

異種移植用遺伝子改変ブタの開発の動向と展望

東 條 英 昭

日本獣医生命科学大学客員教授・東京大学名誉教授

要 約 現在、世界的に移植用臓器の不足が深刻化している。その解決策の一つとして、人工臓器や異種移植の開発研究が進められている。異種移植のドナーとしてはブタが注目されている。ブタは、生理学的にヒトに近く、また、従来から食用に利用されているため、倫理的な問題が少ない。しかし、異種移植に利用するためには、移植後に起こる超急性拒絶反応を克服する必要がある。現在、遺伝子改変技術、すなわち遺伝子導入や遺伝子ノックアウトを利用した遺伝子改変ブタの開発研究が進められている。本総説では、遺伝子改変ブタの開発研究の動向と展望について述べる。

キーワード：異種移植、遺伝子改変ブタ、超急性拒絶反応

日獣生大研報 64, 1-9, 2015.

I. はじめに

1980年代にシクロスポリンAをはじめ各種の強力な免疫抑制剤が開発されたことから、ヒトの臓器移植の成績は飛躍的に向上した。そのため、臓器移植手術の例数が年々急速に増加し、移植用臓器の必要性が益々高まった。一方、臓器提供者の数は頭打ちの状況にあり、世界的に移植用臓器が不足し、このような臓器不足は益々深刻な問題となっている。これを解決する手段の一つとして、これまで動物の臓器や細胞を利用した異種移植 (xenograft) の研究が進められている。ヒトに最も近い霊長類の臓器を利用することには動物福祉、臓器の大きさが適さない、各種の人獣共通感染症などの様々な問題があるため、異種移植用のドナーとしてはブタが利用されてきた。ブタは、食肉用に利用されているので倫理的な抵抗感が少ない。成長が早く、多胎性で繁殖が容易であり、手頃な大きさの臓器が得られやすい。さらに、SPF (specific pathogen free) 化が可能であるため、外来の病原体を保有しない臓器を得ることができる。このような特性からブタの臓器や細胞を移植用に利用する様々な研究^{21,22)}が進められてきた。究極的には、同種移植と同様に移植した臓器を長期に生着させることが理想である。しかし、ブタの臓器や細胞をヒトに移植する異種移植を成功させるためには、超急性拒絶反応 (hyperacute rejection: HAR) など克服すべき多くの課題がある。

HARを制御する第一の方法は、ドナー動物にヒト補体制御膜タンパク質遺伝子を導入し、補体活性化反応を制御することである。第二の方法は、 α galactose 抗原の生産を制御することである。さらには、移植後に起こる血液凝固反応を制御することが考えられている。

本稿では、異種移植用遺伝子改変ブタの開発研究の動向

と今後の展望について紹介する。

II. 超急性拒絶反応の制御

異種移植では、ヒト同士の臓器移植では通常見られない HAR が起こり、臓器移植後血栓の形成により血管が閉塞し 24 時間内に移植臓器が拒絶される。異種移植の最大の課題は、移植後に起こる HAR をいかに制御するかである。

1. 補体活性化の制御

ヒトに移植されたブタの臓器は、ヒト血液中に常在する自然抗体によって認識され、補体カスケードの活性化が起こる。補体活性化カスケードには、古典経路 (第一経路) と第二経路とが存在し、自己の細胞 (抗原) に対しても古典経路の補体活性化反応が起こる。しかし、細胞膜上には自己抗原に対する補体反応を特異的に抑制する制御タンパク質 (complement regulatory factor: CRF) が存在し、自己細胞に対する反応を積極的に防いでいる。この様なヒトの細胞膜上で発現する補体制御物質としては、シアル酸を持つ糖鎖複合、MCP (membrane cofactor protein) / CD46, DAF (decay accelerating factor) / CD55, MIRL (membrane inhibitor of reactive lysis) / CD59 などが知られている¹⁵⁾。そのうち CD46 は自己の細胞膜上に結合した活性化自己補体成分である C3b や C4b を分解し不活化する。また、CD55 は細胞膜上に結合した補体に結合し、もし、自己の細胞であれば、膜侵襲複合体の形成に関与する補体 (C3) 転換酵素の形成を妨げる。さらに、CD59 は、自己の補体成分である C8 や C9 の形成を防ぐことにより自己の細胞を保護しており、これら一連の機構 (補体活性化の古典経路) により自己細胞を異種細胞と認識されないような仕組みになっている。一方、異種移植の場合には、異

種 (ブタ) 細胞の膜糖鎖抗原 (α ガラクトース抗原: Gal) が抗体を介さずに直接補体成分 (C3) と結合し, 第二経路の補体カスケードが活性化⁵³⁾ される。この様な反応により膜侵襲複合体が形成され, これが移植臓器 (ブタ) の血管内皮細胞を傷害し, その結果, 凝血系が急速に賦活されて血小板凝集, 血栓症の一連の反応が起こり, 数分~数時間で血管が閉塞し, 最終的に移植臓器が急速に拒絶される^{41,69,70)}。異種移植では, 強力な免疫抑制剤を使用した場合でも, 移植後の血液凝固を契機として移植臓器が急速に拒絶される HAR が起こる^{25,39,40,68)}。したがって, この HAR を克服するためには, 補体の活性化¹⁴⁾, Gal 抗原^{31,34,83)} や抗 Gal 抗体²⁸⁾ の制御が必要である。

第一の手段は, 動物体内でヒト CRF を発現させれば, 補体活性化のカスケードを中断²⁷⁾ できる。この目的で, 種特異的なヒト CRF である CD55, CD46, CD59 などの遺伝子を導入したブタ^{1,12,13,18,28,33,42,87)} が作出され, それらの臓器を霊長類に移植する実験が実施されている。CD55 を導入したブタの心臓^{76,99)}, 腎臓^{16,78,106)}, 肝臓⁷⁴⁾ をサルに移植した研究では, HAR の抑制効果が認められ, 数日~数週間に渡って移植臓器が生着している。また, CD46 遺伝子を導入したブタの心臓をヒビに移植した研究では, 50~113 日 (平均 76 日) 間移植臓器が生着している⁵⁰⁾。

さらに, CD59 と CD55 の両遺伝子を発現するブタ¹⁴⁾ の心臓をヒビに移植した実験では, 通常のブタの心臓を移植した場合に 20~30 分間しか生着しなかったのに対し, 遺伝子改変ブタの心臓では 85~120 分間機能した結果⁸⁾ が得られている。この様に, 複数の CRF 遺伝子の導入により, 単独の遺伝子導入に比べ移植臓器の生着時間/期間が延長し, 移植臓器における補体 C5b の生産が対照に比べ減少した^{5,51,65)}。さらに, 3 種類の CRF 遺伝子を導入した場合には, 実際には 2 種類の CRF のみが優先して発現する傾向のあることが報告されている¹⁴⁾。また, CRF の高

い発現があっても, 臓器の種類によっては HAR の抑制効果に差がみられ, 肺臓で抑制効果が非常に低く, ヒト血液の環流実験でわずかに抑制効果がみられている^{3,20,62,64,102,104)}。この様にヒト CRF 遺伝子の導入だけでは, なお, ブタ臓器に対する HAR を十分に制御することはできず, さらなる工夫が必要となる。

2. α galactose 生産の制御

ヒトや類人猿, 旧世界ザル以外の動物には, α 1,3-galactosyltransferase (GalT) と呼ばれる糖転移酵素が存在しており, この酵素は, 以下の反応, 即ち, $\text{UDP-Gal} + \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc-R} \rightarrow \text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc-R} + \text{UDP}$ (R: 糖タンパク質または糖脂質) の反応により, α Gal 分子 (Gal) が動物の血管内皮細胞膜上に発現する。この糖鎖抗原がブタ細胞膜上に存在するために, レシビエントに移植されたブタ臓器は HAR によって拒絶される。GalT はヒトを含む霊長類および旧世界ザルでは遺伝子変異のため活性を示さないことが知られている³⁸⁾。この Gal 分子の生産をブタ臓器において制御できれば HAR を抑えることができる。

1) Gal 産生を抑制する方法

Gal の生産を制御する手段の一つとして考えられたのが, GalT と競合的に作用する α 1,2-fucosyltransferase (フコース転移酵素) や α 2,3-fucosyltransferase/ α 2,6-sialyltransferase をブタに発現させて, Gal 抗原の生産を妨げることである (Fig. 1)。 α 1,2-fucosyltransferase 遺伝子を導入したマウスやブタでは, Gal 分子の生産が減少し, 補体の活性化も抑制されている^{9,52,75,80)}。さらに, GalT 遺伝子をノックアウト (KO) し, フコース転移酵素遺伝子を導入したブタが作出されている⁶⁶⁾。

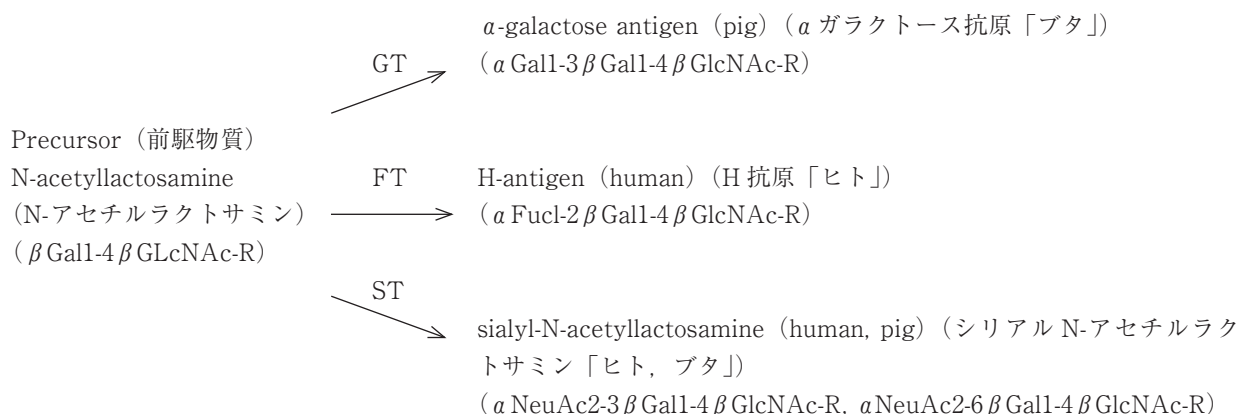


Fig. 1. Biosynthetic pathway of carbohydrate antigens expressing in vascular endothelial cells of human and porcine.

GT: α 1,3-galactosyltransferase, FT: α 1,2-fucosyltransferase/ α 2,3-fucosyltransferase, ST: 2,6-sialyltransferase, R: glycoprotein/glycolipid

2) GalT 遺伝子を KO する方法

第二の方法は、マウスで開発された遺伝子ターゲティング/遺伝子 KO^{91,92)} を利用して、ブタの 1,3-galactosyltransferase (GalT) 遺伝子を KO した遺伝子改変ブタ^{19,26)} を作出することである。マウスでの遺伝子 KO が可能⁹¹⁾ になったにもかかわらず、GalT を KO した (GalT-KO) ブタが作製されるまでには、10 年以上の年月を要した。それは、遺伝子ターゲティング技術をブタに応用するためには、ブタの胚性幹 (ES) 細胞の樹立が必要であるが、これまでのところ、キメラ形成能を持つ ES 様細胞は報告^{61,81)} されているが、真の ES 細胞が樹立されていないためである²⁴⁾。ところが、ヒツジでのクローン作出の成功⁴⁾ と体細胞核移植による遺伝子改変が成功¹⁰⁰⁾ したことから、体細胞における遺伝子ターゲティングと体細胞核移植とを組み合わせる方法によりブタの GalT-KO が可能となった^{56,91,93)}。

これまでに、GalT-KO ブタの心臓や腎臓をサルに移植した研究が報告^{31,34,83)} されている。GalT-KO ブタの心臓をサルへ移植した場合には、CRF 遺伝子導入ブタの心臓移植に比べ生着期間が延長し、6 か月の生着が報告⁶⁾ されている。

ところで、Gal は細胞の機能に不可欠な分子であるとの報告⁹⁰⁾ があるが、これまで GalT-KO マウスやブタでは、特に生理的異常は観察されていない⁹³⁾。

3. レシピエント (ヒト) における血液凝固の制御

ヒト CRF 導入ブタや GalT-KO ブタの臓器をサルに移植した場合には、最初に微小血管に血栓症が見られる^{36,37,39,84,97)}。また、3 種類のヒト CRF を導入したブタの臓器をサルに移植した場合でも血管内凝集が起こっている¹⁴⁾。臓器移植後に起こる血液凝固に至るカスケードには様々な因子が関与している⁹⁵⁾。そこで、これらの因子を遺伝子改変ブタの細胞膜上で過剰発現させて血栓性微小血管症を抑制する試みがなされている^{11,71)}。異種移植時に起こる再灌流傷害を軽減させる目的で、ヒト endothelial protein C receptor (EPCR) や thrombomodulin (スロンボモジュリン) 遺伝子を導入したブタが作出^{7,32,36,54)} されている。しかし、ヒト凝固抑制因子を発現するドナーの臓器をサルに移植した研究例はない。異種移植時には、血管内皮に発現している thrombin, adenosine diphosphate, thromboxane, 抗体, 補体, 糖タンパク受容体反応などを介して血小板活性化がおこることが知られている^{10,41)}。また、細胞膜上で発現しているブタ糖タンパク質レセプターは、コラーゲン、フィブリノーゲン等に結合して血小板活性化を促進することが知られており^{47,77,85,107)}、血栓の生じるメカニズムを探る研究^{30,35,89)} が進められている。

その他にも、虚血再灌流傷害を抑制する手段として A20, SOD, カタラーゼなどを過剰発現する遺伝子改変ブタが作出⁵⁹⁾ されている。

Ⅲ. 複数遺伝子改変ブタ開発の展望

GalT-KO ブタと GalT-KO+CD46 遺伝子改変ブタの心臓、腎臓、肝臓をそれぞれヒヒに移植した研究では、前者では、3 日以内に移植臓器の拒絶される割合が 44% であったのに対し、後者では 7% であったと報告²⁾ している。GalT-KO ブタの腎臓を移植し、免疫抑制剤投与下で 70 時間安定した機能を示したのに対し、GalT-KO+CD55+CD59+H-transferase 遺伝子改変ブタの腎臓移植では、90 時間まで延長した⁷³⁾。GalT-KO+CD55+CD59+CD39+H-transferase 遺伝子改変ブタの腎臓をヒヒへ移植し、免疫抑制剤を投与した実験では、移植臓器が 15 日間生着し、カニクイザルへの移植では 22 日間生着している¹⁷⁾。また、GalT-KO ブタの心臓移植では 16% が生着したのに対し、GalT-KO+CD55 遺伝子改変ブタの心臓移植では 50% であったと報告⁴⁹⁾ されている。

以上の様に、異種移植時に起こる HAR を制御するためには、さらに複数の遺伝子を導入あるいは KO すれば、単独の因子の導入や KO に比べ、移植臓器の生着率や期間が向上することが証明されている。一方、拒絶反応を抑える手段として、GalT-KO+CD55+CD59+H-transferase 遺伝子改変ブタのサルへの臓器移植の際にサルへ移植した実験では、様々な免疫抑制分子を投与する研究⁷²⁾ も進められている。

Ⅳ. 国内における研究

国内での異種移植関係に関する研究は、古くから医学系研究者を中心に進められていたが、1997 年に日本異種移植研究会が設立され、医学系研究者をはじめ畜産学、理学、工学系の研究者らが加わり、研究成果が発表されている。研究の多くはマウスやミニブタなどの実験動物を利用した基礎研究が中心であるが、名古屋大学医学部のグループが、国内で最初に遺伝子改変ブタの開発研究をスタートさせた。その後、名古屋大学医学部、鹿児島大学医学部、明治大学農学部、(独) 農業生物資源研究所、民間研究所などの研究機関が、それぞれ共同して遺伝子改変ブタを作出^{55,79,82,103)} している。特に、鹿児島大医学部のグループは、GalT-KO ミニブタ⁸²⁾ の作出に成功している。その他にも、有用な遺伝子改変ブタ^{88,98)} が作出されている。

Ⅴ. 遺伝子改変ブタ作出の課題と展望

1. 技術的課題

ブタでは、胚の体外培養、体外受精、配偶子の凍結保存、胚移植技術などの様々な周辺技術が未だ十分に確立されておらず、遺伝子改変ブタを作出する際の大きな課題となっている^{94,96)}。したがって、マウスなどの実験動物での遺伝子改変動物の作出に比べ、家畜では様々な課題があり、最大の課題は、膨大な経費、時間、労力を要する。

これまでの研究から、現在、ウシやブタでは、屠場から屠畜卵巣を研究室に持ち帰り、卵巣から未受精卵子を抜き

取り、体外で成熟、受精ならびに発生させることができるようになった。培養液の組成をはじめとする種々な条件が検討されてきた結果、ウシでは、卵子の体外成熟、体外受精、体外発生の成績が飛躍的に向上した。また、体外受精の際に必要な精液の凍結保存法も古くから確立されて、さらには、胚の凍結保存についても良好な結果が得られつつある。さらに、子宮頸を経由する非外科的な胚移植技術も確立されており、これまでに、胚移植技術により国内外で多くの仔ウシが生産されている。

これに対して、ブタの場合は、未成熟卵子の体外成熟については、良好な成績が得られているものの、体外受精や体外発生の成績が悪く、大きな課題であり、ブタ精液の凍結保存についても有効な方法が確立されていない。特に、ブタの体外受精では、多精子侵入の割合が異常に高い。また、ブタのクローン作出の際に、胚移植により妊娠させるには多数の胚の移植が必要である。また、核移植胚の活性化が早いため、クローニング効率が非常に低い。その対策として、核移植を繰り返すことによりクローンの作出効率を上げている⁶³⁾。さらに、ES細胞を利用したクローンマウスの作出に比べ、体細胞では遺伝子相同組換えの効率が著しく低いが、ブタでは胎児線維芽細胞を用いることにより効率を上げている^{48,86)}。

さらに、ブタでは、ウシの様な非外科的胚移植が容易でない。その理由は、ブタの子宮は他の家畜に比べ長く、また、多数のヒダが互いに噛み合う構造をしているため、子宮頸を経由する非外科的移植が困難である。この様な理由から、これまで遺伝子操作ブタの作出には、外科的手術により卵管内胚移植法が用いられている。今後、よりヒトの臓器に近い臓器を持つ遺伝子改変ブタを開発するためには、複数の遺伝子の導入や遺伝子の KO が必要となる。そのためには、遺伝子改変技術の更なる発展が必要で、遺伝子導入用ベクターとして、picornavirus⁴⁴⁾の利用が検討されている。さらには、最近、人工ヌクレアーゼ (zinc finger nuclease) を利用した遺伝子 KO 法^{29,45,46,67,105)}が開発されている。これは、遺伝子 KO 用に構築した人工 RNA を受精卵の細胞質内へ顕微注入する方法であるため、体細胞での DNA 相同組換えと体細胞核移植とを組み合わせた従来の遺伝子 KO 法に比べ、家畜での遺伝子 KO が格段に容易となる。

2. ブタ内在レトロウイルス

ブタの臓器を異種移植用臓器あるいは細胞として利用する際に、ブタに内在するレトロウイルス (ブタ内在レトロウイルス: porcine endogenous retrovirus 「PERV」) のヒトへの感染が問題となる。この PERV は、ブタゲノム内に挿入されている C 型レトロウイルス (C-type retrovirus) で、ブタにおける悪性の造血系細胞腫の原因ウイルスと考えられている。これまでの研究では、ブタの肝臓、腎臓、脾臓、皮膚などの細胞を移植した患者 160 名 (最長 12 年間) から採取した血清について、RT-PCR 法や

イムノブロット法による解析から、PERV からの遺伝子発現は全く検出されなかったと報告⁶⁰⁾されている。また、末梢血液から採取した単核球 DNA の PCR による解析からも PERV のゲノムは検出されていない。ただし、23 名の患者では、PERV の一部 DNA が患者のゲノムに挿入されていた⁶⁰⁾。一方、ブタの隣島細胞とヒト腎臓細胞 (U293) とを共培養すると、PERV がヒト細胞へ感染すること、また、ブタ隣島細胞を SCID マウス (免疫不全マウス) の腎臓の被膜下に移植すると、SCID マウスの複数の組織において PERV からの複製が確認されている⁴³⁾。ヒト細胞に感染する能力を持つ PERV を生産しないミニブタが報告⁵⁷⁾されており、今後は、遺伝子改変ブタと PERV (-) ミニブタとの交配により、より安全な遺伝子改変ミニブタの開発が可能となろう。近年、活性型の PERV と不活性型の PERV とをスクリーニングできる方法^{23,101,102)}が開発されており、微生物学的により安全な遺伝子改変ブタの作成が可能となろう。

VI. おわりに

遺伝子改変ブタの臓器や細胞をヒトへの移植に利用するに当たっては、克服すべき多くの課題がある。しかし、遺伝子改変ブタの開発研究は、移植用臓器不足を少なからず解消する対策の一つとして必要である。現在、GalT-KO ブタをベースとして HAR を制御するための様々な遺伝子が導入あるいは KO された遺伝子改変ブタが開発されている。我が国は、世界に先駆けて体細胞核移植によるクローンブタの作出⁵⁸⁾に成功しており、ブタの胚操作技術は世界的にも高い水準にあることから、この分野での今後の成果が大いに期待される。そのためにも、医学、獣医学、応用動物科学、実験動物科学領域の研究者らの更なる連携が必要である。

VII. 引用文献

- 1) ADAMS, D.H., KADNER, A., CHEN, R.H. and FARIVAR, R.S. (2001). Human membrane cofactor protein (MCP, CD 46) protects transgenic pig hearts from hyperacute rejection in primates. *Xenotransplantation*, 8, 36-40.
- 2) AZIMZADEH, A., KELISHADI, S.S., EZZELARAB, M. et al. (2009). Early graft failure of GTKO pig organs in baboons is reduced by hCRP expression. *Xenotransplantation*, 16, 356.
- 3) AZIMZADEH, A., ZORN II, G.L., BLAIR, K.S., et al. (2003). Hyperacute lung rejection in the pig-to-human model. 2. Synergy between soluble and membrane complement inhibition. *Xenotransplantation*, 10, 120-131.
- 4) CAMPBELL, K.H.S., MCWHIRE, J., RITCHIE, W.A. and WILMUT, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380, 64-66.

- 5) CHEN, R.H., NAFICY, S., LOGAN, J.S, DIAMOND, L.E. and ADAMS, D.H. (1999). Hearts from transgenic pigs constructed with CD59/DAF genomic clones demonstrate improved survival in primates. *Xenotransplantation*, **6**, 194-200.
- 6) CHEN, G., QIAN, H., STARZL, T., et al. (2005). Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat. Med.*, **11**, 1295-1298.
- 7) CHEN, D., WEBER, M., MCVEY, J.H., et al. (2004). Complete inhibition of acute humoral rejection using regulated expression of membrane-tethered anticoagulants on xenograft endothelium. *Am. J. Transplant.*, **4**, 1958-1963.
- 8) CHEN, R.H., NAFICY, S., LOGAN, J.S., et al. (1999). Hearts from transgenic pigs constructed with CD/DAF genomic clones demonstrated improved survival in primates. *Xenotransplantation*, **6**, 194-200.
- 9) CHUNG, T.W., KIM, K.S. and KIM, C.H. (2003). Reduction of the Gal- α 1,3-Gal epitope of mouse endothelial cells by transfection with the N acetylglucosaminyltransferase III gene. *Mol. Cells*, **16**, 368-376.
- 10) COWAN, P.J. and D'APICE, A.J.F. (2008). The coagulation barrier in xenotransplantation: incompatibilities and strategies to overcome them. *Curr. Opin. Organ Transplant*, **13**, 178-183.
- 11) COWAN, P.J., ROUSSEL, J.C. and D'APICE, A.J.F. (2009). The vascular and coagulation issues in xenotransplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant*, **14**, 161-167.
- 12) COWAN, P.J., SOMERVILLE, C.A., SHINKEL, T.A., et al. (1998). High-level endothelial expression of human CD59 prolongs heart function in an *ex vivo* model of xenograft rejection. *Transplantation*, **65**, 826-831.
- 13) COWAN, P.J., SHINKEL, T.A., AMINIAN, A., et al. (1998). High-level co-expression of complement regulators on vascular endothelium in transgenic mice: CD55 and CD59 provide greater protection from human complement mediated injury than CD59 alone. *Xenotransplantation*, **5**, 184-190.
- 14) COWAN, P.J., AMINIAN, A., BARLOW, H., et al. (2000). Renal xenografts from tripletransgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons. *Transplantation*, **69**, 2504-2515.
- 15) COWAN, P.J. and D'APICE, A.J. (2009). Complement activation and coagulation in xenotransplantation. *Immunol. Cell Biol.*, **87**, 203-208.
- 16) COZZI, E., BHATTI, F., SCHMOECKEL, M., et al. (2000). Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation*, **70**, 15-21.
- 17) COZZI, E., SIMIONI, P., NOTTLE, M.B., et al. (2009). Preliminary study in a life supporting pig-to-primate xenotransplantation model using GalTKO pigs transgenic for human CD39, CD55, CD59 and Fucosyltransferase. *International Xenotransplantation Association*, Venice, Italy: Abstract.
- 18) COZZI, E., TUCKER, A.W., LANGFORD, G.A., et al. (1997). Characterization of pigs transgenic for human decay-accelerating factor. *Transplantation*, **64**, 1383-1392.
- 19) COZZI, E. and WHITE, D.J. (1995). The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat. Med.*, **1**, 964-966.
- 20) DAGGETT, C.W., YEATMAN, M., LODGE, A.J., et al. (1997). Swine lungs expressing human complement-regulatory proteins are protected against acute pulmonary dysfunction in a human plasma perfusion model. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **113**, 390-398.
- 21) D'APICE, A.J. and COWAN, P.J. (2008). Gene-modified pigs. *Xenotransplantation*, **15**, 87-90.
- 22) D'APICE, A.J. and COWAN, P.J. (2009). Xenotransplantation: the next generation of engineered animals. *Transpl. Immunol.*, **21**, 111-115.
- 23) DENNER, J. and TEONJES, R.R. (2012). Infection barriers to successful xenotransplantation focusing on porcine endogenous retroviruses. *Clin. Microbiol. Rev.*, **25**, 318-343.
- 24) DOBRINSKI, I. (2006). Germ cell transplantation in pigs-advances and applications. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, **62**, 331-339.
- 25) EKSER, B., RIGOTTI, P., GRIDELLI, B. and COOPER, DK. (2009). Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model. *Transpl. Immunol.*, **21**, 87-92.
- 26) EKSER, B., LONG, C., ECHEVERRI, G.J., et al. (2009). Impact of thrombocytopenia on survival of baboons with genetically-engineered pig livers. *Xenotransplantation*, **16**, 355-356.
- 27) FISICARO, N., AMINIAN, A., HINCHLIFFE, S.J., et al. (2000). The pig analogue of CD59 protects transgenic mouse hearts from injury by human complement. *Transplantation*, **70**, 963-968.
- 28) GALLI, U. (1993). Interaction of the natural anti-Gal antibody with α galactosyl epitopes-a major obstacle for xenotransplantation in humans.

- Immunol. *Today*, 14, 480-482.
- 29) GARBERY, I.D., JI, D., HARRINGTON, A., BROWN, V., et al. (2010). Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 186, 451-459.
- 30) GRENZ, A., ZHANG, H., ECKLE, T., et al. (2007). Protective role of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in renal ischemia. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 18, 833-845.
- 31) GRIESEMER, A.D., HIRAKATA, A., SHIMIZU, A., et al. (2009). Results of Gal-knockout porcine thymo-kidney xenografts. *Am. J. Transplant.*, 9, 2669-2678.
- 32) GRIFFIN, J.H., FERNANDEZ, J.A., GALE, A.J. and MOSNIER, L.O. (2007). Activated protein C. *J. Thromb. Haemost.*, 5, 73-80.
- 33) HARRIS, C.L., SPILLER, O.B. and MORGAN, B.P. (2000). Human and rodent decayaccelerating factors (CD55) are not species restricted in their complement-inhibiting activities. *Immunology*, 200, 462-470.
- 34) HISASHI, Y., YAMADA, K., KUWAKI, K., et al. (2008). Rejection of cardiac xenografts transplanted from alpha1,3-galactosyltransferase geneknockout (GalT-KO) pigs to baboons. *Am. J. Transplant.*, 8, 2516-2526.
- 35) HOUSER, S.L., KUWAKI, K., KNOSALLA, C., et al. (2004). Thrombotic microangiopathy and graft arteriopathy in pig hearts following transplantation into baboons. *Xenotransplantation*, 11, 416-425.
- 36) KLYMIUK, N., WUENSCH, A., BAEHR, A., KUROME, M., KESSLER, B. and WOLF, E. (2010). Site-specific expression of human thrombomodulin on porcine endothelium. *Xenotransplantation*, 16, 375.
- 37) KUWAKI, K., TSENG, Y. L., DOR, F.J., et al. (2005). Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat. Med.*, 11, 29-31.
- 38) LARSEN, R.D., RIVERA-MARRERO, C.A., ERNEST, L.K., et al. (1990). Frameshift and nonsense mutations in a human UDP-Gal (a1,3) Gal in transgenic mice and pigs by the expression of an a (1,2) fucosyltransferase cDNA. *J. Biol. Chem.*, 265, 7055-7061.
- 39) LE, BAS-BERNARDET S. and BLANCHO, G. (2009). Current cellular immunological hurdles in pig-to-primate xenotransplantation. *Transpl. Immunol.*, 21, 60-64.
- 40) LI, S., WAER, M. and BILLIAU, A.D. (2009). Xenotransplantation: role of natural immunity. *Transpl. Immunol.*, 21, 70-74.
- 41) LIN, C.C., COOPER, D.K. and DORLING, A. (2009). Coagulation dysregulation as a barrier to xenotransplantation in the primate. *Transpl. Immunol.*, 21, 75-80.
- 42) LOVELAND, B.E., MILLAND, J., KYRIAKOU, P., et al. (2004). Characterization of a CD46 transgenic pig and protection of transgenic kidneys against hyperacute rejection in non-immunosuppressed baboons. *Xenotransplantation*, 11, 171-183.
- 43) LUC, J.W., LAN, V.D., LOCKEY, C., et al. (2000). Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature*, 409, 90-94.
- 44) LUKE, G.A., DE, F.P., LUKASHEV, A., KALLIOINEN, S.E., BRUNO, E.A. and RYAN, M.D. (2008). Occurrence, function and evolutionary origins of "2A-like" sequences in virus genomes. *J. Gen. Virol.*, 89, 1036-1042.
- 45) MASHIMO, T., TAKIZAWA, A., VOIGT, B., YOSHIMI, K., HIAI, H., KURAMOTO, T. and SERIKAWA, T. (2010). Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS one*, 5, e8870.
- 46) MATTHEW, H.P. and CARROLL, D. (2005). Gene targeting using zinc finger nuclease. *Nature Biotech.*, 23, 967-973.
- 47) MAZZUCATO, M., DE, M.L., PRADELLA, P., MASOTTI, A., and PARETI, F.I. (1996). Porcine von Willebrand factor binding to human platelet GPIb induces transmembrane calcium influx. *Thromb. Haemost.*, 75, 655-660.
- 48) MCCREATH, K.J., HOWCROFT, J., CAMPBELL, K.H.S., COLMAN, A., SCHNIEKE, A.E. and KIND, A.J. (2000). Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 405, 1066-1069.
- 49) MCGREGOR, C.G.A., BYRNE, G.W., VLASIN, M., et al. (2009). Early cardiac function and gene expression after orthotopic cardiac xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 6, 356-357.
- 50) MCGREGOR, C.G., TEOTIA, S.S., BYRNE, G.W., et al. (2004). Cardiac xenotransplantation: progress toward the clinic. *Transplantation*, 78, 1569-1575.
- 51) MENORET, S., PLAT, M., BLANCHO, G., et al. (2004). Characterization of human CD55 and CD59 transgenic pigs and kidney xenotransplantation in the pig-to-baboon combination. *Transplantation*, 77, 1468-1471.
- 52) MIYAGAWA, S., TANEMURA, M., KOYOTA, S., et al. (1999). Masking and reduction of the galactose-alpha 1,3-galactose (alpha-Gal) epitope, the major xenoantigen in swine, by the glycosyltransferase gene transfection. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun.*, **264**, 611-614.
- 53) MORGAN, B.P., BERG, C.W. and HARRIS, C.L. (2005). "Homologous restriction" in complement lysis: roles of membrane complement regulators. *Xenotransplantation*, **12**, 258-265.
- 54) MIWA, Y., YAMAMOTO, K., ONISHI, A., et al. (2010). Potential value of human thrombomodulin and DAF expression for coagulation control in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation*, **17**, 26-37.
- 55) MUELLER, S., PRELLE, K., RIEGER, N., et al. (1999). Chimeric pigs following blastocyst injection of transgenic primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.*, **54**, 244-254.
- 56) NOTTLE, M.B., BEEBE, L.F., HARRISON, S.J., et al. (2007). Production of homozygous alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation*, **14**, 339-344.
- 57) OLDMISON, B.A., WOOD, J.C., ERICSSON, T.A., WILSON, C.A., et al. (2002). Porcine endogenous retrovirus transmission characteristic of an inbred herd of miniature swine. *J. Virol.*, **76**, 3045-3048.
- 58) ONISHI, A., IWAMOTO, M., AKITA, T., et al. (2000). Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, **289**, 1188-1190.
- 59) OROPEZAM, J., PETERSEN, B., CARNWATH, J.W., et al. (2009). Transgenic expression of the human A20 gene in cloned pigs provides protection against apoptotic and inflammatory stimuli. *Xenotransplantation*, **16**, 522-534.
- 60) PARADIS, K., LANGFORD, G. and LONG, Z. (1999). Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science*, **285**, 1236-1241.
- 61) PIEDRAHITA, J.A., MOORE, K., OETAMA, B., et al. (1998). Generation of transgenic porcine chimera using primordial germ cells-derived colonies. *Biol. Reprod.*, **58**, 1321-1329.
- 62) PIERSON II, R.N., PINO-CHAVEZ, G., YOUNG, V.K., et al. (1997). Expression of human decay accelerating factor may protect pig lung from hyperacute rejection by human blood. *J. Heart Lung Transplant.*, **16**, 231-239.
- 63) POLEJAEVA, I.A. and CAMPBELL, K.H.S. (2000). New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis. *Theriogenology*, **53**, 117-126.
- 64) POLING, J., OZKUR, M., KOGGE, K., et al. (2006). Hyperacute rejection in ex vivo perfused porcine lungs transgenic for human complement regulatory proteins. *Transpl. Int.*, **19**, 225-232.
- 65) RAMIREZ, P., MONTOYA, M.J., RIOS, A., et al. (2005). Prevention of hyperacute rejection in a model of orthotopic liver xenotransplantation from pig to baboon using polytransgenic pig livers (CD55, CD59, and H-transferase). *Transplant. Proc.*, **37**, 4103-4106.
- 66) RAMSOONDAR, J.J., MACHATY, Z., COSTA, C., WILLIAMS, B.L., FODOR, W.L. and BONDIOLI, K.R. (2003). Production of alpha-1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human alpha 1,2-fucosyltransferase. *Biol. Reprod.*, **69**, 4374-45.
- 67) REMY, S., TESSON, L., MEORET, S., USAL, C., SCHARENBERG, A.M. and ANEGON, I. (2010). Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. *Transgenic Res.*, **19**, 363-371.
- 68) ROCHA, P.N., PLUMB, T.J., CROWLEY, S.D. and COFFMAN, T.M. (2003). Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol. Rev.*, **196**, 51-64.
- 69) ROSE, A.G. and COOPER, D.K. (1996). A histopathologic grading system of hyperacute (humoral, antibody-mediated) cardiac xenograft and allograft rejection. *J. Heart Lung Transplant.*, **15**, 804-817.
- 70) ROSE, A.G., COOPER, D.K.C., KEMP, E., et al. (1991). Histopathology of cardiac xenograft rejection. *Xenotransplantation*, **13**, 231.
- 71) ROUSSEL, J.C., MORAN, C.J., SALVARIS, E.J., NANDURKAR, H.H., D'APICE, A.J. and COWAN, P.J. (2008). Pig thrombomodulin binds human thrombin but is a poor cofactor for activation of human protein C and TAFI. *Am. J. Transplant.*, **8**, 1101-1112.
- 72) SALVARIS, E., FISICARO, N., HARRISON, S., et al. (2009). Multigene constructs to accelerate the generation of multi-transgenic GalT knockout pigs. *Xenotransplantation*, **16**, 373.
- 73) SALVARIS, E., HAWTHORNE, W.J., PEIRCE, S., et al. (2009). Improved survival of GalT KO/hCD55-hCD59 pig renal xenografts in non-immunosuppressed baboons. *Xenotransplantation*, **16**, 358.
- 74) SANCHEZ, A., RAMIREZ, P., PINO, G., et al. (2003). Immunopathology of an hDAF transgenic pig model liver xenotransplant into a primate. *Transplant. Proc.*, **35**, 2041-2042.
- 75) SANDRIN, M.S., FODOR, W.L., MOUHTOURIS, E., et al. (1995). Enzymatic remodeling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity. *Nat. Med.*, **1**, 1261-1267.

- 76) SCHMOECKEL, M., BHATTI, F.N., ZAIDI, A., et al. (1998). Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model. *Transplantation*, **65**, 1570-1577.
- 77) SCHULTEAM, E.J., ROBSON, S.C., KNOEFEL, W.T., HOSCH, S.B. and ROGIERS, X. (2005). O linked glycosylation and functional incompatibility of porcine von Willebrand factor for human platelet GPIb receptors. *Xenotransplantation*, **12**, 30-37.
- 78) SCHURMAN, H.J., PINO-CHAVEZ, G., PHILLIPS, M.J., THOMAS, L., WHITE, D.J. and COZZI, E. (2002). Incidence of hyperacute rejection in pig-to-primate transplantation using organs from hDAF-transgenic donors. *Transplantation*, **73**, 1146-1151.
- 79) SEKIJIMA, M., WAKI, S., SAHARA, H., et al. (2014). Results of life-supporting GalT-KO kidneys in cynomolgus monkeys using two different sources of GalT-KO swine. *Transplantation*, **98**, 419-426.
- 80) SHARMA, A., OKABE, J., BIRCH, P., et al. (1996). Reduction in the level of Gal (α 1,3) in transgenic mice and pigs by the expression of α 1,2-fucosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 7190-7195.
- 81) SHIM, H., GUTIERREZ-ADAN, A., CHEN, L.R., et al. (1999). Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biol. Reprod.*, **57**, 1089-1095.
- 82) SHIMATSU, Y., YAMADA, K., HORII, W., et al. (2013). Production of cloned NIBS (Nippon Institute for Biological Science) and α -1,3-galactosyltransferase knockout MGH miniature pigs by somatic cell nuclear transfer using the NIBS breed as surrogates. *Xenotransplantation*, **20**, 157-64.
- 83) SHIMIZU, A., HISASHI, Y., KUWAKI, K., et al. (2008). Thrombotic microangiopathy associated with humoral rejection of cardiac xenografts from α 1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs in baboons. *Am. J. Pathol.*, **172**, 1471-1481.
- 84) SHIMIZU, A., YAMADA, K., YAMAMOTO, S., et al. (2005). Thrombotic microangiopathic glomerulopathy in human decay accelerating factor-transgenic swine-to-baboon kidney xenografts. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **16**, 2732-2745.
- 85) SONG, S., MODY, M., FREEDMAN, J., ELLIS, J. and LAZARUS, A.H. (2003). von Willebrand factor (VWF)-dependent human platelet activation: porcine VWF utilizes different transmembrane signaling pathways than does thrombin to activate platelets, but both require protein phosphatase function. *J. Thromb. Haemost.*, **1**, 337-346.
- 86) STICE, S.L., ROBL, J.M., PONCE, D.E., et al. (1998). Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology*, **49**, 129-138.
- 87) STROCK, M., ABENDROTH, D., PRESTEL, R., et al. (1997). Morphology of hDAF (CD55) transgenic pig kidneys following *ex-vivo* hemoperfusion with human blood. *Transplantation*, **63**, 304-310.
- 88) SUZUKI, S., IWAMOTO, M., SAITO, Y., et al. (2012). Il2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs. *Cell Stem Cell*, **14**, 753-758.
- 89) SYNNESTVEDT, K., FURUTA, G.T., COMERFORD, K.M., et al. (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.*, **110**, 993-1002.
- 90) TANEMURA, M., MARUYAMA, S. and GALILI, U. (2000). Differential expression of α 1,3-galactosyl epitopes (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) on pig and mouse organs. *Transplantation*, **69**, 187-190.
- 91) TEARLE, R.G., TANGE, M.J., ZANNETTINO, Z.L., et al. (1996). The α -1,3-galactosyltransferase knockout mouse. Implications for xenotransplantation. *Transplantation*, **61**, 13-19.
- 92) TEARLE, R.G., TANGE, M.J., ZANNETTINO, Z.L., et al. (1996). The α -1,3-galactosyltransferase knockout mouse. Implications for xenotransplantation. *Transplantation*, **61**, 13-19.
- 93) THALL, A.D., MALY, P. and LOWE, J.B. (1995). Oocyte Gal α 1,3Gal epitopes implicated in sperm adhesion to the zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required for fertilization in the mouse. *J. Biol. Chem.*, **270**, 21437-21440.
- 94) 東條英昭 (1993). トランスジェニック動物の生産 - 家畜への遺伝子導入 -. *日畜会報*, **64**, 306-321.
- 95) 東條英昭 (2001). 特集: 人工肝臓研究 - 最近の進歩 -: 臓器移植用トランスジェニック家畜の開発と課題, *臨床雑誌「外科」*, **63**, 514-521.
- 96) 東條英昭 (2004). トランスジェニック動物. *朝倉書店*, 東京, pp82-116.
- 97) TSENG, Y.L., KUWAKI, K., DOR, F.J., et al. (2005). α 1,3-Galactosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months. *Transplantation*, **80**, 1493-1500.
- 98) UMEYAMA, K., WATANABE, M., SAITO, H., et al. (2009). Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1 α induces diabetes I transgenic-cloned pigs. *Transgenic Res.*, **18**, 697-706.
- 99) WATERWORTH, P.D., DUNNING, J., TOLAN, M., et al. (1998). Life-supporting pig-to-baboon heart xenotransplantation. *J. Heart Lung Transplant.*, **17**, 1201-1207.
- 100) WILMUT, I., SCHNIEKE, A.E., MCWHIR, J., KIND, A.J. and

- CAMPBELL, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, **385**, 810-813.
- 101) WYNYARD, S., NATHU, D., GARKAVENKO, O., DENNER, J. and ELLIOTT, R. (2014). Microbiological safety of the first clinical pig islet xenotransplantation trial in New Zealand. *Xenotransplantation*, **21**, 309-323.
- 102) WIEBE, K., POELING, J., MELISS, R., et al. (2001). Improved function of transgenic pig lungs in *ex vivo* lung perfusion with human blood. *Transplant. Proc.*, **33**, 773-774.
- 103) YAZAKI, S., IWAMOTO, M., ONISH, I. et al. (2012). Production of cloned pigs expressing human thrombomodulin in endothelial cells. *Xenotransplantation*, **19**, 1399-3089.
- 104) YEATMAN, M., DAGGETT, C.W., LAU, C.L., et al. (1999). Human complement regulatory proteins protect swine lungs from xenogeneic injury. *Ann. Thorac. Surg.*, **67**, 769-775.
- 105) YU, S., LUO, J., SONG, Z., DING, F., DAI, Y. and LI, N. (2011). Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene *via* zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res.*, **21**, 1638-1640.
- 106) ZAIDI, A., SCHMOECKEL, M., BHATTI, F., et al. (1998). Life-supporting pig-toprimate renal xenotransplantation using genetically modified donors. *Transplantation*, **65**, 1584-1590.
- 107) ZURBANO, M.J., ESCOLAR, G., HERAS, M., ORDINAS, A. and CASTILLO, R. (2000). Differential aspects of the glycoprotein Ib-von Willebrand factor axis in human and pig species. *Haematologica*, **85**, 514-519.

Current Status and Prospects for Exploitation of the Genetically Modified Pigs for Xenograft

Hideaki TOJO

Visiting Professor of Nippon Veterinary and Life Science University and
Professor Emeritus of University of Tokyo

Abstract

Lack of donated human organs for transplantation is serious problem for the patients suffering from complete organ disorder. For alternatives to the use of human organs for transplantation, artificial organs and organs from other species, i.e. xenograft, have been developed. The pig is generally acceptable as donor species for xenograft, because of its physiological similarity with humans and the animal that is already a food source to humans. However, for the use of pig organs in human xenograft, it is necessary to make genetic modifications to the pig genome, which control the superacute rejection of transplanted pig tissues. We can now genetically modify pig genome by using the transgenic manipulation, i.e. gene transfer and gene targeting. This review article describes progress and prospects for exploitation of the genetically modified pigs for xenograft.

Key words : xenograft, genetically modified pigs, superacute rejection

Bull. Nippon Vet. Life Sci. Univ., **64**, 1-9, 2015.