

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460358

研究課題名(和文)異種胚盤胞補完法を利用した臓器サイズ決定機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms of organ size determination

研究代表者

山口 智之(Yamaguchi, Tomoyuki)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：80392158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：個体やその臓器のサイズが正常な発生過程でどのようなシステムで制御され決定されているか、具体的には、内因性なのか外因性なのか、どのようなシグナルによって制御されているかという疑問を、胚盤胞補完法(Blastocyst complementation)による異種間での臓器再生手法を用いて検証した。その結果、ラット体内に作製したマウス膵臓のサイズはラットの膵臓と同等のサイズ(マウスの膵臓の約10倍の大きさ)であったことから、臓器サイズ決定には外来刺激も重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the mechanisms of determination of the size of body or the organ, - specifically, whether that is controlled by intrinsic or extrinsic cues, we performed interspecies blastocyst complementation. As a result, the size of mouse pancreas generated in rat was rat size (about ten times larger than mouse pancreas). This result indicate that the extrinsic signal as well as intrinsic signal is important for the organ size determination.

研究分野：再生医学

キーワード：臓器サイズ 胚盤胞補完法 異種動物

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は発生の過程で活発な増殖、分化、細胞死を繰り返し、個体、臓器を形作っていく。成体になるとそれまでの活発な細胞増殖は抑えられ、組織の障害やターンオーバーのときにのみ、組織特異的前駆細胞が分化、増殖を行う。これらの生命現象における細胞分裂、分化、アポトーシスなどの個々の現象の詳細は非常に良く研究されているが、それらの現象がどのように連携し個体や臓器のサイズの決定をしているかは、今だ不明な点が多い。

Hippo シグナル経路、近隣の細胞、ECM や周囲の体液からの機械的な刺激などが重要であるとの報告があるが、生理的条件下でのメカニズムの詳細は不明な点が多い。また、発生過程における臓器サイズの決定が外部からの刺激によるものか、内因的なものなのかは解明されていない。

## 2. 研究の目的

臓器欠損動物の胚盤胞に異種の多能性幹細胞 (ES 細胞、iPS 細胞) を注入し異種キメラ動物を作出する手法である異種胚盤胞補完法を応用し、ラットの体内にマウスの膵臓を作製し、生理的条件下における臓器サイズ決定機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) 膵臓欠損ラットの作成

ラット *Pdx1* に対する TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) を作成し、ラット受精卵に注入することで、膵臓欠損ラットを作成した。このとき、酵素エキソヌクレアーゼ (*Exo1*) を同時に注入し、TALEN の効果を高めた。 *Pdx1*<sup>-/-</sup> ラットが膵臓欠損の表現形を示すかどうか、解剖学的に検証した。

### 2) 異種胚盤胞補完法による膵臓の再生および再生膵臓のサイズの確認

膵臓欠損 (*Pdx1*<sup>-/-</sup>) マウスの胚盤胞にラット ES 細胞を注入、または、膵臓欠損ラット (*Pdx1*<sup>-/-</sup>) ラットの胚盤胞にマウス ES 細胞を注入し、マウス体内にラットの膵臓、ラット体内にマウスの膵臓を再生させ、その機能が正常であるかどうかを耐糖能テストより確認した。 また、そのサイズを正常マウス、ラットと比較した。

## 4. 研究成果

1) ゲノム編集を利用してラット *Pdx1* コーディング領域に変異を導入する為に、TAL effector nuclease (TALEN) を *Pdx1* の開始コドンより 3bp および 35bp 下流に設計し、TALEN の mRNA とラット *Exo1* の mRNA を同時にラット受精卵の前核に注入し変異ラットを作製した。その結果、産まれた産仔のうち TALEN の濃度が 3ng/ul でインジェクションした群では 4 匹 (5%)、10ng/ul でインジェクションした群では 3 匹 (9%) のヘテロ変異ラット (*Pdx1*<sup>+/<sup>mu</sup></sup>) が得られた。さらに、ヘテロ変異ラット同士を交配したところ、メンデルの法則に従ってホモ変異ラット (*Pdx1*<sup>mu/mu</sup>) が産まれ、これらは *Pdx1*<sup>-/-</sup> マウスの表現型と同じ完全に膵臓が無い表現型を示し、生後 2 日から 3 日で死亡した。これらのデータから *Pdx1* がラットの膵臓発生において必須の遺伝子であることが明らかとなった (図 1)。

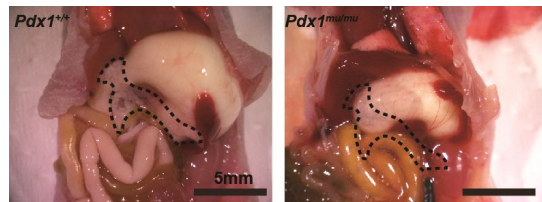


図 1. TALEN を利用して作製した *Pdx1*<sup>mu/mu</sup> ラット新生児

左: *Pdx1*<sup>+/<sup>mu</sup></sup> ラット、右: *Pdx1*<sup>mu/mu</sup> ラット

2) 次に異種胚盤胞補完法により *Pdx1*<sup>mu/mu</sup> ラット体内にマウス多能性幹細胞由来の膵臓を作製することができるのか、また、その機能やサイズを確かめる為に、*Pdx1*<sup>+/<sup>mu</sup></sup> ラット同士を交配し得られた胚盤胞に EGFP ラベルされた正常マウス多能性幹細胞 (iPS 細胞又は、ES 細胞) を注入し、異種キメラを作製したところ、iPS 細胞を注入した群では 10%、ES 細胞を注入した群では約 20% の確率で *Pdx1*<sup>mu/mu</sup> キメララットが得られた。

これらの異種キメラにおいて耐糖能を測定したところ、糖負荷直後は、*Pdx1*<sup>mu/mu</sup> キメララットは *Pdx1*<sup>+/<sup>mu</sup></sup>、*Pdx1*<sup>+/<sup>+</sup></sup> キメララットおよび野生型 Wistar ラットと比較して平常血糖値が高く、糖負荷後の回復も遅い傾向が観られたが、時間の経過とともに *Pdx1*<sup>mu/mu</sup> キメララットの血糖値も緩やかに正常範囲内になることが分かった (図 2)。

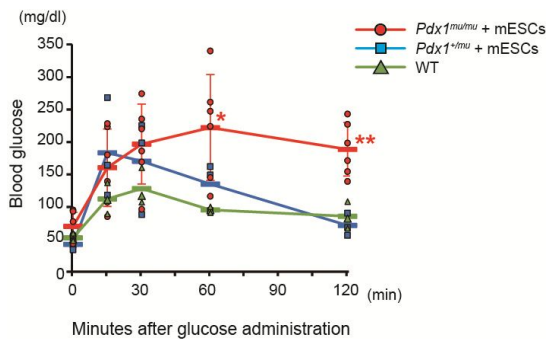


図 2、マウス多能性幹細胞由来膵臓を持つ *Pdx1<sup>mut/mut</sup>* + mESCs キメラの耐糖能試験

開腹し、注入したマウス多能性幹細胞の膵臓への寄与を調べた結果、*Pdx1<sup>mut/mut</sup>* キメララットでは膵臓全体が一様に EGFP の蛍光を発していることが確認できた。さらに、膵臓の免疫組織染色および画像解析の結果、内分泌組織、外分泌組織および導管組織は完全に注入したマウス多能性幹細胞由来であることが分かった。そして、11 匹中 9 匹の *Pdx1<sup>mut/mut</sup>* キメララットの膵臓サイズは同週令の野生型マウスの膵臓と比較すると 10 倍程度大きく、同週令の野生型ラットの膵臓と同程度であることが確認できた。これらの結果から、マウス多能性幹細胞はラット体内でラットの正常な発生機構および臓器サイズ制御機構により機能的な膵臓を形成することが分かった。さらに、膵臓のサイズは内因性ではなく、外因性のシグナルによって決定するということが強く示唆された (図 2)。

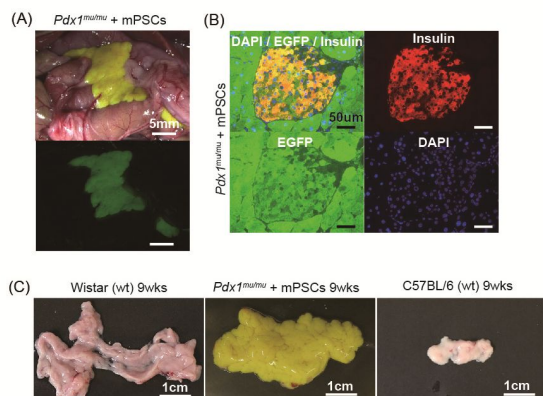


図 2、ラット体内に作製したマウス多能性幹細胞由来膵臓

(A) *Pdx1<sup>mut/mut</sup>* キメラ体内のマウス ES 細胞由来膵臓 上：明視野、下：蛍光 (B) マウス ES 細胞由来膵臓の免疫染色 左上：EGFP、抗マウスインスリン抗体、DAPI 共染色 左下：EGFP 右上：抗マウスインスリン抗体染色

右下：DAPI (C) 膵臓サイズの比較 左：9 週令野生型ラット膵臓 中：9 週令 *Pdx1<sup>mut/mut</sup>* + マウス ES 細胞キメラ膵臓 右：9 週令野生型マウス膵臓

## 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 11 件)

1. Yamaguchi T, Sato H, Kato-Itoh M, Goto T, Hara H, Sanbo M, Mizuno N, Kobayashi T, Yanagida A, Umino A, Ota Y, Hamanaka S, Masaki H, Rashid ST, Hirabayashi M, Nakauchi H. Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. **Nature**. 2017 Feb 9;542(7640):191-196. doi: 10.1038/nature21070.
2. Masaki H, Kato-Itoh M, Takahashi Y, Umino A, Sato H, Ito K, Yanagida A, Nishimura T, Yamaguchi T, Hirabayashi M, Era T, Loh KM, Wu SM, Weissman IL, Nakauchi H. Inhibition of Apoptosis Overcomes Stage-Related Compatibility Barriers to Chimera Formation in Mouse Embryos. **Cell Stem Cell**. 2016 Nov 3;19(5):587-592. doi: 10.1016/j.stem.2016.10.013.
3. Hayama T, Yamaguchi T (Corresponding author), Kato-Itoh M, Ishii Y, Mizuno N, Umino A, Sato H, Sanbo M, Hamanaka S, Masaki H, Hirabayashi M, Nakauchi H. Practical selection methods for rat and mouse round spermatids without DNA staining by flow cytometric cell sorting. **Mol Reprod Dev**. 2016 Jun;83(6):488-96. doi: 10.1002/mrd.22644.
4. Otani S, Kakinuma S, Kamiya A, Goto F, Kaneko S, Miyoshi M, Tsunoda T, Asano Y, Kawai-Kitahata F, Nitta S, Nakata T, Okamoto R, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Asahina Y, Yamaguchi T, Koshikawa N, Seiki M, Nakauchi H, Watanabe M. Matrix metalloproteinase-14 mediates formation of bile ducts and hepatic maturation of fetal hepatic progenitor cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 2016 Jan 22;469(4):1062-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.105.
5. Lin HT, Masaki H, Yamaguchi T, Wada T, Yachie A, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Nakauchi H,

- Otsu M.  
An assessment of the effects of ectopic gp91phox expression in XCGD iPSC-derived neutrophils. **Mol Ther Methods Clin Dev.** 2015 Dec 9;2:15046. doi: 10.1038/mtm.2015.46.
6. Yanagida A, Mizuno N, Yamazaki Y, Kato-Itoh M, Umino A, Sato H, Ito K, Yamaguchi T, Nakauchi H, Kamiya A. Investigation of bipotent differentiation of hepatoblasts using inducible diphtheria toxin receptor-transgenic mice. **Hepatology Res.** 2016 Jul;46(8):816-28. doi: 10.1111/hepr.12622.
  7. Ando M, Nishimura T, Yamazaki S, Yamaguchi T, Kawana-Tachikawa A, Hayama T, Nakauchi Y, Ando J, Ota Y, Takahashi S, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Miles JJ, Burrows SR, Brenner MK, Nakauchi H. A Safeguard System for Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Rejuvenated T Cell Therapy. **Stem Cell Reports.** 2015 Oct 13;5(4):597-608.
  8. Yanagida A, Chikada H, Ito K, Umino A, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Sato H, Kobayashi T, Yamaguchi T, Nakayama KI, Nakauchi H, Kamiya A. Liver maturation deficiency in p57<sup>Kip2</sup><sup>-/-</sup> mice occurs in a hepatocytic p57<sup>Kip2</sup> expression-independent manner. **Dev Biol.** 2015 Jul 9. pii: S0012-1606(15)30037-3.
  9. Masaki H, Kato-Itoh M, Umino A, Sato H, Hamanaka S, Kobayashi T, Yamaguchi T, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Nakauchi H. Interspecific in vitro assay for the chimera-forming ability of human pluripotent stem cells. **Development.** 2015 Sep 15;142(18):3222-30.
  10. Murayama H, Masaki H, Sato H, Hayama T, Yamaguchi T, Nakauchi H. Successful Reprogramming of Epiblast Stem Cells by Blocking Nuclear Localization of  $\beta$ -Catenin. **Stem Cell Reports.** 2015 Jan 13;4(1):103-13. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.12.003.
  11. Hayama T, Yamaguchi T (Equal first author, Corresponding author), Kato-Itoh M, Hamanaka S, Kawarai M, Sanbo M, Tamura C, Lee YS, Yanagida A, Murayama H, Mizuno N, Umino A, Sato H, Yamazaki S, Masaki H, Kobayashi T, Hirabayashi M, Nakauchi H. Generation of mouse functional oocytes in rat by xeno-ectopic transplantation of primordial germ cells. **Biol Reprod.** 2014 Oct;91(4):89.
- 〔学会発表〕(計 7件)
1. 山口智之、「動物個体内での膵臓の再生」第101回日本消化器病学会総会 シンポジウム、2015年4月、仙台
  2. 山口智之、「多能性幹細胞の異種環境における発生限界」第38回日本分子生物学会 ワークショップ、2015年12月、神戸
  3. 山口智之、「多能性幹細胞の異種環境における発生限界」第10回信州肝胆膵外科先端医療研究会 特別講演、2015年12月、松本
  4. 山口智之、「異種体内で作製した膵島の移植による長期血糖値制御」第15回日本再生医療学会総会 一般講演、2016年3月
  5. 山口智之、「異種動物体内での膵臓再生～次世代再生医療に向けて～」第59回日本糖尿病学会年次学術集会、シンポジウム、2016年5月、京都
  6. 山口智之、「異種環境内における多能性幹細胞の発生限界」第16回日本再生医療学会総会 一般講演、2017年3月、仙台
  7. 山口智之、「異種動物体内での膵臓再生と膵島移植」第44回膵・膵島移植研究会 シンポジウム、2017年3月、京都
- 〔図書〕(計 7件)
1. 山口智之、中内啓光 異種動物個体内での臓器再生 **最新医学** 第69巻3月増刊号、2014
  2. 山口智之 動物利用ヒト臓器再生 **医学のあゆみ**「創刊3000号記念・医学・医療のいまがわかるキーワード 2014」249巻5号
  3. Yamaguchi T (Corresponding author), Hamanaka S, Nakauchi H. The generation and maintenance of rat induced pluripotent stem cells. **Methods Mol Biol.** 2014;1210:143-50.
  4. 山口智之 動物の発生原理を利用した臓器再生技術 **三次元ティッシュエンジニアリング** 2015年2月
  5. Iriguchi S, Yamaguchi T (Corresponding author), Nakauchi H. Analysis of Physical Characteristic of Hematopoietic Cells. **Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems.** 2015; 79-90
  6. 山口智之 **組織工学ライブラリ、1 細胞の特性計測・操作と応用** 3.2節 閉鎖系高速細胞計測分離

2016年12月

7. 山口智之  
**臨床薬学テキストシリーズ** バイオ医薬品と再生医療  
10、将来展望  
2016年12月

〔産業財産権〕

出願状況（計 6件）

1. 名称：胚盤胞補完動物における出世後の炎症の発見とその治療  
発明者：中内啓光、山口智之、濱中早苗、佐藤秀征、正木英樹、水野直彬、渡部素生  
権利者：国立大学法人 東京大学  
種類：特許  
番号：特願 2017-011349  
出願年月日：2017年1月25日  
国内外の別：国内
2. 名称：生殖細胞欠損動物を用いる遺伝子改変動物の作製方法  
発明者：中内啓光、山口智之、正木英樹、加藤めぐみ、佐藤秀征  
権利者：国立大学法人 東京大学  
種類：特許  
番号：特願 2016-074996  
出願年月日：2016年4月4日  
国内外の別：国内
3. 名称：幹細胞を用いた異種間胚胞キメラ動物の作製法  
発明者：中内啓光、小林俊寛、平林真澄、加藤めぐみ、山口智之、濱中早苗  
権利者：国立大学法人 東京大学  
種類：特許  
番号：特願 2016-75971  
出願年月日：2016年4月5日  
国内外の別：国内
4. 名称：iPS細胞と BLASTOCYSTO COMPLEMENTATION を利用した臓器再生法  
発明者：中内啓光、小林俊寛、山口智之、濱中早苗  
権利者：国立大学法人 東京大学  
種類：特許  
番号：特願 2016-178359  
出願年月日：2016年9月13日  
国内外の別：国内
5. 名称：iPS細胞と BLASTOCYSTO COMPLEMENTATION を利用した臓器再生法  
発明者：中内啓光、小林俊寛、山口智之、濱中早苗  
権利者：国立大学法人 東京大学  
種類：特許  
番号：特願 2015-011189  
出願年月日：2015年1月23日  
国内外の別：国内
6. 名称：iPS細胞などの多能性細胞と

BLASTOCYSTO

COMPLEMENTATION を利用した臓器再生法  
発明者：中内啓光、小林俊寛、山口智之、濱中早苗  
権利者：国立大学法人 東京大学  
種類：特許  
番号：特願 2014-188113  
出願年月日：2014年9月16日  
国内外の別：国内

取得状況（計 2件）

1. 名称：iPS細胞と BLASTOCYSTO COMPLEMENTATION を利用した臓器再生法  
発明者：中内啓光、小林俊寛、山口智之、濱中早苗  
権利者：国立大学法人 東京大学  
種類：特許  
番号：5688800  
取得年月日：2015年3月25日  
国内外の別：国内
2. 名称：iPS細胞などの多能性細胞と BLASTOCYSTO COMPLEMENTATION を利用した臓器再生法  
発明者：中内啓光、小林俊寛、山口智之、濱中早苗  
権利者：国立大学法人 東京大学  
種類：特許  
番号：5686357  
取得年月日：2015年3月18日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等  
東京大学医科学研究所 幹細胞治療分野  
<http://stemcell-u-tokyo.org/sct/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 智之 (Tomoyuki Yamaguchi)  
東京大学医科学研究所 幹細胞治療分野  
特任准教授 (常勤)  
研究者番号：80392158