様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　８　月　　９　日現在

機関番号：　７２６１１
研究種目：　挑戦的萌芽研究
研究期間：　2015～2016
課題番号：　１５Ｋ１４３７４

研究課題名（和文）生殖細胞に寄与しないマウス胚盤胞補完法の確立

研究課題名（英文）Establishment of mouse blastocyst complementation without contribution to germ cells

研究代表者

橋本　晴夫（Hashimoto, Haruo）

公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・研究員

研究者番号：３０３５３４７８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究目的は、外来性幹細胞が生殖細胞に寄与しない胚盤胞補完法を開発し、in vivoでヒト化膵臓マウスを用いた糖尿病モデル開発へ応用することがゴールである。
　先ずGFPを発現するマウスES細胞をゲノム編集により、生殖細胞の分化に関わるPrdm14遺伝子をノックアウト(KO)(Prdm14KO-ES細胞)し、胚盤胞へ注入した。その結果、作成されたキメラマウスは雌雄ともに不妊であり、生殖細胞でGFPは検出されず、Prdm14KO-ES細胞は生殖細胞に寄与しなかったと思われた。これによりヒトと動物の集合胚での倫理的懸案事項の1つである外来性幹細胞の生殖細胞への分化を解決することができると思われた。

研究成果の概要（英文）：Our goal is to establish the mouse blastocyst complementation method without contribution to germ cells, and to apply the method to development of humanized pancreatic mice. At first, we established Prdm14 gene deficient ES cells with GFP expression (Prdm14KO-ES cells) using Genome edition technology (CRISPR/Cas9). Then, chimeric mice were generated by Prdm14KO-ES cells and moue blastocysts from IQI/Jic. As the results, the generated chimeric mice were not fertilized. Additionally, Prdm14KO-ES cells did not contribute to germ cells because GFP expression as marker of Prdm14KO-ES cells was not detected in germ cells.
Therefore, these results may solve the problem associated with animal-human chimeric embryo.

研究分野：　実験動物学

キーワード：　胚盤胞補完法　生殖細胞　PRDM14

１．研究開始当初の背景

胚盤胞補完法は、遺伝子操作で欠損させた臓器・組織を、胚盤胞期胚の卵割腔へ外来幹細胞を注入することにより再構築させる技術であり、1993 年に rag2 遺伝子欠損マウスを用いた免疫 T および B 細胞の再構築が最初の報告である(*Proc.Natl.Acad.Sci.*90, p4528-4532)。近年では、中内らが PDX-1 欠損マウスを用い、マウスまたはラット細胞由来の膵臓の再生･構築に成功している(*Cell.* 142, p787-799)。これらの研究はヒトの再生医療を目的として行われているため、通常は次のステップとしてヒト ES または iPS 細胞などのヒト幹細胞を用いた組織や臓器の構築に移行したいところである。アメリカとイスラエルでは、実際にヒトの ES 細胞をニワトリの初期胚(*Dev. Dyn.*225, p80-86)とマウスの胚盤胞(*Dev.Biol.* 295, p90-102)へ注入し、胎子でのキメラ成立の確認が行われている。しかし、日本ではヒトと他の動物の異種間キメラ作製は、今の所、法令により規制されており、現在まで許可された例はない。その規制の理由は、動物の胚盤胞補完法へのヒト由来幹細胞の使用が**ヒト配偶子の作製とそれらによる人工的なヒトの作製**、そして**異種動物での大脳への寄与による高次精神神経構造の発生**に繋がるものと危惧されているからである。従って、日本での胚盤胞補完法技術はヒト以外の異種間動物のみで行われている。申請者は、2003 年から 2 型糖尿病モデルの開発を進め、IRS-2 欠損マウス開発と特性に関する研究を推進してきた(*Exp. Anim.*60 p21-32)。しかし、近年の糖尿病の治療薬は、脂肪組織に作用しインシュリン抵抗性を軽減するものから SU 受容体作働薬および GLP-1 の様に膵臓直接作用する治療薬に移行しつつある。これらのころから、ヒトの糖尿病モデルにさらに近づけるためヒト化膵臓マウスの開発を試みた。ところが膵臓は臓器としては脆弱であり、再生力のあるヒト肝臓の様に TK-NOG マウスの体内で再構築する手法(*Biochem.Biophys.Res.Commun.* 405, p405-410)は不可能である。*In vitro* においても 2010 年に奈良県立医科大学にてマウス iPS 細胞から立体構造を持つ腸管の作製に成功したが、繊毛や陰窩など一部の組織が欠失しており(*Biochem.Biophys.Res.Commun.*391, p38-42)、移植への実用化には程遠い。現在まで *in vitro* においてもヒトはおろかマウスですら立体的かつ機能的な臓器の開発には至っていない。そこで、私たちは胚盤胞補完法による膵臓の再生研究を行うにあたって、外来性幹細胞が生殖細胞に寄与しない胚盤胞補完法技術開発の着想に至った。

２．研究の目的

本研究目的は、外来性幹細胞が生殖細胞に寄与しない胚盤胞補完法を開発することである。この技術を応用し *in vivo* でヒト化膵臓マウスを用いた糖尿病モデルを開発することが最終的なゴールである。当研究所では、肝臓の再生力と自己肝臓破壊マウスの応用によりヒト化肝臓マウスの開発に成功しているが、臓器として脆弱な膵臓のヒト化マウスに同じ手法は不可能である。そこで本研究では、Prdm14 遺伝子の欠損マウスは生殖細胞のみを欠損させる論文に着目し、マウス ES 細胞でゲノム編集による Prdm14 遺伝子ノックアウト ES 細胞を樹立し、胚盤胞補完法へ応用する。これによりヒトと動物の集合胚での倫理的懸案事項の１つである外来性幹細胞の生殖細胞への分化を解決することができ、創薬･医学研究に有用なヒト化膵臓マウスを用いた糖尿病モデルの開発を実現可能にする。

３．研究の方法

本研究では、外来性幹(ES)細胞がマウス胚盤胞補完法で生殖細胞の発生に寄与しない技術を確立することにより、ヒトと動物

の集合胚での懸案事項を解決し、ヒト化膵臓マウスの開発することを目指す。本申請では、この技術の確立に向けた工程を次の 3 項目に分類して段階的に進める 1) GFP 発現 ES 細胞と PDX-1 欠損マウスによる胚盤胞補完法成立の確認(対照)、2) ゲノム編集による Prdm14 遺伝子欠損 ES 細胞の樹立、3) PDX-1 欠損マウスを用い胚盤胞補完法による Prdm14 遺伝欠損 ES 細胞の評価

４．研究成果

Prdm14 遺伝欠損 ES 細胞を用いて PDX-1 欠損マウスによる胚盤胞補完法を実施した。その結果、Prdm14 遺伝欠損 ES 細胞によってレスキューされた PDX-1 ホモ欠損マウスは、雌雄ともに生殖細胞の形成は認められず不妊であった。それに対し、コントロールとして使用した無処置の ES 細胞での PDX-1 ホモ欠損マウスは、雌雄ともに次世代の作製が認められた。

従って、Prdm14 を人為的に欠損させた ES 細胞は、ヒトと動物の集合胚で懸念されている、ヒト ES(幹)細胞による生殖細胞への寄与を防ぐ事が出来るものと思われる。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

1. **Haruo HASHIMOTO**, Tsutomu KAMISAKO, Takahiro KAGAWA, Seiki HARAGUCHI, Mika YAGOTO, Ri-ichi TAKAHASHI, Kenji KAWAI, Hiroshi SUEMIZU. 2015.Expression of pancreatic and duodenal homeobox1 (PDX1) protein in the interior and exterior regions of the intestine, revealed by development and analysis of Pdx1 knockout mice. *Laboratory Animal Research* 31(2) pp93-98.

2. **Haruo HASHIMOTO**, Tomoko, MIZUSHIMA, Tomoyuki OGURA, Takahiro KAGAWA, Kayo TOMIYAMA, Ri-ichi TAKAHASHI, Mika YAGOTO, Kenji KAWAI, Tsuyoshi CHIJIWA, Masato NAKAMURA, Hiroshi SUEMIZU. 2016. Study on AAV-mediated gene therapy for diabetes in humanized liver mouse to predict efficacy in humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478(3) pp1254-1260.

3. 齊藤宗雄，今井都秦，**橋本晴夫**. 2016. ビニールアイソレータの圧力変化を応用した空気漏洩の簡便な検出方法の確立. 実験動物技術. 51, 41-46.

〔学会発表〕（計 3 件）

1. PDX-1 ノックアウトマウス開発の試み

橋本晴夫[1]、原口清輝[2]、上迫　努[1]、香川貴洋[1]、位高美香[1]、高橋利一[1]、川井健司[1]、末水洋志[1]（実中研[1]，畜産草地試験場[2]）

第 62 回日本実験動物学会総会(京都)、平成 27 年(2015)5 月 28 日

2. C57BL/6JJcl を遺伝的背景に持つ IRS2 欠損マウスの効率的な繁殖方法の検討

橋本晴夫[1]、江藤智生[1]、上迫　努[1]、山内敏正[2]、窪田直人[2]、植木浩二郎[2]、日置恭司[1]、齊藤宗雄[1]、門脇　孝[2]、伊藤守[1]（公益財団法人実験動物中央研究所[1]），東京大学大学院[2]）

第 63 回日本実験動物学会総会(川崎)、平成 28 年(2016)5 月 19 日

3. マウス雌雄生みわけに関する新技法の開発

橋本晴夫、江藤智生、末水洋志、伊藤　守
(公益財団法人実験動物中央研究所)
第 39 回日本分子生物学会年会(パシフィッコ横浜)、平成 28 年(2016)11 月 30 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

６．研究組織
(1)研究代表者
橋本晴夫(HARUO HASHIMOTO)
公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・研究員
研究者番号：30353478

(2)研究協力者
吉村祐貴(YUKI YOSHIMURA)
公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・研究員

江藤智生(TOMOO ETOH)
公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・室長

川井健司(KENJI KAWAI)
公益財団法人実験動物中央研究所・病理解析センター・センター長

樋口裕一郎(YUICHIRO HIGUCHI)
公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・研究員