

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号： 12601
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23700507
 研究課題名（和文） 異種間4倍体補完法を利用した多能性幹細胞からの個体作製法の確立
 研究課題名（英文） Generate pluripotent stem cell derived animals by using interspecific blastocyst complementation
 研究代表者 小林 俊寛 (Kobayashi Toshihiro)
 （東京大学 医科学研究所 客員研究員）
 研究者番号： 20587414

研究成果の概要（和文）：

本研究課題において、我々はマウスとラットという異なる種の間で、それぞれラット ES/iPS 細胞由来の細胞からなる胎児をマウス体内で、あるいはマウス ES/iPS 細胞由来の細胞からなる胎児をラット体内で、作製することに成功した。両者とも出産までには至らなかったが、このような異種の個体内で ES/iPS 細胞由来の個体を発生させる技術は、種の違いによりどのような発生の違いがあるかを解析するために利用可能なだけでなく、たとえば絶滅が危惧されている動物から iPS 細胞を樹立し、別の個体の体内で育て、生ませるといったような、種の保存にも用いることのできる技術への第一歩となりうると思われる。

研究成果の概要（英文）：

We succeeded to generate rat embryo in mouse and mouse embryo in rat by interspecific tetraploid complementation using each pluripotent stem cell. Both of them, each PSC-derived embryo cannot survive in a xenogenic environment over some periods. However, we prove that the early development of completely PSC-derived embryo can be followed up in xenogenic environment. The system described here not only provides a powerful experimental tool for understanding of xenogenic barrier in early embryonic development but also an initial step toward the generation of PSC-derived animal in xenogenic environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：幹細胞生物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：多能性幹細胞、4倍体補完法、マウス、ラット、異種間キメラ

1. 研究開始当初の背景

受精後の胚盤胞から樹立される胚性幹細胞 (Embryonic Stem cell: ES 細胞) および、体細胞を特定の転写因子の導入により初期化して樹立される人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cell: iPS 細胞) をはじめとした多能性幹細胞は *in vitro* で無限の増殖能をもつだけでなく、胚発生に寄与しキメラを形成し、全身すべての細胞に分化するこ

とができる。特にマウスの ES 細胞は、相同遺伝子組み換え技術との組み合わせにより、遺伝子改変動物作製において欠かす事のない道具として用いられてきた。マウス同様に汎用な実験動物であるラットでは、長らくキメラ形成能を持った ES 細胞の樹立に成功していなかったが、近年、生殖細胞への寄与も可能な ES 細胞の樹立が報告され (Buehr ら, Cell (2008))、これを用いたトラ

ンスジェニックラットおよびノックアウトラットの作製も可能になった (Hirabayashiら, *Mol. Reprod Dev* (2010), Tongら, *Nature* (2010))。

研究開始当初、申請者らは、これらの多能性幹細胞が同種間のキメラ形成だけでなく、異種間のキメラ形成も可能であることを証明することに成功した。多能性幹細胞をEGFPなどの蛍光タンパク質で標識し、マウスの多能性幹細胞をラットの胚盤胞に注入しラットの子宮へ移植、もしくはラットの多能性幹細胞をマウスの胚に注入しマウスの子宮へ移植と、双方から異種間キメラ作製に向けたアプローチを試みたところ、それぞれから全身で多能性幹細胞に由来する蛍光タンパク質を発現した組織を持った生存可能なマウス-ラット異種間キメラを作製できることが明らかとなった。また生まれてきた個体のサイズはおおむね注入された胚盤胞および子宮の由来となる種に一致することが分かった。

この“多能性幹細胞の異種胚発生への寄与”という現象を利用し、多能性幹細胞由来の臓器を作出することを目的とし、膵臓を欠損する *Pdx1* ノックアウトマウスの胚盤胞にラットの多能性幹細胞を注入した。すると生まれてきた異種間キメラ個体は一様にEGFP 蛍光を示す完全にラット多能性幹細胞由来の膵臓を持っていた。膵臓は内分泌や外分泌組織の機能マーカーの発現が認められるだけでなく、糖負荷試験に対しても正常なグルコース応答性を示す機能的なものであることも証明された (Kobayashiら, *Cell* (2010))。さらに興味深いことに、マウスとラットは体重にして 10 倍程度の差があるにもかかわらず、マウス内にできたラットの膵臓はマウスのものと同様かむしろそれよりも小さくなる傾向が明らかとなり、臓器のサイズを胚盤法や子宮の環境が制御している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

異種間キメラの作製および異種個体内での臓器作製により新たな方法論を確立できたことから、単一の臓器でなく個体そのものを異種の環境を利用して作製する、および個体の大きさが、胚になる細胞の持つ内在的な要因、あるいは母体やその子宮・胎盤といった環境のどちらによって決定されているかといった生物学的な疑問を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

上にあげた疑問に対し、多能性幹細胞と 4 倍体胚補完法を用いることで、この課題に取り組もうと考えた。2 細胞期胚の電氣的融合により作製される 4 倍体胚はその後の発生

において胚体内への発生が認められない。そのためこの 4 倍体の胚盤胞に多能性幹細胞を注入することで完全に多能性幹細胞由来の個体を作製する方法が 4 倍体補完法として知られている (Nagyら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993))。そこでマウスの多能性幹細胞をラットの 4 倍体胚、あるいは逆にラットの多能性幹細胞をマウスの 4 倍体胚に注入することで、注入した異種の多能性幹細胞由来の個体が作製できないかと考えた。

細胞は同種間で 4 倍体補完法が適用可能なマウスおよびラットの多能性幹細胞を異種間 4 倍体補完法に用いた。マウスの多能性幹細胞であればラットの、ラットの多能性幹細胞であればマウスの 4 倍体胚にそれぞれ注入し、胚移植後、発生段階を追って開腹し、着床後どの段階まで発生可能かを判断した。得られた個体もしくは胎児について、正常胚発生を経て得られたものと大きさ、形態的な特徴を比較し、環境すなわち胎盤・子宮の由来、もしくは注入した多能性幹細胞の由来のどちらと近似しているかを明らかにした。

4. 研究成果

本研究開始初年度は (1) 4 倍体補完法の確立と多能性幹細胞株の樹立 (2) 多能性幹細胞に由来する胚の異種環境での発生能評価の 2 点を主に行った。

研究計画開始以前の予備データから、マウス、ラットそれぞれに由来する多能性幹細胞を互いの胚盤胞に注入して作製する異種間キメラにおいても、異種の多能性幹細胞の寄与が高すぎると発生の停止を示すという結果が得られており、完全に異種の細胞だけという 4 倍体補完の状況ではその発生の困難が予想された。実際に研究開始当初は、胎児がなかなか得られなかったが、生殖系列へも寄与可能な質のよい多能性幹細胞を用いることで、両者において完全に多能性幹細胞由来の胎児を得ることが可能になった。

また申請当時はラットの 4 倍体補完法の報告は少なく、実験系として確立されたとは言いがたい状況であったが、生理学研究所の平林真澄准教授との共同研究により内部細胞塊であれば 4 倍体補完法で正常なラット個体を得ることが可能になり (Hirabayashi et al., *Mol. Reprod. Dev.* in press (2012))、実験系として確立できたことも上記の結果を得る上で非常に重要であった。さらに発生能の評価として、胚移植後、発生段階を追って解析することで、各段階でどの程度の発生率を示すかが明らかになり、その結果、少なくともラット多能性幹細胞由来の胎児は胎生 9.5 日目程度、マウス多能性幹細胞由来の胎児は胎生 14.5 日目程度までは異種の環境下においても発生可能であることが明らか

になった。フローサイトメーターや PCR を用いた解析により、それらの胚が完全に注入された多能性幹細胞由来の個体であることが明らかにされ、また組織学的な解析において形態的にも 3 胚葉由来の組織を有したほぼ正常な胚であることが判った。

次に次年度では (1) 個体サイズや組織の正常性の評価および (2) 胚発生の停止が認められた場合、その原因を明らかにするという目標を達成すべく研究を進めてきた。

(1) について得られた胚の正常性を判断するために形態的特徴や免疫染色法を用いた各組織の機能マーカーの発現を見たところ、前年度に見られたように E9.5 のラット iPS 細胞由来の胚では正常胚とほぼ変わらない結果が得られた。一方で、発生を継時的に追ったところ、E10.5 以降では発生時の退行が認められ、その後、出生可能な胚は得られなかった。また逆の実験、すなわちマウス iPS 細胞をラットの 4 倍体胚に注入するという実験においても、同様に発生中期 (E14.5) 程度での発生の停止が認められた。

そこで (2) として掲げた原因究明のため、これらの原因のひとつとして多能性幹細胞の質について検証した。ラットでは生殖系列にも効率に寄与が可能で、新規に同定したラットの Rosa26 遺伝子座の制御化で安定して tdTomato を発現する ES 細胞を、またマウスについても、129sv 系統と C57BL6 系統の F1 由来の同種間で 4 倍体補完由来の個体を生み出せる質の高い ES 細胞をそれぞれ用いた。しかしながら結果は同様で、いずれも胚発生の中期での発生停止が見られた。特にラットにおいては同種間でも 4 倍体補完により個体作製に至らなかったため、今まで樹立してきたラット ES 細胞の遺伝子プロファイルをマイクロアレイ法により解析したが、今のところ株間で機能と関連する遺伝子の同定には至っておらず、今後さらなる解析が必要である。

以上より、マウス-ラットを用いた異種間 4 倍体補完法により多能性幹細胞を胚発生中期まで発生させることに成功したが、一方で生存可能な個体作出には至らず、今後さらなる研究が必要であると思われる。しかしながら、異種間 4 倍体補完法のシステム自体は初期胚発生における異種間の障壁を研究するツールとしてのみではなく、多能性幹細胞由来の個体を異種の環境下において作製するための一歩となると考えられる。

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 8 件)

1. Hamanaka S, Yamaguchi T, Kobayashi T,

Kato-Itoh M, Yamazaki S, Sato H, Umino A, Wakiyama Y, Arai M, Sanbo M, Hirabayashi M, Nakauchi H.

Generation of germline-competent rat induced pluripotent stem cells.

PLoS One. 2011;6(7):e22008. 査読あり

2. Nakauchi H. and Kobayashi T.

From cell therapy to organ regeneration therapy: generation of functional organs from pluripotent stem cells

Nihon Rinsho. 2011 Dec;69(12):2148-55.

査読なし

3. Hirabayashi M, Tamura C, Sanbo M, Goto T, Kato-Itoh M, Kobayashi T, Nakauchi H, Hochi S.

Ability of tetraploid rat blastocysts to support fetal development after complementation with embryonic stem cells.

Mol Reprod Dev. 2012 Jun;79(6):402-12. 査読あり

4. Usui J*, Kobayashi T*, Yamaguchi T, Knisely AS, Nishinakamura R, Nakauchi H. Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation.

Am J Pathol. 2012 Jun;180(6):2417-26.

*equally contributed 査読あり

5. Kobayashi T, Kato-Itoh M, Yamaguchi T, Tamura C, Sanbo M, Hirabayashi M, Nakauchi H.

Identification of rat Rosa26 locus enables generation of knock-in rat lines ubiquitously expressing tdTomato.

Stem Cells Dev. 2012 Nov 1;21(16):2981-6.

査読あり

6. Yamaguchi T, Hamanaka S, Kamiya A, Okabe M, Kawarai M, Wakiyama Y, Umino A, Hayama T, Sato H, Lee YS, Kato-Itoh M, Masaki H, Kobayashi T, Yamazaki S, Nakauchi H.

Development of an all-in-one inducible lentiviral vector for gene specific analysis of reprogramming.

PLoS One. 2012;7(7):e41007. 査読あり

7. Hirabayashi M, Tamura C, Sanbo M, Kato-Itoh M, Kobayashi T, Nakauchi H, Hochi S.

A retrospective analysis of germline competence in rat embryonic stem cell lines.

Transgenic Res. 2013 Apr;22(2):411-6. 査

読あり

8. Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Nagaya M, Kobayashi T, Yamaguchi T, Sumazaki R, Herzenberg LA, Nakauchi H.

Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Mar 19;110(12):4557-62. 査読あり

〔学会発表〕(計8件)

1. 小林俊寛, 中内啓光

第54回 日本糖尿病学会総会

2011年5月21日

Generation of Rat Pancreas in Mouse via Interspecific Blastocyst Complementation Using Pluripotent Stem Cells

2. 小林俊寛, 中内啓光

第58回 日本実験動物学会総会

2011年5月27日

マウス-ラット異種間キメラの作製と再生医療への応用

3. Kobayashi, Toshihiro, Kato-Itoh, Megumi, Yamaguchi, Tomoyuki, Hamanaka, Sanae, Hirabayashi, Masumi, Nakauchi, Hiromitsu

9th International Society of Stem Cell Research (カナダ・トロント)

2011年6月17日

GENERATION OF RAT EMBRYO IN MOUSE BY TETRAPLOID COMPLEMENTATION USING PLURIPOTENT STEM CELLS

4. 小林俊寛

Liver 2011 第7回 肝免疫・ウイルス・フロンティア

2011年7月9日

マウス体内にラット iPS 細胞由来の膵臓を作製

5. 小林俊寛

第1回細胞再生研究会プログラム

2011年7月31日

iPS 細胞由来の臓器再生を目指して -マウス体内でラットの膵臓作製-

6. 小林俊寛

Advans 研究会 2011

2011年12月16日

ES/iPS 細胞を用いた発生工学と臓器再生への応用

7. Toshihiro Kobayashi, Megumi Kato-Itoh, Tomoyuki Yamaguchi, Chihiro Tamura, Makoto Sanbo, Masumi Hirabayashi, and Hiromitsu Nakauchi

10th International Society of Stem Cell Research (横浜)

2012年6月15日

GENERATION OF ROSA26-TDTOMATO KNOCK-IN RATS VIA GENE TARGETING OF PLURIPOTENT STEM CELLS

8. 小林俊寛, 加藤-伊藤 めぐみ, 山口 智之, 田村 千尋, 三宝 誠, 平林 真澄, 中内 啓光

第59回 日本実験動物学会総会

2012年5月26日

ラット Rosa26 遺伝子座の同定と全身性に tdTomato 遺伝子を発現するノックインラットの作製

〔図書〕(計3件)

1. 小林俊寛, 中内 啓光

Medical Science Digest 2011年5月号 P2-4
多能性幹細胞を用いてマウスの体内にラットの膵臓を形成させる

Generation of Rat Pancreas in Mouse

2. 小林俊寛, 中内 啓光

生物の科学 遺伝 2011年5月号 P8-15

マウス生体内にラットの膵臓を作製

3. 小林俊寛, 中内 啓光

細胞工学 vol.31 No.3 2012 P302-307

異種間キメラ作製技術と臓器再生への応用

6. 研究組織

(1) 研究代表者 小林 俊寛 (Kobayashi Toshihiro)

東京大学 医科学研究所 客員研究員

研究者番号: 20587414