価と計画生産の検討を目的として MHC 遺伝子群における効率的、経済的な DNA タイピング法を開発し、その精度を検証すること（開発項目 1）、MHC ホモ接合体における遺伝学ならびに免疫学の両面から MHC ホモ接合体の特徴を明確にすること（開発項目 2）、子宮移植や間質幹細胞移植実験による MHC 統御ザルの有用性を検証すること（開発項目 3）および人工授精法の開発や繁殖生産コロニーの設定による MHC 統御ザルの系統確立や安定供給体制を確立すること（開発項目 4）を進めている。

開発項目 1 では、前年度までに次世代シーケンサーを用いた MHC 遺伝子群の DNA タイピング法を開発した。本年度は、イナリサーチが MHC アレル情報の明確な 150 検体を用いた DNA タイピングを実施し、東海大学がそのアレル判定結果を用いて新規 DNA タイピング法の精度を検証した。その結果、116 検体は過去のタイピング結果と完全に一致することを確認した。

開発項目 2 では、東海大学にて 177 個の免疫関連遺伝子や血液型遺伝子の多型解析を 10 検体にて実施した結果、562 個の非同義置換を含む計 1266 個の多型・変異を検出した。また、HT1 型ホモ接合体 1 個体を用いた KIR 遺伝子の多型解析を実施した結果、21 種類の KIR3D 遺伝子を同定した。また、滋賀医科大学にて MHC 統御ザルを用いた臓器移植前の拒絶反応を *in vitro* で予測するために、ELISPOT 法を用いたリンパ球混合試験を開発した。これにより実際に移植を行わなくてもそれぞれの MHC の組み合わせによる拒絶反応の程度を検討することが可能となった。さらに ELISPOT の stimulator としてドナーマクロファージの不死化に成功した。

開発項目 3 では、慶應義塾大学にて前年度までに 4 件の MHC ミスマッチ個体間、2 件の MHC 半ハプロ一致個体間の子宮同種移植を実施した結果、MHC 半ハプロ一致個体間においては拒絶反応が生じにくいことを確認し、その 1 個体においては人工授精による妊娠を現在進めている。また、滋賀医科大学にて MHC 統御ザルの有用性を証明するために、カニクイザルを用いた皮内皮膚移植の実験系を確立した。

開発項目 4 では、イナリサーチにて 4 種類の MHC ハプロタイプに限定し、選抜した MHC ホモ接合体の雄親を核とした 7 基の繁殖コロニーで繁殖生産を継続している。本年度では、当該 MHC ハプロタイプの MHC アレルを全く持たないサル（コントロール）の作出のための繁殖コロニー 6 基を新たに設置し、計 33 頭の次世代児を得た。また MHC 統御カニクイザルを安定的に供給するため、射出した精子調製液を用いた人工授精（AI）を行った。経膈的人工授精における受精率向上の為、精子調製液の注入操作回数を前年度の実績に基づき 2 日間隔 2 回の実施とした。これにより、1 頭の着床確認個体を得ることができた。一方、分割クローン胚作成に関しては、フィリピンからのカニクイザル輸入停止により、採卵が困難であり十分な成果が得られなかった。

In order to evaluate the practical application and plan scheduled production of major histocompatibility complex controlled cynomolgus monkeys (MHC-controlled monkeys), development of an efficient and economical method to determine allelic types of MHC genes and evaluation of accuracy of the method (criteria 1), genetic and immunological characterization of the MHC homozygotes monkeys (criteria 2), evaluation of availability in MHC-controlled monkeys by uterine and stromal stem cell transplantation (criteria 3), and development of insemination techniques and reproductive colonies to establish a new cohort of MHC-controlled monkeys and a stable supply system (criteria 4) are under investigation.

Regarding the criteria 1, a new DNA-typing method for the MHC genes have been so far developed using a next-generation DNA sequencer. In this year, Ina Research Inc. genotyped using 150 samples of which MHC allelic types were previously defined. Tokai University evaluated the accuracy of the typing data, and confirmed that 116 samples of them were identical with the previously assigned MHC allele information.

Regarding the criteria 2, a total of 1,266 variations including 562 non-synonymous substitutions were detected in a polymorphism analysis of 177 immuno- and blood group-related genes using 10 samples at Tokai University. Twenty-one KIR3D alleles were identified in a polymorphic analysis of KIR genes using one HT1-type homozygote.

At the Shiga University of Medical Science, a mixed lymphocyte reaction test using the ELISPOT assay was developed to predict an in vitro organ rejection response prior to transplantations using MHC-controlled monkeys. Using this test, it has become possible to estimate the probability of a rejection in various combinations of MHC types without actual transplantation. Furthermore, immortalization of donor-derived macrophages was achieved to use them as stimulators in the ELISPOT assay.

Regarding the criteria 3, four and two uterine allografts between MHC-mismatched and MHC-haploidentical animals, respectively, have been carried out by the team of Keio University to date. As a result, organ rejection between the MHC-haploidentical animals seemed to be less probable than MHC-mismatched animals. Now, artificial insemination is being trialed in one of the MHC-haploidentical animals for conception. Furthermore, in order to prove utility of the MHC-controlled monkeys, intradermal skin transplantation as a new evaluation system has been established at the Shiga University of Medical Science.

Regarding the criteria 4, Ina Research Inc. is producing MHC heterozygotes of 4 different MHC-haplotypes in 7 reproductive colonies using MHC homozygous parental males. In order to produce the control animals that do not possess the MHC alleles matched to 4 respective MHC-haplotypes, 6 other colonies have been established and a total of 33 offspring were obtained this year.

Now, in order to maintain a stable supply of MHC-controlled monkeys, artificial insemination using a sperm preparation of diluted ejaculated semen is being tested. Based on the research results of the previous year, the semen preparation was administered vaginally twice at an interval of 2 days in order to increase the probability of conception. Using this method, successful implantation has been confirmed in one animal. However, the production of cloned embryos by embryo splitting has been hampered by the suspended import of cynomolgus monkeys from the Philippines, making harvest of the required number of ovum difficult.

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 2件）

1. Allogeneic Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerates non-Human Primate Hearts. 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, Ikeda U. Nature. 2016 Oct 10;538(7625):388-391. doi:10.1038/nature19815.

2. 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, Ito Y, Ogasawara K, Saiki Y, Sato S, Nakagawa K, Shiina T, Aoki D, Kitagawa Y. Surgical technique for allogeneic uterus transplantation in macaques. Scientific Reports. In press.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

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) 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(A-STEP)
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer
Adaptable and Seamless Technology Transfer Program Through Targetdriven R&D (A-STEP)

研究開発課題名：(日本語) MHC 統御カニクイザルの有用性評価と計画生産の検討
(英語) Evaluation for Availability and Reproduction of MHC controlled Cynomolgus monkey

研究開発担当者 (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

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) 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
②MHC ホモ接合体における遺伝学的ならびに免疫学的解析

開発課題名：(英語) ①Development of efficient and economical novel MHC genotyping method and its validation
②Genetic and immunological analysis of MHC homozygous cynomolgus monkey

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：株式会社イナリサーチ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 件、国際誌 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 iPSC 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

該当なし

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) 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(A-STEP)
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer
Adaptable and Seamless Technology Transfer Program Through Targetdriven R&D (A-STEP)

研究開発課題名： (日本語) MHC 統御カニクイザルの有用性評価と計画生産の検討
(英語) Evaluation for Availability and Reproduction of MHC controlled Cynomolgus monkey

研究開発担当者 (日本語) 病理学講座 教授 小笠原 一誠
所属 役職 氏名： (英語) Department of Pathology, professor, 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) ①MHC ホモ接合体における遺伝学的ならびに免疫学的解析
②臓器・iPS 細胞移植実験による MHC 統御ザルの有用性の検証
③MHC 統御ザルの系統確立および安定供給体制の確立

開発課題名： (英語) ① Genetic and immunological analyses in MHC homozygotes
②Validation of the usefulness of MHC control monkeys in organs and iPS cells transplantation
③Establishment of certain MHC typed-cynomolgus monkeys and its stable supply

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：株式会社イナリサーチ 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 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, 1-9.
2. 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.
3. Sugita S, Iwasaki Y, Makabe K, Kamao H, Mandai M, Shiina T, Ogasawara K, Hirami 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.
4. 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, Yuko Kitagawa Y. Surgical technique for allogeneic uterus transplantation in macaques Scientific reports. 2016, 6, 35989-96.

(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, Asuka Morizane, Tetsuhiro Kikuchi, Daisuke Doi, Keisuke Okita, Hiroshi Mizuma, Sayuki Takara, Hirotaka Onoe, Takuya Hayashi, Takashi Shiina, Hirohito Ishigaki, Kazumasa Ogasawara, Shinya Yamanaka, Jun Takahashi, ISSCR 2016/6/22, 国外.
2. 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 回再生医学会総会, 2017/3/7, 国内.

(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

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) 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(A-STEP)
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer
Adaptable and Seamless Technology Transfer Program Through Targetdriven R&D (A-STEP)

研究開発課題名：(日本語) MHC 統御カニクイザルの有用性評価と計画生産の検討
(英語) Evaluation for Availability and Reproduction of MHC controlled Cynomolgus monkey

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室 特任助教 木須 伊織
所属 役職 氏名：(英語) Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, Assistant Professor, Kisu Iori

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) 臓器・iPS 細胞移植実験による MHC 統御ザルの有用性の検証
開発課題名：(英語) Validation of Usefulness of MHC controlled monkey in organs and iPS cells transplantation

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：株式会社イナリサーチ 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 5 件、国際誌 2 件)

1. 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.

* corresponding author

Surgical technique for allogeneic uterus transplantation in macaques. *Sci Rep.* 2016; 6: 35989.

2. Clinical features indicating irreversible rejection after uterus allotransplantation in cynomolgus monkey. **Kisu I**, Kato Y, Yamada Y, Matsubara K, Obara H, Emoto K, Adachi M, Umene K, Nogami Y, Banno K, Kitagawa Y, Aoki D. *Transplantation* 2016;100(7S):S457-8.
3. **木須伊織**. 子宮移植の現状、課題、展望 臨床評価 2016;44(2):283-290.
4. **木須伊織**. 社会と共に歩む医療のあり方 - 子宮移植 Lecture 1 子宮移植について *MEDICAL TORCH* 2016;12(1):42-47.
5. **木須伊織**、阪埜浩司、青木大輔. 子宮移植. *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY* 2016;23(3): 69-75.
6. **木須伊織**、阪埜浩司、青木大輔. 子宮移植. 産婦人科の実際 2016;65(12):1587-1594.
7. **木須伊織**. 子宮移植の現状. 研修ノート No.100「産婦人科の近未来」日本産婦人科医会, in press

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Survey of attitudes toward uterus transplantation among Japanese women of reproductive age. (ポスター) Kiyoko Umene, **Iori Kisu**, Kouji Banno, Masataka Adachi, Yuya Nogami, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki. 東京国際フォーラム, 2016/4/21, 国内
2. 死体ドナーからの子宮移植を想定したカニクイザルにおける子宮の温阻血許容時間と病理組織学的検証 (ポスター) 安達将隆, **木須伊織**, 梅根紀代子, 野上侑哉, 阪埜浩司, 田中守, 青木大輔. 東京国際フォーラム, 2016/4/22, 国内
3. 非ヒト霊長類動物における子宮移植後の不可逆的な拒絶反応の経験.(ポスター) **木須伊織**, 阪埜浩司, 安達将隆, 野上侑哉, 梅根紀代子, 青木大輔. 東京国際フォーラム, 2016/4/22, 国内
4. 子宮移植.(口頭：招待講演) **木須伊織**. 広尾, 2016/4/29, 国内
5. 霊長類動物を用いた異分野連携による子宮移植手術技術の開発 (口頭：シンポジウム), **木須伊織**. 大阪国際展示場, 2016/6/17, 国内
6. 死体ドナーからの子宮移植を想定したカニクイザルにおける子宮の温阻血許容時間と病理組織学的検証 (口頭) 安達将隆, **木須伊織**, 永井俊弘, 江本桂, 阪埜浩司, 梅根紀代子, 野上侑哉, 土屋英明, 板垣伊織, 河本育士, 中川孝博, 小笠原一誠, 青木大輔. 熊本日航ホテル, 2016/9/23, 国内
7. 我が国における生殖年齢女性の子宮移植に対する意識調査.(ポスター) **木須伊織**, 阪埜浩司, 添田英津子, 奥嶋美帆, 山口亜弥, 中川恵理子, 栗原佑季, 青木大輔. 高輪プリンスホテル, 2016/9/30, 国内
8. 非ヒト霊長類動物による低侵襲手術を目指した子宮移植における生体ドナー手術技術の開発.(ポスター) **木須伊織**, 阪埜浩司, 安達将隆, 梅根紀代子, 的場優介, 加藤容二郎, 山田洋平, 松原健太郎, 尾原秀明, 佐伯陽子, 土屋英明, 板垣伊織, 河本育士, 中川孝博, 青木大輔. 高輪プリンスホテル, 2016/9/30, 国内
9. 子宮移植における新手術手技の開発 — 非ヒト霊長類脳死ドナー想定実験モデル. (ポスター) 加藤容二郎, **木須伊織**, 山田洋平, 松原健太郎, 尾原秀明, 江本桂, 佐伯陽子, 土屋英明, 板垣伊織, 河本育士, 中川孝博, 安達将隆, 的場優介, 阪埜浩司, 青木大輔. 高輪プリンスホテル, 2016/9/30, 国内

10. 子宮移植の現状・課題・展望(口演：シンポジウム) 木須伊織. パシフィコ横浜, 2016/11/3, 国内
11. 子宮移植研究の経過 (口演：招待講演) 木須伊織. 新宿, 2016/11/27, 国内
12. 子宮移植の現状と課題(口演：特別講演) 木須伊織. TKP 東京駅八重洲カンファレンスセンター, 2017/2/4,国内
13. 子宮移植は可能か?～新しい命を授かるために～(口演：招待講演) 木須伊織. 茨城, 2017/2/27, 国内

(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