

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20948

研究課題名(和文) ナイブ型多能性幹細胞以外による新規キメラ動物作製技術の開発

研究課題名(英文) Development of new procedure to make chimeric animals without using naive pluripotent stem cells

研究代表者

正木 英樹 (Masaki, Hideki)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：20571988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、遺伝子強制発現により細胞死を阻害することで移植細胞を保護することにより、発生段階が一致しない着床後段階の多能性幹細胞や内胚葉前駆細胞であってもマウス着床前胚との間にキメラ個体を形成できることを発見していた。そこで、本研究では非げっ歯類動物にも適用できるか、内胚葉前駆細胞以外の細胞にも適用できるか、を検証することにより、細胞死阻害処理によるキメラ形成促進の一般性を明らかにしようとした。その結果、ウサギES細胞においても細胞死阻害によりキメラ形成が促進されること、また、中胚葉系の細胞である心筋前駆細胞においても細胞死阻害により心筋特異的なキメラが形成されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Our group had shown that forced expression of anti-apoptotic factor enables developmental stage mismatched cells, such as primed state pluripotent stem cells or endodermal progenitor cells, to form chimera with pre-implantation mouse embryos. In this research, we tried to clarify this approach is also applicable for non-rodent cells, and/or other lineage progenitor cells except for endodermal progenitor cells. As a result, we observed that rabbit ESCs formed chimera with mouse and rabbit pre-implantation embryo by forced expression of anti-apoptotic gene, whereas control rabbit ESCs did not form any chimeras. We also observed heart region specific chimera formation with Nkx2.5 expressing cardiomyocyte progenitor cells by preventing apoptosis. Therefore, we conclude that promotion of chimera formation via inhibition of apoptosis can be applicable not only for rodent, and not only for endodermal progenitors.

研究分野：発生生物学、分子細胞生物学

キーワード：ES細胞 iPS細胞 再生医療 臓器再生 キメラ

1. 研究開始当初の背景

現在までにヒト・サル・ラット・ウサギ等多数の動物で ES 細胞が作製されているが、これらの ES 細胞のうち、着床前胚（桑実胚または胚盤胞）に移植してキメラ動物を作製（＝キメラ形成）することが出来るのはげっ歯類に属するマウス・ラットだけであり、げっ歯類以外では未だに ES/iPS 細胞からキメラ個体は得られていない。このキメラ形成能の差は非げっ歯類の ES/iPS 細胞が着床後胚のエピプラストに相当する発生段階にあることに起因すると考えられている。マウス・ラット ES/iPS 細胞は着床前の内部細胞塊の特徴を示すのに対し、非げっ歯類 ES/iPS 細胞は着床後胚の特徴である X 染色体不活性化や、マウス着床後胚のエピプラスト由来多能性幹細胞（EpiSC）に類似した性質を示すことが分かっている。そのため、現在、着床前段階に相当する非げっ歯類 ES/iPS 細胞開発競争が世界中で行われている。

申請者は以前、EpiSC に細胞死阻害処理を施すことでキメラ動物を作製できることを見出した（Masaki *et al.*, 2016 Cell Stem Cell）。これはラット EpiSC を用いた異種間キメラにおいても有効であった。さらに、より発生段階の進んだ内胚葉前駆細胞においても、細胞死阻害処理によりキメラ形成が可能であることを確認している。この際、細胞死阻害処理を施した内胚葉前駆細胞は異なる発生段階に移植されたにも関わらず、発生運命に従って内胚葉のみへの寄与を示した。細胞死阻害によるキメラ形成は、発生段階がさらに進んだ非多能性幹細胞にも適用できることが示されていた。

本法が非げっ歯類細胞にも適用可能であれば世界で初めてのげっ歯類以外における多能性幹細胞由来キメラ動物が作製可能になる。また、内胚葉前駆細胞以外の細胞系譜やさらに分化の進んだ細胞にも本法が適用可能なら、例えばヒト造血幹細胞を動物胚盤胞に移植しヒト造血幹細胞/血液細胞を産生する動物を作製するといった用途も考えられた。

2. 研究の目的

本研究では細胞死阻害処理によるキメラ個体作製法がどのくらい広範に応用できるかを知ることを目的とし、a)非げっ歯類動物細胞を用いたキメラ作製にも適用できるか、b)より分化した前駆細胞や他の細胞系列の前駆細胞によるキメラ形成にも適用できるか、の2点において検証を進めることにした。

3. 研究の方法

アプローチ a) 非げっ歯類動物種にも適用で

きるか

ホスト胚に細胞死抑制処理をした ES/iPS 細胞を注入することでキメラ動物を作製し、ES/iPS 細胞の寄与を解析する。ホスト胚はマウス、ウサギ、ブタ、移植細胞はウサギ、マーモセット、マカクザルの ES 細胞（または iPS 細胞）を想定した。

アプローチ b) より分化した前駆細胞や他の細胞系列にも適用できるか

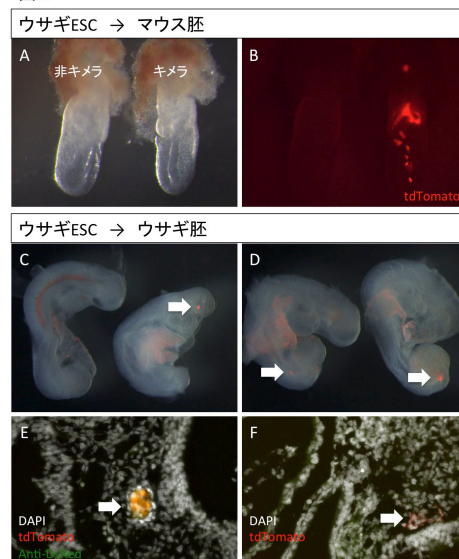
内胚葉系前駆細胞から更に分化を進めた細胞または外胚葉・中胚葉といった他の系譜の細胞においても細胞死阻害によるキメラ形成が可能になるかを検証することを計画していた。

4. 研究成果

a) 細胞死阻害処理によるキメラ形成は非げっ歯類動物細胞にも適用できるか

ウサギ ES 細胞をマウス着床前胚に移植したところ、細胞死阻害処理群において E6.5-E7.5 にて移植細胞の生存が確認された（図 1A,B）。ただし移植細胞は胚体・胚体外組織を問わず分布していた。また、E7.5 以降では移植細胞の生存が確認されなかった。そこで、異種環境下の影響を排除する目的で、ウサギ着床前胚との同種間キメラ実験を行った。その結果、細胞死阻害処理群において、移植細胞が胚体内で生存していることが確認された（図 1C-F）。一方で、通常のウサギ ES 細胞を移植した群ではキメラ個体は全く得られなかった。ただし、細胞死阻害処理群においても、キメラ形成率(キメラ胚/全胚)、キメリズム(移植細胞由来細胞/キメラ個体の全細胞)ともに低かったことが今後の改善点である。

図1.



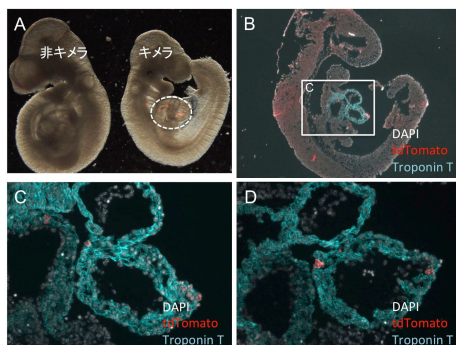
以上から細胞死阻害処理によるキメラ形成は非げっ歯類多能性幹細胞にも適用できることが示唆された。

b) 細胞死阻害処理によるキメラ形成はより分化した前駆細胞や他の細胞系列にも適用できるか

マウス ES 細胞から Sox17 を発現する内胚葉前駆細胞を分化誘導する系において、Activin で分化誘導する期間を変更してみたが、最短の 5 日間、最長の 8 日間の間で移植細胞の寄与領域の変化は認められなかった。そこで Nkx2.5-GFP レポーター ES 細胞株と心筋分化条件を組み合わせ、Nkx2.5 を発現する心筋前駆細胞を FACS により単離し、マウス着床前胚との間にキメラ形成実験を行った。その結果、細胞死阻害処理群において移植細胞は心筋特異的な分布を示し(図 2)、心筋マーカーである Troponin T も共発現していた(図 2C,D)。これらの結果は内胚葉前駆細胞を用いたキメラ作製と同様であった。

以上から細胞死阻害処理によるキメラ形成は内胚葉前駆細胞のみならず、他の細胞系譜にも適用可能であることが示された。なお、Nkx2.5 レポーター ES 細胞を用いた成果はスタンフォード大学の研究チームとの共同研究によって得られた成果である。

図2.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Yamaguchi, T., Sato, H., Kato-Itoh, M., ..., **Masaki, H.**, *et al.* Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. *Nature* (2017) 542, 191-196.
2. **Masaki, H.**, Kato-Itoh, M., Takahashi, Y., *et al.* "Inhibition of apoptosis overcomes stage-related compatibility barriers to chimera formation in mouse embryos." *Cell Stem Cell*, (2016) 19, 587-592.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. **正木英樹**, 山口智之, 中内啓光 "Inhibition of apoptosis overcomes stage-related compatibility barriers to chimera formation" 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017 年 3 月 9 日
2. **Masaki H.**, Nakauchi H "Apoptosis-resistant primed pluripotent stem cells can contribute to chimera formation upon injection into pre-implantation embryos" British Society for Developmental Biology 2016 Autumn meeting, August 29, 2016
3. **Masaki H.**, Yamaguchi T, Nakauchi H "A unique system to assess the in vivo lineage potentials of developmentally-advanced cells by blastocyst injection" International Society for Stem Cell Research 2016 annual meeting, June 23, 2016
4. **正木英樹**, 山口智之, 中内啓光 "A unique system to assess the in vivo lineage potentials of developmentally-advanced progenitors" 第 15 回日本再生医療学会総会, 2016 年 3 月 18 日

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 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: **正木英樹**, 山口智之, 濱仲早苗, 佐藤秀征, 水野直彬, 中内啓光
権利者: 東京大学
種類: 特許
番号: JPO 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: **正木英樹**, 佐藤秀征, 山口智之, 加藤めぐみ, 中内啓光
権利者: 東京大学
種類: 特許
番号: JPO 2016-074996
出願年月日: 2016 年 4 月 4 日
国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

正木英樹 (MASAKI HIDEKI)

東京大学医科学研究所幹細胞治療分野・助教
研究者番号：20571988