

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08623

研究課題名(和文) 多能性幹細胞の異種環境への寄与の限界

研究課題名(英文) An interspecies barrier to tetraploid complementation and chimera formation

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：異種環境において胎仔が正常に発生できるかどうかを研究するために、異種間キメラ形成ならびにマウスとラットの間の四倍体補完を評価した。ドナーPSC由来細胞の全身への寄与は異種間キメラの方が同種間キメラよりも低く、ドナー細胞の寄与率が奇形または胎生死と関連していた。ドナー細胞の組織ごとの寄与率の違いは、同種間キメラよりも異種間キメラの方が大きく、器官形成に必要な相互作用分子の種特異的な親和性の違いがあることが示唆された。異種間四倍体の補完では、胎盤形成の段階まで胚発生はほぼ正常であり、その後胚は生存しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異種間キメラの作製は動物体内での臓器作製法である胚盤胞補完法の基礎となる技術であり、多能性幹細胞が動物の発生過程に協調できるかどうかは臓器作製の可否に非常に重要な情報である。本研究で、多能性幹細胞は異種の発生環境に完全に協調できる訳ではなく、組織によって器官形成に必要な細胞間相互作用ができないという結果が得られた。多能性幹細胞が寄与できない異種組織では、細胞間相互作用に必要な分子の種を合わせるという遺伝子改変が動物体内に多能性幹細胞由来の臓器を作製する上で必要となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To study development of the conceptus in xenogeneic environments, we assessed interspecies chimera formation as well as tetraploid complementation between mouse and rat.

Overall contribution of donor PSC-derived cells was lower in interspecies chimeras than in intraspecies chimeras, and high donor chimerism was associated with anomalies or embryonic death. Organ to organ variation in donor chimerism was greater in interspecies chimeras than in intraspecies chimeras, suggesting species-specific affinity differences among interacting molecules necessary for organogenesis.

In interspecies tetraploid complementation, embryo development was near normal until the stage of placental formation, after which no embryos survived.

研究分野：再生医学

キーワード：異種間キメラ 多能性幹細胞 発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

幹細胞は、様々な組織、細胞に分化しうる細胞であり、造血幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞などの体性幹細胞を利用した再生医療の研究は近年盛んに行われている。

多能性幹細胞も体のすべての組織に分化しうる幹細胞の一つであり、その性質によってナイーブ型とプライム型の2種類に大別される。げっ歯類の多能性幹細胞は「キメラ形成能」というユニークな性質を持つナイーブ型多能性幹細胞に属し、他の動物種の多能性幹細胞とは性質が異なる。我々は、このキメラ形成能によってマウス-ラット間の異種キメラも作製できることを報告したが (Kobayashi et al. 2010) 多能性幹細胞が異種の発生環境内でどのような挙動を示すか (どこまで発生できるか) は全く明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでに、この多能性幹細胞のキメラ形成能を利用した胚盤胞補完法による臓器再生法を報告した。この方法は臓器欠損動物の胚盤胞に多能性幹細胞を注入し、欠損した臓器が、完全に多能性幹細胞由来の臓器に置き換わったキメラ動物を作製する方法である。

この報告の中で我々は初めてラット-マウス異種キメラを作製することに成功し、マウス体内に完全にラット多能性幹細胞由来の膵臓を作製することに成功した。このようにキメラ技術は生命科学のみならず、再生医学の分野でも欠くことのできない技術になることが予想される。

しかし一方で、ラット-マウス異種キメラのキメリズム (多能性幹細胞の異種組織への寄与率) は同種キメラと比較して胎生期においても成体においても低く、キメリズムのきわめて高いものは奇形があり胎生致死していた。これは異種環境内での多能性幹細胞の発生には限界があることを強く示唆している (Kobayashi et al. 2010) (図1)。

また、毛色と血液でのキメリズムが必ずしも相関しないという結果も得られており、組織ごとに多能性幹細胞の寄与 (挙動) が異なる可能性もある。

以上の現象から、本研究では、異種環境における多能性幹細胞の寄与の限界 (異種の壁) がどこにあり、どのような原因で限界に至るのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1: 異種母体とのコミュニケーションの解析 (異種間テトラプロイドコンプリメンテーション)

多能性幹細胞が異種の発生環境内で正常に発生分化するための必要条件の一つは、異種胎盤を介した異種母体とのコミュニケーションが正常に行われることである。

これが正常であるかどうかを検証するために、完全に多能性幹細胞から発生した胎児が異種環境内でどこまで発生できるかを異種間テトラプロイドコンプリメンテーションによって解析した。

具体的には、胚体外のみに寄与するテトラプロイド胚に異種の多能性幹細胞を注入し (マウステトラプロイド胚にラット多能性幹細胞、ラットテトラプロイド胚にマウス多能性幹細胞)、完全に多能性幹細胞からなる胎児を異種動物体内で発生させる。(マウスがラットをまたは、ラットがマウスを産めるか?) 発生途中で停止した場合はどの時期まで胎児の発生が進むかを確認した。

#### 2: 様々な異種組織における多能性幹細胞の寄与の解析 (異種間キメラの解析)

多能性幹細胞が異種の組織内で正常に発生分化するためには、異種組織との複雑な細胞間相互作用や異種由来ファクターに対する反応が正常に行われる必要がある。

これらが正常に行われているかどうかを検証するために、多能性幹細胞が異種動物体内の様々な組織で、その発生にどこまで寄与できるかを解析する。

具体的には、マウス胚盤胞にラット多能性幹細胞 (ES、iPS 細胞) を、ラット胚盤胞にマウス多能性幹細胞 (ES、iPS 細胞) をそれぞれ注入して異種キメラを作製し、様々な発生段階で、脳、血液細胞、心臓、肺、腸、繊維芽細胞、肝細胞、腎臓および生殖細胞を単離し、酵素処理で単一細胞にしたのち、フローサイトメーターでそれぞれキメリズムを解析する。

臓器ごとのキメリズムを統計学的に処理し、寄与の傾向をしらべた。また、同時に胚盤胞に ICM を注入した異種キメラにおいても同様の解析を行い、この傾向が多能性幹細胞特有のものであるかどうかを検証する。

#### 4. 研究成果

##### 1: 異種母体とのコミュニケーションの解析 (異種間テトラプロイドコンプリメンテーション)

異種間テトラプロイドコンプリメンテーション法により、完全に多能性幹細胞由来の胎児がどのステージまで発生できるかを解析した。その結果、マウス多能性幹細胞をラットテトラプロイドに注入した場合、またその逆のラット多能性幹細胞をマウステトラプロイドに注入した場合、どちらも発生初期 (E9.5~10.5) で発生停止または死亡していた。このことから、完全に異種環境内ではマウスもラットも発生の限界は胎盤形成期の直前であり、Full termまで発生できないということが明らかとなった (図1)。発生停止の時期から、胎盤と胎児または胎盤を介した母体と胎児の相互関係が不十分であった可能性も考えられる。

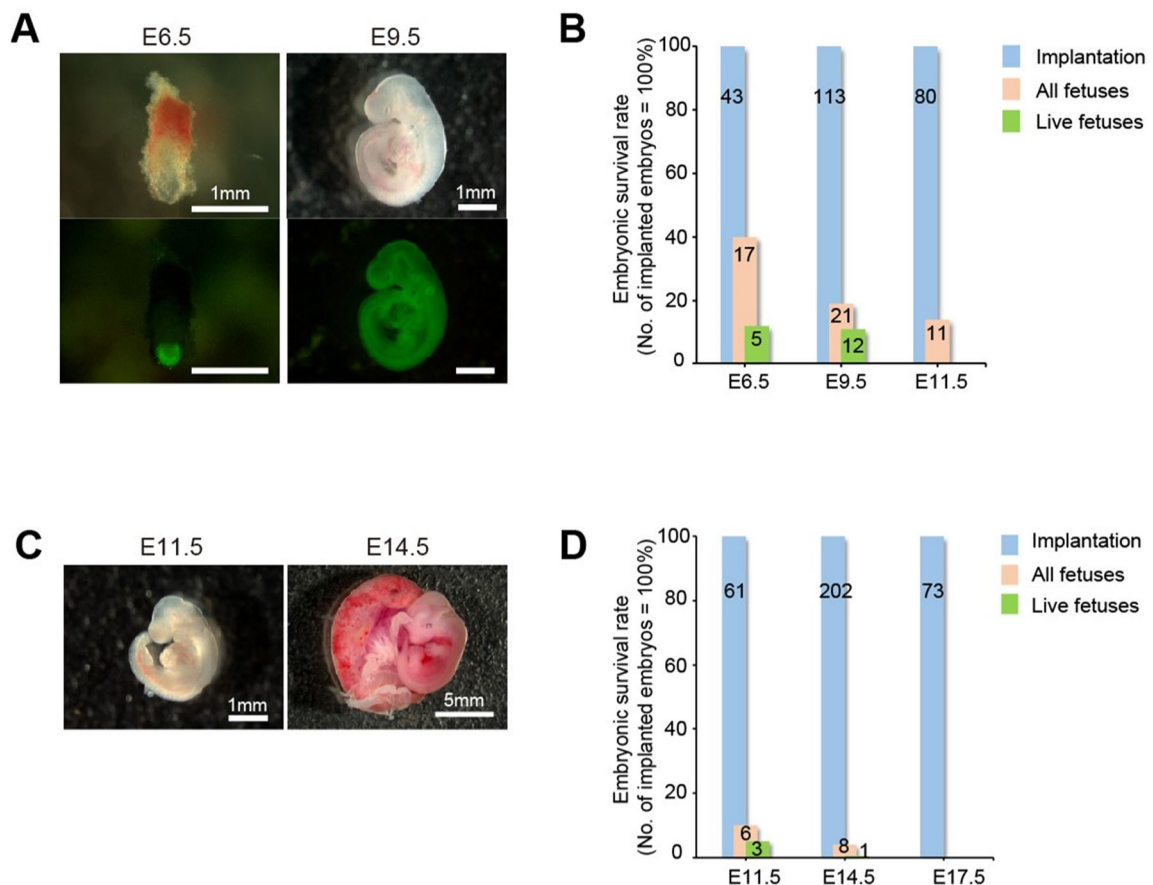


図1、四倍体補完法によるラット、またはマウス胎仔の作出

A, C 四倍体補完法で作出した胎仔の形態。(A: ラット多能性幹細胞由来胎仔、C: マウス多能性幹細胞由来胎仔)

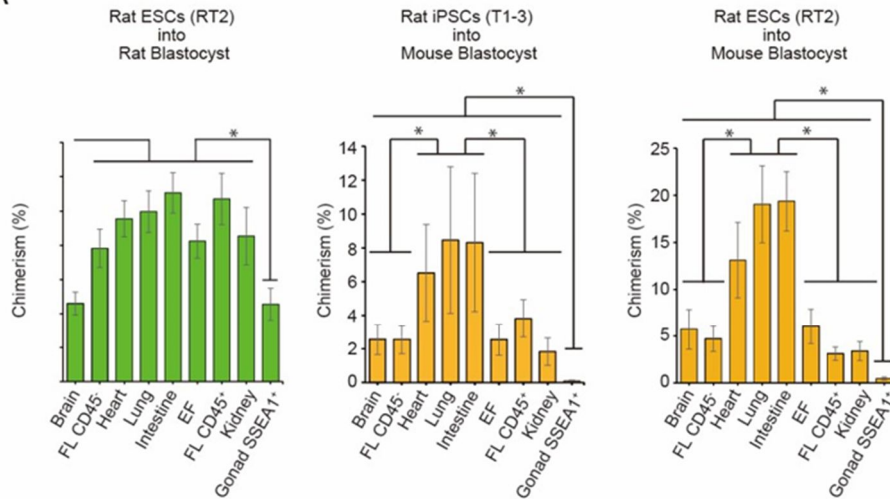
B, D E6.5, E9.5, E11.5 でのラット多能性幹細胞由来胎仔およびE11.5, E14.5, E17.5 のマウス多能性幹細胞由来胎仔の生存率

## 2：様々な異種組織における多能性幹細胞の寄与の解析（異種間キメラの解析）

次に、ラット マウス、およびマウス ラット異種キメラの様々な臓器におけるキメリズムを解析したところ、臓器ごとに寄与率が異なることが分かった。

さらに、このパターンは異種キメラの種類によって異なっていた。同種キメラでは臓器ごとのキメリズムは有意な差は無いことから、異種環境における多能性幹細胞の寄与は臓器別に異なることが分かった。この結果は、組織ごとに器官発生に重要な細胞間相互作用に種特異性があることを示している。

A



B

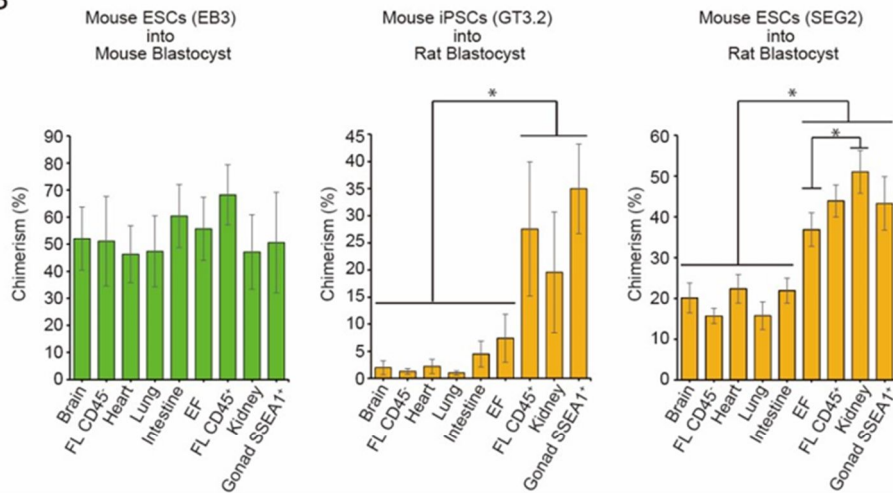


図2、ラットまたはマウス多能性幹細胞の異種間キメラにおける様々な組織への寄与率

A、ラット同種キメラでのラット多能性幹細胞の様々な組織への寄与率（左）。ラット多能性幹細胞のラット-マウス異種間キメラの様々な組織への寄与率（中、右）。

B、マウス同種キメラでのマウス多能性幹細胞の様々な組織への寄与率（左）。マウス多能性幹細胞のマウス-ラット異種間キメラの様々な組織への寄与率（中、右）。

以上の結果から、多能性幹細胞は異種の発生環境に完全には協調できず、異種の多能性幹細胞の寄与が高い場合、奇形になったり死亡してしまったりすることが明らかとなった。これらの現象は母体や胎盤とのコミュニケーションの種差または、器官発生に必須な細胞間相互作用に種差があることに起因すると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ando M, Ando J, Yamazaki S, Ishii M, Sakiyama Y, Harada S, Honda T, Yamaguchi T, Nojima M, Ohshima K, Nakauchi H, Komatsu N.	4. 巻 105(3)
2. 論文標題 Long-term eradication of extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type, by induced pluripotent stem cell-derived Epstein-Barr virus-specific rejuvenated T cells in vivo.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haematologica.	6. 最初と最後の頁 796-807
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2019.223511.	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 -
1. 著者名 Hitomi Matsunari, Masahito Watanabe, Koki Hasegawa, Ayuko Uchikura, Kazuaki Nakano, Kazuhiro Umeyama, Hideki Masaki, Sanae Hamanaka, Tomoyuki Yamaguchi, Masaki Nagaya, Ryuichi Nishinakamura, Hiromitsu Nakauchi, Hiroshi Nagashima.	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 Compensation of Disabled Organogeneses in Genetically Modified Pig Fetuses by Blastocyst Complementation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports.	6. 最初と最後の頁 21-33.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2019.11.008.	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 -
1. 著者名 Suchy F, Yamaguchi T, Nakauchi H.	4. 巻 22(1)
2. 論文標題 iPSC-Derived Organs In Vivo: Challenges and Promise.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell.	6. 最初と最後の頁 21-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stem.2017.12.003.	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 -
1. 著者名 Yoshida A, Lee JK, Tomoyama S, Miwa K, Shirakawa K, Hamanaka S, Yamaguchi T, Nakauchi H, Miyagawa S, Sawa Y, Komuro I, Sakata Y.	4. 巻 20(9)
2. 論文標題 In vitro platform of allogeneic stem cell-derived cardiomyocyte transplantation for cardiac conduction defects.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Europace.	6. 最初と最後の頁 1553-1560.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/europace/eux379.	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 -

1. 著者名 Oldani G, Peloso A, Vijgen S, Wilson EM, Slits F, Gex Q, Morel P, Delaune V, Orci LA, Yamaguchi T, Kobayashi T, Rubbia-Brandt L, Nakauchi H, Lacotte S, Toso C.	4. 巻 69(5)
2. 論文標題 Chimeric liver transplantation reveals interspecific graft remodelling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hepatol.	6. 最初と最後の頁 1025-1036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhep.2018.07.008.	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 -

1. 著者名 Hamanaka S, Umino A, Sato H, Hayama T, Yanagida A, Mizuno N, Kobayashi T, Kasai M, Suchy FP, Yamazaki S, Masaki H, Yamaguchi T, Nakauchi H.	4. 巻 11(4)
2. 論文標題 Generation of Vascular Endothelial Cells and Hematopoietic Cells by Blastocyst Complementation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports.	6. 最初と最後の頁 988-997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2018.08.015.	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 -

1. 著者名 Yamaguchi T, Sato H, Kobayashi T, Kato-Itoh M, Goto T, Hara H, Mizuno N, Yanagida A, Umino A, Hamanaka S, Suchy F, Masaki H, Ota Y, Hirabayashi M, Nakauchi H.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 An interspecies barrier to tetraploid complementation and chimera formation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 15289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.1038/s41598-018-33690-7.	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 -

1. 著者名 Mizuno N, Mizutani E, Sato H, Kasai M, Ogawa A, Suchy F, Yamaguchi T, Nakauchi H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Intra-embryo Gene Cassette Knockin by CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing with Adeno-Associated Viral Vector.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 iScience.	6. 最初と最後の頁 286-297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2018.10.030.	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15件（うち招待講演 15件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 異種動物体内での臓器創出と移植
3. 学会等名 第22回日本異種移植研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 動物の発生環境を利用した臓器作製
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 動物の発生環境を利用した臓器作製
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 異種キメラから得られた知見
3. 学会等名 第2回再生学異分野融合研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 AAVベクターを利用したCRISPR/Cas9システムによる受精卵遺伝子ノックイン
3. 学会等名 第4回日本ゲノム編集学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 動物体内に作成した膵臓と移植治療の可能性
3. 学会等名 第35回東北インスリン研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 異種動物体内での臓器作製
3. 学会等名 第1回再生学異分野融合研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 Interspecies organogenesis generates autologous functional islets
3. 学会等名 第24回日本遺伝子細胞治療学会（招待講演）
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 胚盤胞補完法を用いた実質臓器再生
3. 学会等名 第63回日本透析医学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 動物の体内にヒトの膵臓をつくる！
3. 学会等名 日本IDDMネットワークシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 Generation of “whole organ” by interspecies organogenesis
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 異種動物体内での膵臓再生と糖尿病治療
3. 学会等名 第3回 生活習慣病とがんの代謝栄養メカニズム研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 異種動物体内での膵臓作製と糖尿病治療
3. 学会等名 明治大学バイオリソース研究国際インスティテュート 公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 動物体内での膵臓作製と糖尿病治療
3. 学会等名 御茶ノ水GEM Seminar (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 異種動物体内における膵臓作製と糖尿病治療
3. 学会等名 第11回 ラットリソースリソース研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 山口智之	4. 発行年 2018年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 168
3. 書名 糖尿病学 2018	

1. 著者名 山口智之	4. 発行年 2018年
2. 出版社 寺田国際事務所/先端医療技術研究所	5. 総ページ数 485
3. 書名 消化器疾患の最新医療	

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