

平成 31 年 4 月 30 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18803

研究課題名(和文)マウス胎児への臓器幹細胞移植による臓器作出

研究課題名(英文)Production of blood or pancreas by allogenic transplantation into mouse fetuses

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・助教

研究者番号：60749167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では血液・臓器欠損マウス胎児に分化運命の決定している組織前駆細胞を局所的に移植する方法で異系統・異種体内での血液・臓器作出を行うことを目指した。マウス胎児への細胞移植はあまり例がなかったが、細胞移植したのちに、安定的に正常に発生させることに成功した。また、マウス異系統(GFP系統)由来の造血幹細胞を血液欠損マウス胎児に移植することで血液を補完することに成功した。さらに、膵臓欠損マウス胎児に異系統由来の膵前駆細胞を移植することで、一部ではあるが、GFP蛍光を示す移植細胞由来の膵臓細胞が宿主マウスに形成されていることが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。そこで、移植可能な臓器を患者自身の細胞から作るとは再生医療の重要な目標の1つである。その方法の一つとして、動物体内での臓器作出が有効なのではないかと考えられており、本研究で実施した動物胎児への臓器前駆細胞の移植は、いまずぐヒトの血液あるいは臓器作出を試みることができる戦略である。マウス胎児に細胞を移植することさえ可能かどうか不明であったが、異系統由来の血液あるいは膵臓細胞(一部ではあるが)の作出に成功しており、さらなる研究が期待される。莫大な医療ニーズに応える可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we try to produce blood or pancreas in animals (mice) by in utero transplantation. The progenitor cells of blood and pancreas were transplanted into mice fetuses. Although there is few reports about cell transplantation into mouse fetuses, live mouse were obtained successfully after in utero transplantation. Then, by allogenic transplantation of GFP positive hematopoietic cells, the blood of genetic blood deficient mice was complemented. Moreover, by allogenic transplantation of GFP positive fetal pancreatic cells, pancreatic cells in host mice shows GFP green florescence. Transplanted pancreatic progenitor cells would be differentiated into pancreatic cells in recipients.

研究分野：動物発生工学

キーワード：幹細胞移植 インユーテロ法

## 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。そこで、移植可能な臓器を患者自身の細胞から作ることは再生医療の重要な目標の1つである。研究代表者が参加している研究チームでは、臓器欠損動物の胚盤胞期胚に正常多能性幹細胞をインジェクションし臓器を作出する方法「胚盤胞補充法」で、キメラ動物体内に膵臓・腎臓などを生産することに成功している。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。また、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、倫理問題をクリアにしながらの実験が求められ、ヒトの臓器作出にすぐに応用できないのが現状である。そこで、本研究では、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する。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作出を試みるのが可能である。

しかしながら、この方法を遂行するためには、マウス胎仔に細胞を移植する技術が必要になる。現在までに、報告例は少ないものの、子宮を切開したのちでも、受精後 11 日目 (E11.5) 以降のマウス胎仔は発生可能であることが報告されている (Muneoka et al. 1986)。しかしながら、溶液などの注入例はあるが、マウス胎仔への幹細胞移植という研究はあまり例がないため、マウス胎仔への幹細胞移植法が可能にするとところから研究を開始した。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、これまでにメダカにおいて分化運命の決定している生殖幹細胞 (精原細胞) を免疫系が未熟なメダカ孵化仔魚へ移植することで、ドナー由来の精子・卵子を生産する精巣・卵巣を異系統体内に生産することに成功している。本研究では、哺乳類初期胚に多能性幹細胞をインジェクションする胚盤胞補充法に加えて、哺乳類においても分化運命の決定している前駆細胞を胎仔に移植することで動物体内での血液あるいは臓器を生産させることを試みる。

## 3. 研究の方法

動物体内において、移植前駆細胞由来の血液あるいは臓器を作出するには、遺伝的に血液あるいは臓器を欠損している動物を用意する必要がある。そこで、ゲノム編集技術を用いることで F0 世代でも血液あるいは臓器を欠損している動物を用意する。そして、造血あるいは膵臓形成が行われる発生初期のステージにおいて、それぞれの前駆細胞を移植することで、異系統由来の血液あるいは臓器を生産することが可能かどうか調べた。

## 4. 研究成果

本研究では、遺伝的に血液あるいは膵臓を欠損している動物を用意する必要がある。まずは、2 種の guide RNA を用いて CRISPR/Cas9 システムにより、F0 世代でもホモノックアウトマウスを用意できるようになった (関ら, 2017)。膵臓欠損させるには標的となる遺伝子として *pdx1* が報告されているが、血液に関しては報告されていない。そこで、造血幹細胞の分化に関与している遺伝子をノックアウトしたところ、血液が欠損している胎仔を用意することに成功した (その胎仔は出生直後に発生が停止した)。血液を補完するためにノックアウトする標的遺伝子を見つけることに成功した。このことより、ゲノム編集技術を用いることで、F0 世代でも容易に血液あるいは膵臓を欠損している動物を用意することが可能になった。

上述したように、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。そして、血液欠損マウスに異系統 (GFP 系統) 由来の造血幹細胞を移植したところ、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。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。

膵臓に関しても、ゲノム編集を施すことで用意した膵臓欠損マウス胎仔に異系統 (GFP) 由来の膵臓分散細胞を移植したところ、一部ではあるが GFP 蛍光を示す膵臓細胞の作出に成功した。

また、メダカにおける凍結生殖幹細胞 (精原細胞) 移植による個体作出については論文にまとめるとともに招待講演・プレスリリース等を行った。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

学術論文

(1) Seki S (Correspondence author), Kusano K, Lee S, Iwasaki Y, Yagisawa M, Ishida

M, Sasado T, Naruse K, Yoshizaki G, Production of the medaka derived from vitrified testicular cells by germ cell transplantation. *Scientific Reports* 査読有, 7;43185, 2017, doi:10.1038/srep43185.

- (2) **関 信輔**, 場崎 恵太, 小松 幸恵, 塚本 智史, 門脇 歩, 山口 智和, 幸丸 純貴, 福田 康義, 矢野 愛美, 小畑 孝弘, 小代田 宗一, 久場 敬司, 西島 和俊, 2種の guide RNAを同時に用いた CRISPR/Cas9 システムによる高率なノックアウトマウスの作出, 秋田医学, 査読有, 44(1), 37-43, 2017, doi/10.20569/00003346.
- (3) Jin B, **Seki S**, Paredes E, Qiu J, Shi Y, Zhang Z, Ma C, Jiang S, Li J, Yuan F, Wang S, Shao X, Mazur P, Intracellular ice formation in mouse zygotes and early morulae vs. cooling rates and temperature-experimental vs. theory *Cryobiology* 査読有, 73(2) 181-186, 2016, doi:10.1016/j.cryobiol.2016.07.014.
- (4) Lee S, **Seki S**, Katayama N, Yoshizaki G, Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish *Scientific Reports*, 査読有, 5: 16045 2015, doi:10.1038/srep16045.

#### 研究報告 1 件

- (5) **関 信輔**, Peter Mazur. マウス初期胚のガラス化保存における急速融解の重要性, **低温生物工学会誌**, 査読有, 62(2): 105-108, 2016.

#### 総説 2 件

- (6) **関 信輔**, 細胞内氷晶形成メカニズムの解明と細胞内氷晶形成回避における融解速度の重要性, **低温生物工学会誌**, *Cryobiology and Cryotechnology* 63(2): 77-84, 2017.
- (7) **関 信輔**, マウス卵子・初期胚の凍結保存における急速融解の重要性, **日本エンブリオロジスト学会雑誌**, *Journal of Clinical Embryologist* 17(2): 1-8, 2015.

〔学会発表〕(計 16 件)

#### 招待講演 6 件

- (1) **関 信輔**, 凍結保存技術における急速融解の重要性と絶滅危惧種の保全. 第 30 回 秋田応用生命科学研究会 講演会, **秋田応用生命科学研究会 講演要旨集**:2, 2017 (国内研究会特別講演)
- (2) **Seki S**, Yoshizaki G, Conservation of the medaka bio-resources by cryopreservation of germ cells. The 54<sup>th</sup> Annual meeting of the society for Cryobiology *Cryobiology* 67(3): 417, 2017 (国際学会 招待講演)
- (3) **関 信輔**, 細胞内氷晶形成メカニズムの解明と細胞内氷晶形成回避における融解速度の重要性, 第 62 回 低温生物工学会セミナー及び年会, 2017 (国内学会年会 受賞講演)
- (4) **Seki S**, How to preserve genetic resources when it is difficult to cryopreserve their embryos. **NIH workshop**, Cryopreservation of Drosophila Strains, 2016 (国際学会ワークショップ 招待講演)
- (5) **関 信輔**, 生殖幹細胞移植による凍結細胞由来のメダカ個体作出. 第 62 回 日本実験動物学会総会 **日本実験動物学会総会 講演要旨集**:101, 2015 (国内学会ワークショップ 招待講演)
- (6) **関 信輔**, 凍結保存技術の進歩、生存率の改善と絶滅危惧種の永久保存. 第 20 回 日本臨床エンブリオロジスト学会 **日本エンブリオロジスト学会雑誌** 16(2):64-64, 2015 (国内学会 招待講演)

#### 国際学会口頭発表 3 件

- (7) **Seki S**, Basaki K, Komatsu Y, Fukuda Y, Yano M, Obata T, Matsuda Y, Nishijima K, Vitrification of mouse zygotes; effect of rapid warming. The 53<sup>rd</sup> Annual meeting of the society for Cryobiology *Cryobiology* (Ottawa, Canada), 2016.
- (8) Edashige K, Iwahara Y, Nariai S, Nishiya Y, Kitayama M, Niimi S, **Seki S**, Koshimoto C, Matsukawa K, Kasai M, Cold-sensitive ion channels are involved in chilling injury of pig oocytes. The 53<sup>rd</sup> Annual meeting of the society for Cryobiology *Cryobiology* (Ottawa, Canada), 2016.
- (9) **Seki S**, Kusano K, Lee S, Iwasaki Y, Ishida M, Sasado T, Naruse K, Yoshizaki G, Production of medaka individuals derived from cryopreserved spermatogonia by allogenic transplantation. The allied genetics conference, 12<sup>th</sup> international conference on zebrafish development and genetics (Orlando, US), 2016.

国内学会発表 口頭発表 3 件

- (10) **関 信輔**, 笹土隆雄, 福田康義, 矢野愛美, 小畑孝弘, 松尾悠平, 場崎恵太, 小松幸恵, 松田幸久, 成瀬 清, 西島和俊, 超低温保存精原細胞由来のメダカ近交系および野生地域集団の復元, Cryopreservation Conference 2017, つくば市, 口頭発表, 2017.
- (11) **関 信輔**, Peter Mazur, 凍結保存における急速融解の重要性, 第 61 回 低温生物工学会, 第 61 回 低温生物工学会セミナー及び年会講演要旨集: p28, 口頭発表, 2016.
- (12) 笹土隆雄, **関 信輔**, 柏木啓子, 花田秀樹, 鈴木賢一, 山本卓, 成瀬清, 柏木昭彦. 「両生類の遺伝資源を保全するための統合的な技術開発, Cryopreservation Conference 2016, 岡崎市, 口頭発表, 2016.

国内学会 ポスター発表 4 件

- (13) **関 信輔**, 柏木啓子, 花田秀樹, 笹土隆雄, 成瀬清, 柏木昭彦, 両生類における生殖幹細胞凍結保存法の開発と代理親への移植法, 第 64 回 日本実験動物学会総会, 講演要旨集: p225, ポスター発表, 2017
- (14) **関 信輔**, 場崎恵太, 小松幸恵, 福田康義, 矢野愛美, 小畑孝弘, 西島和俊, 急速融解によるマウス 1 細胞期胚ガラス化保存法の開発, Cryopreservation Conference 2016, 岡崎市, ポスター発表, 2016.
- (15) 笹土隆雄, **関 信輔**, 柏木啓子, 花田秀樹, 鈴木賢一, 山本卓, 成瀬清, 柏木昭彦. 「両生類の遺伝資源を保全するための統合的な技術開発, Cryopreservation Conference 2016, 岡崎市, ポスター発表, 2016.
- (16) **関 信輔**, 山口智之, 中内啓光, マウス胎児への臍前駆細胞移植法の開発, 第 63 回 日本実験動物学会総会 川崎市, ポスター発表, 2016.

〔図書〕(計 1 件)

- (1) **Seki S**, Importance of cooling vs. warming rates using vitrification *Vitrification in Assisted Reproduction From Basic Science to Clinical Application* (Taylor & Francis Books Ltd.) pp. 43-45, 2015 (分担執筆)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

学会賞受賞 1 件

- (1) 低温生物工学会 奨励賞, 細胞内氷晶形成メカニズムの解明と細胞内氷晶形成回避における融解速度の重要性, 平成 28 年度第 7 回 低温生物工学会 奨励賞 (2016)  
<http://square.umin.ac.jp/jsccl/about/awardL.html>

プレスリリース・新聞などにおける研究紹介記事 20 件

- (1) 秋田大学プレスリリース, <http://www.akita-u.ac.jp/honbu/event/item.cgi?pro3&562>  
「凍結保存した精巣組織の細胞から絶滅危惧種であるメダカを再生することに成功」
- (2) 基礎生物学研究所プレスリリース, <http://www.nibb.ac.jp/press/2017/03/28.html>
- (3) 秋田魁新報掲載, 「凍結細胞からメダカ誕生」, 27 面, 2017 年 4 月 18 日.
- (4) 秋田魁新報掲載, 「メダカの精巣細胞を凍結保存 秋田大などが技術開発」, 12 面, 2017 年 4 月 23 日.
- (5) 化学工業日報掲載, 2017 年 4 月 5 日.
- (6) 河北新報掲載, 「秋田大 メダカ精原細胞凍結成功 クニマス保存応用へ」, 22 面, 2017 年 9 月 6 日.
- (7) 東京新聞掲載, 「絶滅危惧種のメダカ 別種の個体 代理出産」, , 25 面, 2017 年 9 月 8 日.

- (8) JST 科学技術振興機構 サイエンスポータル 研究内容紹介  
絶滅危惧種を救え - 超低温保存した細胞からメダカの再生に成功  
[http://scienceportal.jst.go.jp/clip/20170605\\_01.html#](http://scienceportal.jst.go.jp/clip/20170605_01.html#)
- (9) Academist Journal 未来のノーベル賞はここにある！イチオシ研究発掘メディア  
研究コラム メダカを絶滅の危機から救え！ - 「東京めだか」を超低温保存細胞から復活  
2017年6月22日 <https://academist-cf.com/journal/?p=5037>
- (10) 大学ジャーナルオンライン, 「精巣を凍結保存していたメダカ、再生に成功、秋田大学など」,  
2017年4月2日, <http://univ-journal.jp/12928/>
- (11) 秋田魁新報掲載, 「代理親で絶滅防ぐ」 研究内容や今後の展望について, 6面, 2017年12月30日.
- (12) 共同通信, 「魚の絶滅防止へ 代理親 クニマスも、絶滅危惧種に応用」, 2018年1月5日.
- (13) 静岡新聞, 「魚の絶滅防止へ 代理親 クニマスも、絶滅危惧種に応用」, 29面, 2018年1月6日.
- (14) 宮崎日日新聞, 「魚の絶滅防止へ 代理親 クニマスも、絶滅危惧種に応用」, 4面, 2018年1月6日.
- (15) 伊勢新聞, 「魚の絶滅防止へ 代理親 クニマスも、絶滅危惧種に応用」, 14面, 2018年1月6日.
- (16) 岩手日報, 「魚の絶滅防止へ 代理親 クニマスも、絶滅危惧種に応用」, 20面, 2018年1月9日.
- (17) 徳島新聞 夕刊, 「魚の絶滅防止へ 代理親 クニマスも、絶滅危惧種に応用」, 2面, 2018年1月9日.
- (18) 日本経済新聞掲載, 「魚の絶滅防止 代理親 クニマスも」, 12面, 2018年1月10日.
- (19) 毎日新聞, 「魚の細胞、別種類に移植 代理親で元の種誕生 クニマスへの応用期待」, 21面, 2018年1月12日.
- (20) 秋田魁新報掲載, 「絶滅の恐れがある魚を別の種類の「代理親」を使って誕生させる研究を、秋田大や東京海洋大などのチームが進めている」22面, 2018年1月17日.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。