

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06023

研究課題名(和文) インユートロ幹細胞移植による動物体内を利用したヒト血液・臓器作出

研究課題名(英文) Blood and organ production in animal developmental environment with in utero stem cell transplantation

研究代表者

関 信輔 (Seki, Shinsuke)

秋田大学・バイオサイエンス教育・研究サポートセンター・准教授

研究者番号：60749167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内胎仔への細胞移植方法の報告はほとんどないにも関わらず、マウスにおいて細胞移植が可能であることを示した。また、ゲノム編集技術を用いることで、F0世代でも血液欠損・臓器欠損動物を安定的に作出する方法を示した。そして、マウスにおいて、異なる系統由来の赤血球、白血球やリンパ球を含む血液を補完することに成功した。血液を補完するためにノックアウトする遺伝子を選択できている。膵臓に関しても一部ではあるものの異系統由来の膵島の確認に成功している。マウス、ラット、ウサギのうち血液あるいは臓器の補完目的に応じた動物を選択し、実際にヒト血液あるいは臓器を産生することが可能かどうか実施できる段階にある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療における究極の目標は移植可能なヒト臓器を産生することである。遺伝的に臓器を欠損する動物にES細胞あるいはiPS細胞をインジェクションする「胚盤胞補完法」によって異種動物体内に臓器が産生されている。しかしながら、ヒト多能性幹細胞をインジェクションした胚を発生させて良いのかという倫理的な問題と、ヒトiPS細胞にはキメラ形成能がないのではないのかという課題がある。それらの解決を待たずして、今すぐ、ヒト血液や臓器を産生するための方法を見出しており、学術的意義や社会的意義のある研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：By using genome editing technology, I have developed a method to stably create blood-deficient and organ-deficient animals even in the F0 generation. Furthermore, although there are few reports on the method of cell transplantation into fetus in uterus, I demonstrated that cell transplantation is possible in mice. I succeeded in complementation of blood in mice containing red blood cells, white blood cells, and lymphocytes from different strains (GFP). In addition, we have successfully confirmed pancreatic islets derived from different strains of the pancreas. We are at the stage where it is possible to actually produce human blood or organs by selecting an animal among mice, rats, and rabbits according to the purpose of producing blood or organs.

研究分野：動物発生工学

キーワード：インユートロ移植 幹細胞移植

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臓器不全症の治療には臓器移植が有効であるが、ドナー不足や生体適合性の問題などを解決できていないのが現状である。移植可能な臓器を患者自身の細胞から産生することは再生医療の究極な目標のひとつである。研究代表者が参加している研究チームでは、遺伝的に臓器を欠損する動物の胚盤胞期胚に正常多能性幹細胞 (ES 細胞あるいは iPS 細胞) をインジェクションし、動物発生環境を利用することで臓器を産生する方法「胚盤胞補完法」で、キメラ動物体内に膵臓・腎臓などを産生することに成功している。動物の発生環境を利用することで移植可能な臓器を産生することが可能である。しかしながら、この方法をヒトへ応用するにあたって課題が二つある。一つは、キメラ形成能のあるヒト iPS 細胞が樹立できていないことである。二つ目として、ヒト細胞が動物の神経や生殖腺に寄与してしまうことを懸念する倫理的問題のため、それらの課題をクリアにしながらの実験が求められ、ヒトの臓器産生にすぐに応用できないのが現状である。「胚盤胞補完法」に加えて、動物発生環境を利用した新たな臓器産生方法の開発が望ましい。

2. 研究の目的

本研究では、上述の二つの課題の解決を待つことなく、動物発生環境を利用した新たな臓器産生方法の開発を目指した。具体的には、移植する細胞に多能性幹細胞ではなく、血液あるいは臓器へと分化運命の決定している前駆細胞を用いる。分化運命が決定している前駆細胞であれば、キメラ形成能がなくても臓器を産生する可能性があるとともに、ヒト細胞が動物の神経や生殖腺に寄与することもないと考えられる。血液あるいは臓器へと分化運命の決定している前駆細胞を、動物胎仔に局所的に移植する方法で動物発生環境を利用した新たな臓器産生方法の開発を目指した。この方法であれば、上述の二つの課題の解決を待つことなくヒト血液あるいは臓器の産生を試みる事が可能である。

3. 研究の方法

血液あるいは臓器欠損マウス胎仔に分化運命の決定している前駆細胞を局所的に移植する方法で動物体内での臓器作出が可能かどうかを検証した。マウス、ラットにおいて、子宮内胎仔への細胞移植法に関する報告はあまりないため、子宮内胎仔への細胞移植法の開発をすすめた。

ホストとなる胎仔には血液あるいは臓器を欠損する胎仔を用いる必要がある。ゲノム編集技術の条件を検討することで F0 世代にて対象遺伝子をホモノックアウトすることを考えた。また、その際に、材料となるマウス・ラット 1 細胞期胚として凍結胚をいつでも利用することができれば、研究をスムーズにすすめることが可能になる。そこで、マウス、ラット 1 細胞期胚について簡易凍結保存方法の開発もすすめた。

4. 研究成果

マウス胎仔への細胞移植の報告例はあまりなかったが、受精後 12 日以降の胎仔に細胞を移植したとしても正常に発生させることが可能であることがわかった。また、ゲノム編集技術により、造血に関する遺伝子のノックアウトを試み、産まれてきた胎仔のシーケンス解析を実施したところ、すべての胎仔の標的遺伝子はノックアウトされていた。そして、血液欠損マウス胎仔に異系統 (GFP 系統) 由来の造血幹細胞をインユーテロ移植したところ、移植が成功していない場合は、胎仔は出生直後に発生停止したが、移植が成功していた胎仔は 2 ヶ月後でも生存していた (図 1)。また、そのマウスの血液を調べたところ、GFP 蛍光を示しており、異系統由来の血液を補完することに成功した (図 2)。詳細な解析をすすめたところ、赤血球、血小板、単球、リンパ B 細胞、リンパ T 細胞は GFP 蛍光を示し、赤血球だけでなく免疫細胞についても異系統間での補完に成功した (図 3)。そして、免疫不全マウス (B 細胞 T 細胞欠損) にラット造血幹細胞 (赤色蛍光) を移植したところ、ラット T 細胞がマウス体内で補完されていた。また、割合は少ないもののラット由来の赤血球、血小板も産生されており、移植したラット造血幹細胞がマウス体内に生着していると考えられる (図 4)。

また、臓器産生に関して、GFP 系統マウスから臍前駆細胞を回収したのちに、マウス胎仔に移植したところ、一部ではあるものの膵島の産生に成功した。

図1 マウス胎仔へのマウス造血幹細胞移植

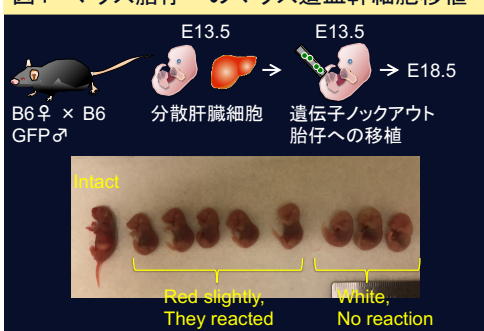


図2 マウス胎仔へのマウス造血幹細胞移植



図3 マウス胎仔へのマウス造血幹細胞移植

	遺伝子 intact GFP positive	遺伝子ノックアウト GFP positive
赤血球	0-0.49%	97.8%
血小板	0-0.19%	94.4%
単球	0.13-1.37%	97.8%
リンパ球 B細胞	0.2-2.9%	96.0%
リンパ球 T細胞	0.1-5%	94.0%

図4 マウス胎仔へのラット造血幹細胞移植

	TdTomato positive Derived donor
赤血球	0.003%
血小板	0-0.019%
単球	0%
リンパ球 B細胞	0%
リンパ球 T細胞	92.2-96.6%

異種間 (ラット体内での血液産生) を目指した研究をすすめたところ、ラットにおいても遺伝子の F0 世代でホモノックアウトするとともに、インユーテロ移植が可能であることがわかった。それら研究の基礎研究として、材料に用いるマウス 1 細胞期胚の簡易凍結保存方法の開発に成功しているとともに (Seki et al. 2018, *Cryobiology*)、ラット 1 細胞期胚の凍結保存法の開発に成功している (Fukuda et al. 2021 *Biology of Reproduction*, Seki et al. 2023 *Scientific Reports*)。ウサギについても胚の凍結保存方法や胚移植方法を習得できており、ウサギへの応用も可能な状態にある。

ゲノム編集技術により動物種を問わず血液・臓器欠損動物を用意する、インユーテロ移植により幹細胞を移植するという方法が開発できているため、適切なホスト動物を選択することで異種動物での血液・臓器産生につながるところまで研究をすすめることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Seki Shinsuke, Kawabe Toshiaki, Yamazaki Wataru, Matsumura Kazuaki, Oikawa Takanori, Obata Takahiro, Higashiya Misako, Yano Megumi, Eto Tomoo	4. 巻 13
2. 論文標題 Cryopreservation of rat embryos at all developmental stages by small-volume vitrification procedure and rapid warming in cryotubes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-47394-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suchy Fabian P., Nishimura Toshiya, Seki Shinsuke, Wilkinson Adam C., Higuchi Maimi, Hsu Ian, Zhang Jinyu, Bhadury Joydeep, Nakauchi Hiromitsu	4. 巻 12
2. 論文標題 Streamlined and quantitative detection of chimerism using digital PCR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-14467-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Fukuda Yasuyoshi, Higashiya Misako, Obata Takahiro, Basaki Keita, Yano Megumi, Matsumura Kazuaki, Ono Kyoichi, Ohba Takayoshi, Okamoto Yosuke, Nishijima Kazutoshi, Seki Shinsuke	4. 巻 105
2. 論文標題 Small-volume vitrification and rapid warming yield high survivals of one-cell rat embryos in cryotubes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 258 ~ 266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/iaob059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuda Y, Shibata Y, Basaki K, Fukuda Y, Takaki N, Maeda T, Hirao M, Yano M, Higashiya M, Obata T, Seki S, Nishijima K	4. 巻 81
2. 論文標題 Characteristic features of newly established specific pathogen-free albino large rabbit (JW-AKT): Comparison with Japanese White and New Zealand White rabbits.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 739 743
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.18-0758	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 場崎 恵太, 福田 康義, 矢野 愛美, 東谷美沙子, 小畑 孝弘, 関 信輔, 西島 和俊	4. 巻 34
2. 論文標題 潜在致死遺伝子を標的としたゲノム編集法について	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 九州実験動物雑誌	6. 最初と最後の頁 45-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seki S, Basaki K, Komatsu Y, Fukuda Y, Yano M, Matsuo Y, Obata T, Matsuda Y, Nishijima K	4. 巻 81
2. 論文標題 Vitrification of one-cell mouse embryos in cryotubes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cryobiology	6. 最初と最後の頁 132-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cryobiol.2018.01.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 関 信輔	4. 巻 1
2. 論文標題 絶滅危惧種メダカの保全, 超低温保存した細胞からメダカの復元に成功	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 青淵	6. 最初と最後の頁 8-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 関 信輔, 川辺敏晃, 及川剛宗, 山崎 涉, 小畑孝弘, 東谷美沙子, 矢野愛美, 江藤智生
2. 発表標題 最小容量ガラス化法と急速融解によるラット1細胞期胚ガラス化保存法の高度化
3. 学会等名 第57回 日本実験動物技術者協会, 福島市, 口頭発表, 2023年10月20日
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関 信輔, 川辺敏晃, 及川剛宗, 山崎 渉, 小畑孝弘, 東谷美沙子, 矢野愛美, 江藤智生
2. 発表標題 最小容量ガラス化法と急速融解によるラット1細胞期胚ガラス化保存法の高度化
3. 学会等名 第116回 日本繁殖生物学会, 神戸市, 口頭発表, 2023年9月26日
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関 信輔, 川辺敏晃, 及川剛宗, 山崎 渉, 小畑孝弘, 東谷美沙子, 矢野愛美, 江藤智生
2. 発表標題 最小容量ガラス化法と急速融解によるラット1細胞期胚ガラス化保存法の高度化
3. 学会等名 第70回 日本実験動物学会, つくば市, 口頭発表, 2023年5月24日
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Seki S, Fukuda Y, Oikawa T, Higashiya M, Obata T, Yano M, Yamazaki W, Kawabe T
2. 発表標題 Vitrification of one-cell rat embryos in cryotubes by small-volume vitrification and rapid warming
3. 学会等名 The 59th Annual meeting of the society for Cryobiology, (Ireland, Dublin, U.S. In person and virtual hybrid Event, virtual発表), 2022年7月. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関 信輔, 川辺敏晃, 及川剛宗, 山崎 渉, 福田康義, 小畑孝弘, 東谷美沙子, 矢野愛美, 江藤智生
2. 発表標題 最小容量ガラス化法と急速融解によるラット1細胞期胚ガラス化保存法の高度化
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2022, 現地WEBハイブリッド開催, オンライン口頭発表
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田康義, 及川剛宗, 東谷美沙子, 小畑孝弘, 矢野愛美, 川辺敏晃, 関 信輔
2. 発表標題 最小容量ガラス化法と急速融解によるクライオチューブを用いたラット1細胞期胚ガラス化保存法
3. 学会等名 第69回 日本実験動物学会総会, 仙台市, ポスター発表, 2022年5月19日.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関 信輔
2. 発表標題 急速融解に着目した細胞の超低温保存法の開発
3. 学会等名 2021年度日本伝熱学会東北支部 秋季セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田康義, 及川剛宗, 東谷美沙子, 小畑孝弘, 矢野愛美, 川辺敏晃, 関 信輔
2. 発表標題 最小容量ガラス化法と急速融解によるクライオチューブを用いたラット1細胞期胚ガラス化保存法
3. 学会等名 第7回 東北動物実験研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関 信輔, 福田康義, 小畑孝弘, 及川剛宗, 矢野愛美, 東谷美沙子, 前田 達弘, 高井直史, 西島和俊, 松田幸久
2. 発表標題 急速融解によるクライオチューブを用いたウサギ胚のガラス化保存
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田康義, 東谷美沙子, 小畑孝弘, 矢野愛美, 及川剛宗, 川辺敏晃, 尾野恭一, 岡本洋介, 西島和俊, 関 信輔
2. 発表標題 最少容量ガラス化法と急速融解によるクライオチューブを用いたラット1細胞期胚ガラス化保存法の開発
3. 学会等名 第114回 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関 信輔
2. 発表標題 生殖幹細胞の凍結保存と代理親への移植による絶滅危惧種の復元
3. 学会等名 令和2年度秋田産学官ネットワーク運営会議(秋田県内会議 招待講演・記念講演)(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田康義, 東谷美沙子, 小畑孝弘, 場崎恵太, 矢野愛美, 尾野恭一, 大場貴喜, 岡本洋介, 西島和俊, 関 信輔
2. 発表標題 急速融解によるCryotubeを用いたラット1細胞期胚のガラス化保存
3. 学会等名 第61回 日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田康義, 東谷美沙子, 小畑孝弘, 場崎恵太, 矢野愛美, 尾野恭一, 大場貴喜, 岡本洋介, 西島和俊, 関 信輔
2. 発表標題 急速融解によるクライオチューブを用いたラット1細胞期胚ガラス化保存
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 場崎恵太, 矢野愛美, 東谷美沙子, 小畑孝弘, 福田康義, 関 信輔, 西島和俊
2. 発表標題 潜性致死遺伝子を標的とした効率的なゲノム編集マウスの作出
3. 学会等名 第67回 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Seki S, Obata T, Basaki K, Komatsu Y, Fukuda Y, Yano M, Higashiya M, Matsuda Y, Nishijima K
2. 発表標題 Vitrification of mouse and rabbit zygotes; effect of rapid warming.
3. 学会等名 The 56th Annual meeting of the society for Cryobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishijima K, Tajima S, Fukuda Y, Basaki K, Yano M, Higashiya M, Sato Y, Obata T, Seki S
2. 発表標題 Improvement of embryo use efficiency in generation of gene-modified rabbit.
3. 学会等名 The 8th International Congress of Rabbit Biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関 信輔
2. 発表標題 実験動物メダカの生殖幹細胞移植による遺伝資源保全
3. 学会等名 東北動物実験研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田康義, 東谷美沙子, 小畑孝弘, 場崎恵太, 矢野愛美, 尾野恭一, 大場貴喜, 岡本洋介, 西島和俊, 関 信輔
2. 発表標題 クライオチューブを用いた低濃度耐凍剤液でのラット1細胞期胚のガラス化保存
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田康義, 東谷美沙子, 小畑孝弘, 場崎恵太, 矢野愛美, 尾野恭一, 大場貴喜, 岡本洋介, 西島和俊, 関 信輔
2. 発表標題 クライオチューブを用いた低濃度耐凍剤液でのラット1細胞期胚のガラス化保存
3. 学会等名 東北生理談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関 信輔, 場崎恵太, 福田康義, 矢野愛美, 小畑孝弘, 東谷美沙子, 松田幸久, 西島和俊
2. 発表標題 クライオチューブを用いた低濃度耐凍剤液でのマウス1細胞期胚のガラス化保存
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関 信輔, 場崎恵太, 福田康義, 矢野愛美, 小畑孝弘, 東谷美沙子, 松田幸久, 西島和俊
2. 発表標題 急速融解による低濃度耐凍剤液を用いたマウス胚のガラス化保存
3. 学会等名 低温生物工学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関 信輔, 場崎恵太, 小松幸恵, 福田康義, 矢野愛美, 松尾悠平, 小畑孝弘, 松田幸久, 西島和俊
2. 発表標題 急速融解によるマウス1細胞期胚のガラス化保存
3. 学会等名 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Naruse K, Kezuka F, Seki S, Lee S, Yoshizaki G	4. 発行年 2019年
2. 出版社 WILEY Blackwell	5. 総ページ数 344
3. 書名 Cryopreservation and Transplantation of Medaka Germ Cells, Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 哺乳動物初期胚の凍結保存方法	発明者 関信輔 福田 西島 場崎 矢野 小畑 東谷 尾野	権利者 秋田大学
産業財産権の種類、番号 特許、R0105161 特願2019-133275	取得年 2023年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西島 和俊 (Nishijima Kazutoshi) (70435874)	秋田大学・バイオサイエンス教育・研究サポートセンター・准教授 (11401)	2020年8月末に他機関へ転出されたため、研究分担者を辞退

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中内 啓光 (Nakauchi Hiromitsu)	スタンフォード大学・Medicine・Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Stanford University			