

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14602

研究課題名(和文)異種母体を利用した個体作出システムの開発

研究課題名(英文)A fetal development using an interspecies surrogate mother

研究代表者

西村 俊哉(Nishimura, Toshiya)

生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・特別訪問研究員

研究者番号：00803842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、異種母体を利用した個体作出システムの構築を目的とし研究を進め、その結果、Dach1、Dach2遺伝子欠損を持った遺伝子改変ラットを2系統作製した。また、子宮発生に関して本遺伝子がマウスとラットで異なることを明らかにした。さらに、キメラ動物体内でドナーキメリズムを飛躍的に上昇させる手法(細胞競合ニッチ法)を開発し、これを著名な国際雑誌に投稿した。さらに、本結果を基に米国にて特許申請を行い、現在、国際特許を申請中である。また、本研究にて得られた成果を3つの国際学会、一つの国内学会、1つの招待講演にて発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで作製出来ていなかったDach1,2遺伝子変異を有した遺伝子改変ラットを作製しその機能を明らかにするものであり、その学術的意義は高い。また、本研究にて開発した手法は、世界的に研究が進められてきた動物体内でドナー幹細胞由来の臓器を作製する研究において、これまで問題とされていた低いドナーキメリズムの問題を解決するものであり、本分野を飛躍的に進歩させる可能性を有している。さらに、本成果を通してヒト幹細胞由来臓器を作製することができれば、移植治療における慢性的な臓器不足を解決する画期的な手法となり得ることからその社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：In this study, we proceeded with the research for the purpose of establishing a novel fetal development system using an interspecies surrogate mother, and as a result, we succeeded to produce two strains of genetically modified rats with Dach1 and Dach2 gene defects, respectively. We also revealed that the functions of these genes differs between mice and rats in terms of uterine development. Furthermore, we developed a method (termed cell competition niche method) that dramatically increases donor chimerism in chimeric animals and posted it in a well-known international journal. Furthermore, based on this result, a patent application was filed in the United States, and an international patent is currently being applied for. In addition, the results obtained in this research were presented at three international conferences, one domestic conference, and one invited lecture.

研究分野：幹細胞発生学

キーワード：幹細胞 発生学 臓器再生 獣医 イヌ

1. 研究開始当初の背景

これまで、マウスやラットなどの実験動物を用いて様々な胚発生研究が行われ、近年では、ヒトーブタなどの大型異種動物間でのキメラ動物胚の作製報告もなされている。しかしながら、マウスーラット間においてさえ、異種胚を移植することにより、産子を得ることに成功しておらず、この原因として子宮と移植胚の動物種が異なることによる胎盤形成不全が指摘されている。胎盤は胚と子宮が複雑に絡みあうことで形成され、胎盤構造は種特異的であることが知られている。このため、異種胚を移植し産子を得るには、子宮と移植胚を同種のものにする必要があると考えられる。胚盤胞補完法は、特定の臓器を作る能力を欠損している胚盤胞に多能性幹細胞を注入することで、欠損臓器を補完する技術であり、動物体内で異種由来の臓器を作製することが可能である。本技術を用いて、異種母体内で移植胚と同種の子宮を作製することができれば、異種母体を利用した個体作出システムの構築に大きく近づくと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、異種母体を利用した個体作出システムの構築を目的とし、胚盤胞補完法を用いて子宮欠損ラット体内にマウス幹細胞由来子宮を作製し、そこにマウス胚を移植する。

3. 研究の方法

本研究では、平滑筋、間質細胞、および上皮細胞にて構成された複雑な組織である子宮を、ホスト胚にて如何に欠損させるかが重要な点であった。研究遂行者らは本研究遂行にあたり、マウスにて子宮欠損を誘導すると報告されている Dach1,2 遺伝子に着目し、本遺伝子をノックアウトすることで子宮欠損ラット胚を作製し、本胚にマウス多能性幹細胞を移植することで、マウス子宮のラット体内での作製を試みた。

4. 研究成果

Dach1,2 遺伝子を標的としたラット子宮欠損モデルの開発

研究遂行者らは、これまでマウスにて子宮欠損を誘導すると報告された Dach1,2 遺伝子に着目し、本遺伝子に変異を誘導することでラットにおいても子宮欠損が誘導できるかを検討した。CRISPR/Cas9 システムとエレクトロポレーション法を用いてラット受精卵に遺伝子変異を導入したところ、Dach1 および Dach2 にフレームシフト遺伝子変異が入った遺伝子改変ラットをそれぞれ作製した(計2系統)。本遺伝子改変ラットの表現型は、Dach1 遺伝子欠損ラットはホモ欠損(-/-)にて新生児致死であり、Dach2 遺伝子欠損ラットはホモ欠損で個体を維持することができたが、成熟に従い行動異常(軽度の旋回運動)を示した。次に、本遺伝子改変ラット同士を交配することで、マウスにて子宮欠損が報告されている Dach1 +/-, Dach2 -/- 遺伝子変異をもった遺伝子改変ラットを作製し、本ラット子宮の表現型を解析したところ、子宮欠損は確認されなかった。興味深いこと、本遺伝子改変ラットは行動異常(重度の旋回運動)を示した。これらの結果より、子宮発生において Dach1,2 遺伝子はその機能がマウスとラットで異なることが明らかとなった。また、旋回運動等の行動異常はラット特有であったことから、神経機能に関するこれらの遺伝子の機能もラットとマウスで異なることが示唆された。

異種間キメラにおいてドナーキメリズムを上昇させる手法の開発

キメラ動物体内にてドナー細胞由来の臓器を作製するためには、ある程度のドナーキメリズムが必要であるが、これまでの研究から異種間キメラにおけるドナー細胞の寄与率が低いことが指摘されており、本問題が子宮を含めたドナー細胞由来臓器の作製を困難としていた。研究遂行者らは、細胞増殖に重要な役割を有するインスリン様成長因子1受容体(Igf1r)に着目し、本遺伝子をホスト胚にて欠損させることで、異種キメラ体内でドナーキメリズムを上昇するかを検討した。CRISPR/Cas9 システムとエレクトロポレーション法を用いてマウス受精卵に Igf1r 遺伝子欠損を導入し、本遺伝子欠損胚にマウス多能性幹細胞(ドナー)を移植後、本キメラ胚を偽妊娠ラット子宮に移植し、胚発生中後期における各発生段階にてドナーキメリズムを解析した。その結果、胚発生 11.5 日(E11.5)から Igf1r 欠損キメラ胚にてドナーキメリズムの上昇が確認された。また、ドナーキメリズムは胚発生に従って上昇し、成体キメラにてホスト肺、脳、腎臓がほとんどドナー細胞で構成されていることが確認された。また、同様の手法を用いてラット iPS 細胞を Igf1r 欠損マウス胚に移植し、ドナーキメリズムの上昇を調べたところ、新生児期において腎臓を含めたいくつかの臓器においてドナーキメリズムの上昇が確認された。これらの結果より、Igf1r を利用した本手法は、異種間キメラにおけるドナーキメリズムを上昇させることが分かった。また、成体にて上昇したキメリズムがホスト臓器ニッチを乗っ取り、ドナー細胞由来の臓器を誘導することが分かった。本技術は腎臓において顕著にドナーキメリズムを上昇させるが、子宮と腎臓はその発生源および様式が類似していることから、本手法を用いることで、子宮においても同様にドナーキメリズムを上昇させ、ドナー由来の子宮を誘導できる可能性が示唆された。本研究内容は、著名な国際誌である『Cell Stem Cell』に投稿され、また3つ

の国際学会、1つの国内学会、1つの招待講演にて発表された。さらに、その新規性から米国での特許申請を行うとともに、現在、国際特許の申請を行っている。

本研究にて、新たに2系統の遺伝子改変ラットを作製するとともに、その一部表現型を明らかにした。また、これまで分野で問題となっていた低ドナーキメリズムを解決する手法を開発し、これを発表した。標的としていた遺伝子の欠損にて目的とした子宮欠損の表現型が得られなかったことから、本研究期間内にドナー細胞由来子宮の作製という研究目標は達成できなかったが、Igf1rを介した本技術は子宮への応用可能性を秘めていることから、将来的に本技術を子宮作製に応用することで本研究目標が達成できる可能性は高いのではないかと考えられる。また、Igf1rはほとんどの哺乳類にて保存された遺伝子であることから、本技術はヒトを含めた哺乳類全般に応用できる普遍性を有しており、ヒト幹細胞由来臓器の作製などへの応用が期待される

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishimura Toshiya, Suchy Fabian P., Bhadury Joydeep, Igarashi Kyomi J., Charlesworth Carsten T., Nakauchi Hiromitsu	4. 巻 28
2. 論文標題 Generation of Functional Organs Using a Cell-Competitive Niche in Intra- and Inter-species Rodent Chimeras	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 141 ~ 149.e3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stem.2020.11.019	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 Suchy Fabian P., Nishimura Toshiya, Wilkinson Adam C., Higuchi Maimi, Bhadury Joydeep, Nakauchi Hiromitsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Streamlined and quantitative detection of chimerism in mouse tissue using digital PCR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.11.04.368944	査読の有無 無
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 Tsukamoto Masaya, Nishimura Toshiya, Yodoe Kyohei, Kanegi Ryoji, Tsujimoto Yasunori, Alam Md Emtiaj, Kuramochi Mizuki, Kuwamura Mitsuru, Ohtaka Manami, Nishimura Ken, Nakanishi Mahito, Inaba Toshio, Sugiura Kikuya, Hatoya Shingo	4. 巻 27
2. 論文標題 Generation of Footprint-Free Canine Induced Pluripotent Stem Cells Using Auto-Erasable Sendai Virus Vector	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 1577 ~ 1586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/scd.2018.0084	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Nishimura T, Suchy PF, Bhadury J, Kyomi JI, Charlesworth TC, Nakauchi H
2. 発表標題 IGF1R DELETION IN A HOST EMBRYO AUGMENTS DONOR CONTRIBUTION TO HOST TISSUES IN BOTH INTRA- AND INTER-RODENT CHIMERAS
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 2021 Annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishimura T, Suchy PF, Bhadury J, Kyomi JI, Charlesworth TC, Nakauchi H
2. 発表標題 DONOR CELLS PREDOMINANTLY PROLIFERATE IN IGF1R KNOCKOUT RODENT EMBRYOS
3. 学会等名 ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村俊哉
2. 発表標題 キメラ技術による腎臓再生の最前線
3. 学会等名 第164回日本獣医学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村 俊哉, Fabian Suchy, Joydeep Bhadury, 五十嵐経美, Carsten Charlesworth, 中内啓光
2. 発表標題 細胞競合ニッチ法を用いた幹細胞由臓器の誘導
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Nishimura, J. Bhadury, F. P. Suchy, C. Charlesworth, H. Nakauchi
2. 発表標題 Blastocyst Injection Rescues The postnatal Growth Retardation In Chimeric Mouse
3. 学会等名 ASCB EMBO 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 PRODUCTION OF HUMAN CELLS, TISSUES, AND ORGANS IN A GROWTH FACTOR RECEPTOR-DEFICIENT ANIMAL HOST	発明者 Toshiya Nishimura, 他2名	権利者 Stanford University, 東 京大学
産業財産権の種類、番号 特許、No 63/008,358	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 Production of Human Cells, Tissues, and Organs in a Growth Factor Receptor deficient Animal Host	発明者 Toshiya Nishimura, 他2名	権利者 Stanford University, 東 京大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/US2021/026380	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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