

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06031

研究課題名(和文)新規臓器欠損法による異種キメラ動物を利用した様々な臓器の作成

研究課題名(英文) Generation of various organs by blastocyst complementation with a novel organ deficient method

研究代表者

由利 俊祐 (yuri, shunsuke)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：10800881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：異種間キメラを用いた胚盤胞補完法では、作れる臓器と作れない臓器がある。本研究では様々な臓器欠損モデルを簡便に評価する『逆・胚盤胞補完法』を開発した。また、新規に作り出した腎臓、肺、心臓、腸などの様々な臓器欠損モデルを「逆・胚盤胞補完法」により評価したところ、腎臓、肺においてはほぼ完全に野生型細胞からなる臓器の構築に成功した。また、肺と腎臓の臓器欠損モデルを用いて、胚盤胞補完法により臓器を作り出すための条件を調べたところ、野生型細胞が一定数存在することが重要であった。さらに異種の細胞の寄与は臓器ごとに異なり、これが原因で異種細胞を用いた胚盤胞補完法で臓器を補完できないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで胚盤胞補完法により臓器を作り出すための条件は明らかではなかったが、本研究課題成果により、その条件を明らかにすることができた。同時に、今後の課題として、異種細胞が寄与しにくい組織の場合、『なぜその組織へ寄与しづらいのか、どのようにすれば、異種細胞を目的組織へ寄与させることができるのか』を明らかにする必要があることがわかった。さらに、この課題が明らかになった時、胚盤胞補完法による異種臓器の作成の実現につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the blastocyst completion method using xenogenic chimeras, there are some organs that can be produced and some organs that cannot be produced. In this study, we developed the "Reverse Blastocyst Completion Method" to evaluate various organ deficient models easily. We also evaluated various organ-deficient models, such as kidney, lung, heart, and intestine, using the "reverse blastocyst completion method. In the lung and kidney models, the contribution of a certain number of wild-type cells in the empty niche was important to produce the organs. Furthermore, the contribution of xenogenic cells differed from organ to organ, and this was the reason why xenogenic cells could not complement organs in the blastocyst complementation.

研究分野：器官発生

キーワード：胚盤胞補完法 臓器再生 肺 腎臓

1. 研究開始当初の背景

異種キメラを用いた胚盤胞補完法による臓器の作出は、マウス-ラットキメラにおいて膵臓で成功が発表され (Kobayashi et al., *Cell*, 2010)、胸腺欠損するヌードマウスの胚盤胞にラット ES 細胞を注入し、マウス体内でラット胸腺を作り出すことにも成功している (Isotani et al., *Genes Cells*, 2011)。一方で、腎臓を欠損するマウスの胚盤胞にラット ES 細胞を補完した場合は、腎臓はラットに置き換わらずに腎臓が全くできなかった (Usui et al., *Am J Pathol*, 2012)。これらのことから異種キメラの胚盤胞補完法では、作れる臓器と作れない臓器があることが分かる。しかしながら、なぜ補完できない臓器があり、どのような条件であれば臓器を作り出すことができるかは未だ不明であった。

2. 研究の目的

『どの臓器が異種間キメラ内で補完できるのか、また、補完できない場合はどうすれば補完できるか』という問いを明らかにするために、本研究では様々な臓器欠損モデル動物を迅速簡便に作成、評価し、異種キメラ内で臓器が補完されない理由を探る研究を行った。

3. 研究の方法

様々な臓器欠損モデル動物を迅速簡便に作成するために、従来の遺伝子欠損による臓器欠損ではなく、臓器特異的な遺伝子へ細胞死を誘導するシステムを構築し、効率よく臓器を欠損するモデルを作成した。また、作成後のモデルは、胎盤にのみ寄与することができる4倍胚を用い、遺伝子改変 ES 細胞と異種 ES 細胞のみで異種キメラを作成し、異種の臓器を作成することができるかを評価した。

4. 研究の成果

従来の胚盤胞補完法では、遺伝子改変マウスから得られる遺伝子改変胚に対し、野生型 ES 細胞を注入することで、遺伝子改変細胞と野生型細胞が入り混じるキメラを作成していた。本研究課題においては、遺伝子改変を行った ES 細胞を、逆に野生型の胚盤胞へ注入し、野生型細胞と遺伝子改変を行った細胞の混じったキメラを作成する『逆・胚盤胞補完法』を開発した。これにより、遺伝子改変 ES 細胞を樹立するだけで、胚盤胞補完法と同様のキメラを作成することができ、遺伝子改変が臓器形成に与える影響を迅速に解析することができるようになった (図 1 A)。

まず、腎臓、肺、心臓、腸などの臓器に対し、臓器を欠損するように細胞死を誘導する遺伝子改変を加えた ES 細胞を樹立し、開発した『逆・胚盤胞補完法』を用いることで、臓器欠損モデルを評価した。その結果、腎臓や肺においてはほぼ完全に野生型細胞からなる臓器を構築することができた (図 1B)。

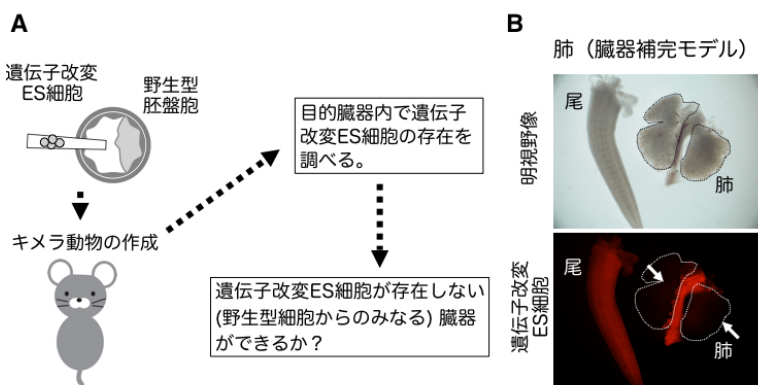


図1. 臓器補完モデルの評価法

A: 遺伝子改変ES細胞を野生型胚へと注入し、キメラ動物を作成する。遺伝子改変ES細胞が目的臓器へ寄与できず、野生型胚由来の細胞のみから構成された場合、その遺伝子改変は臓器補完モデルとして適格であると言える。

B: 遺伝子改変したES細胞は肺へ寄与できない。つまり、肺は野生型細胞からのみ構成されており、この遺伝子改変は肺補完モデルとして適格であることがわかった。

また、肺欠損、腎臓欠損のモデルを用いて、『逆・胚盤胞補完法』を行い、どの程度の野生型の細胞がキメラ内に存在するときに臓器が欠損するかを定量的に評価した。その結果、肺を野生型細胞により補完するためには、野生型細胞が10%以上キメラ体内に混在するときに肺は存在し、腎臓を野生型細胞により補完するためには、野生型細胞が30%以上存在することが必要であることがわかった。

以上の結果から、胚盤胞補完法により臓器を作り出すためには、野生型細胞が一定数以上キメラ体内に存在することが重要であることがわかった(図2)。

さらに、異種胚盤胞補完法により、ラットの腎臓がマウス体内でできなかった理由は、ラットES細胞をマウス胚盤胞へ注入した際、ラットの細胞が腎臓へと30%以上寄与できないためかを調べた。野生型のマウス胚盤胞に対しラットES細胞注入し、ラット細胞がどの程度腎臓へ寄与できるかを調べたところ、ラット細胞は、腎臓へはほぼ寄与することができないことが明らかとなった(図3)。一方で、ラット細胞はマウス体内で、胃や肺へ寄与しやすいことがわかった(図3)。

つまり、ラットの細胞は臓器ごとに寄与率が異なり、それが原因で異種の臓器を作り出すことができないことがあることがわかった。

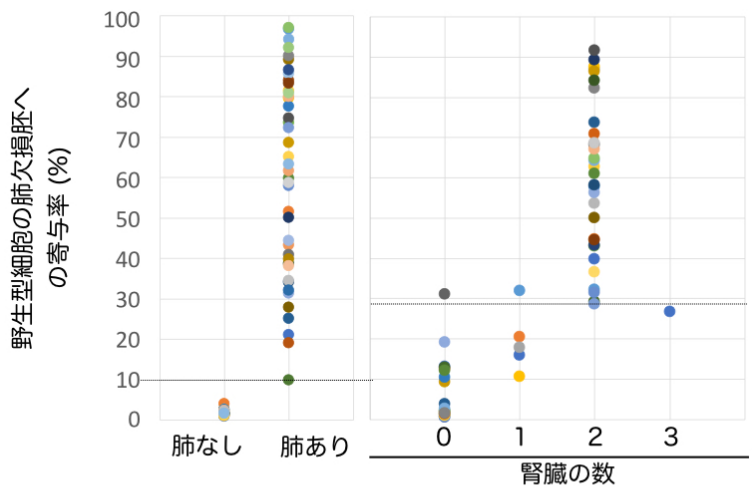


図2. 肺・腎臓の有無と野生型細胞の存在率

肺欠損ES細胞・腎臓欠損ES細胞を野生型胚へ注入して作成したキメラ動物において、野生型細胞の割合が10%を超えたとき、野生型細胞が胚を補完することができる。一方で、腎臓を作り出すためには30%以上の野生型細胞が必要であることがわかる。

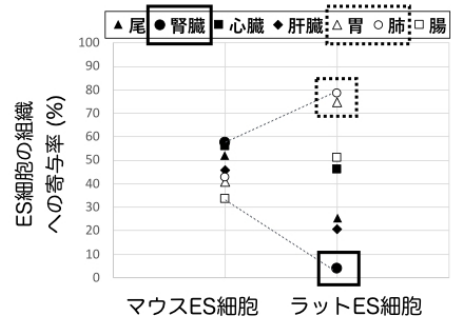


図3. マウス体内におけるマウスES細胞とラットES細胞の組織への寄与率

マウスES細胞は、マウス体内において、各組織への寄与率が比較的一定である。

ラットES細胞は、マウス体内において、腎臓、尾、肝臓へは寄与しづらく、肺、胃には寄与しやすい傾向がある。

最後に、ラット細胞は肺へと寄与しやすいことがわかり、さらに肺欠損モデルにおいて10%と比較的低い野生型細胞の寄与で肺を作り出すことができることが分かったため、4倍体胚補完法を用いて、樹立した肺欠損マウスモデルへ、ラットES細胞を注入し、ラットの肺をマウス体内で作成することを試みた。その結果、胎児期において、ほぼ100%ラット細胞由来の肺をマウス体内で作成することに成功した(図4)。

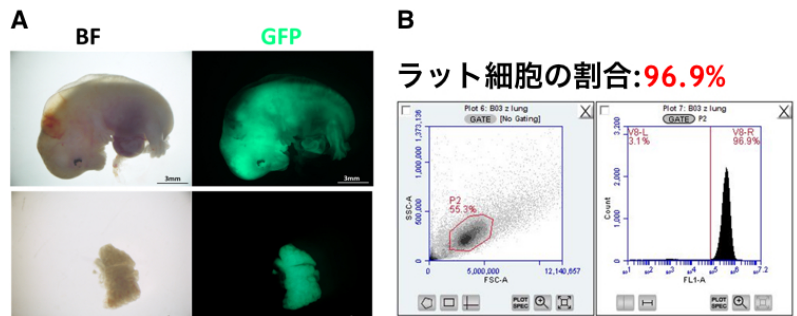


図4. 胚盤胞補完法によるラット細胞由来の肺の作出

A: 樹立した肺欠損モデルにおいてラットES細胞を注入したところ、異種由来の肺を確認することができた。

B: フローサイトメトリーにより得られた肺は96.9%がラット由来であることが確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 由利 俊祐、磯谷 綾子
2. 発表標題 胚盤胞補完法を利用した腎臓作出に必要な条件の探索
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 JONATHAN JUN-YONG LIM, Shunsuke Yuri, Ayako Isotani
2. 発表標題 Genration of organ-deficient mouse model through CRISPR/Cas9 system
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 山本奈美, 由利俊祐, 磯谷綾子
2. 発表標題 四倍体胚補完法によるES細胞由来マウス作製条件の検討
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 JONATHAN JUN-YONG LIM, Shunsuke Yuri, Ayako Isotani
2. 発表標題 Investigation of CRISPR/Cas9 system to obtain organ deficient mouse model
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸本裕樹, 由利俊祐, 磯谷綾子
2. 発表標題 Ets2変異マウスの遺伝型と表現型への影響
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸本 裕樹, 由利 俊祐, 磯谷 綾子
2. 発表標題 新たに樹立したEts2変異マウスの表現型の報告
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口 瞬, 由利 俊祐, 磯谷 綾子
2. 発表標題 マウスとラットの異種間キメラ動物の精巢内における密着結合の形成
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	磯谷 綾子 (Isotani Ayako) (20444523)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授 (14603)	

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
---------	---------