

令和 2 年 5 月 28 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：17K10536

研究課題名(和文)臓器移植を目指したin vivoにおける臓器内の血管内皮再構築法の開発

研究課題名(英文)Development of vascular endothelium reconstitution method in vivo for organ transplantation.

研究代表者

濱仲 早苗 (Hamanaka, Sanae)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：40511415

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)：我々は、in vivoで多能性幹細胞由来の血管内皮細胞を作製するために、Flk-1欠損マウス胚盤胞に多能性幹細胞を注入し胚盤胞補完を行った。このFlk-1欠損は、血管内皮と血液細胞の欠損のため胎生致死となる。本研究では、我々はFlk-1欠損キメラマウスでは、すべてマウス多能性幹細胞(ES/iPS細胞)由来の血管内皮と血液細胞を作製することに成功した。そして、Flk-1欠損キメラマウスは特別な異常もなく正常に成体まで発育した。以上より、本研究は、「in vivoにおける臓器内の血管内皮再構築法の開発」を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

拒絶反応を起こさない移植可能な臓器の作製には、臓器のみならず臓器内の血管内皮細胞も同時に多能性幹細胞から作製する必要がある。これまで本研究グループは動物体内で多能性幹細胞由来の臓器作製に取り組んできたが、今回の成果を組み合わせることで、目的の臓器だけでなく臓器内の血管内皮と血液細胞も同時に多能性幹細胞から作製可能であることが予想される。本研究成果は、動物体内での拒絶反応を起こしにくい移植用臓器の作製法として再生医療に大きく貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：To generate pluripotent stem cells (PSCs)-derived vascular endothelial cells in vivo, we performed blastocyst complementation with injecting PSCs into Flk-1 deficient mouse blastocyst. This Flk-1 deficient is embryonic lethal due to an early defect in endothelial and hematopoietic cells.

In this study, we successfully generated vascular endothelial cells and blood derived from mouse PSCs (ES/iPS cells) in Flk-1 deficient chimeric mice by blastocyst complementation. And the Flk-1 deficient chimeric mice survived to adulthood without any abnormality. Based on the above, this study achieved "Development of vascular endothelium reconstitution method in organ".

研究分野：再生医学

キーワード：血管内皮 再構築 多能性幹細胞 胚盤胞補完法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年の臓器移植の問題点としてドナー不足と拒絶反応が挙げられる。これらの問題点を解消するために、移植治療では患者細胞由来の組織幹細胞からの細胞療法や細胞シートなどを移植する再生医療が行われようとしているが、膵臓や肝臓などの臓器は、膵島あるいは肝細胞のほかに血管、神経、間質などから成る複雑な構造をしていることから、現在までのところ *in vitro* で目的臓器と同じ機能を備えた立体構造をもつ臓器作出は困難とされている。

これまでに我々は多能性幹細胞のキメラ形成能を利用した「胚盤胞補完法」で膵臓欠損マウス/ラットの体内に異種であるラットあるいはマウス多能性幹細胞由来の膵臓を作製することに成功し、胚盤胞補完法を利用して動物体内に作製した臓器に含まれる血管や神経などの支持組織はキメラ状態(異種動物の細胞が混在している状態)であることを確認している。臓器を移植する場合、移植臓器だけでなく移植臓器内のドナーの血管内皮細胞は特に移植片超急性・急性拒絶反応の標的となる。そのため、拒絶反応を起こしにくい移植臓器の作製には、臓器のみならず臓器内の血管内皮細胞も同時に多能性幹細胞から作製する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、再生医療の臓器移植時の拒絶反応を起こさないテーラーメイド治療をめざし、血管内皮欠損動物を利用した胚盤胞補完法により動物体内に自己の多能性幹細胞由来の血管内皮を全身で再構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

キメラ個体への寄与率の高いマウス・ラット由来の多能性幹細胞の樹立および選定する。次に、脈管形成・血管新生の関連遺伝子を欠損することにより作製した血管内皮欠損動物(マウス)あるいは既報の血管内皮欠損動物の胚盤胞に、多能性幹細胞(ES または iPS 細胞)を注入して血管内皮欠損キメラ動物を作製する。作製したキメラ個体内での多能性幹細胞由来の血管内皮の構築をPECAM-1などの抗体を用いて血管の表面抗原を免疫組織学的あるいはフローサイトメトリー(FACS)を用いて解析し評価する。

## 4. 研究成果

### (1) キメラ動物に寄与する多能性幹細胞の樹立

マウスあるいはラットの ES/iPS 細胞を樹立し、マーカー遺伝子として緑色あるいは赤色などの蛍光タンパクを発現する細胞を樹立した。キメラ動物では、毛色あるいは体内の臓器・組織によってキメリズムが異なるので、本研究の目的である血管組織細胞(血管内皮細胞)へのこれら多能性幹細胞の寄与を胎生期あるいは成体において、PECAM-1などの抗体を用いて血管の表面抗原を免疫組織学的あるいはフローサイトメトリー(FACS)を用いて解析した。上記の解析により血管内皮の胚盤胞補完に使用するために良好なキメリズムそして血管組織に寄与することのできる多能性幹細胞のセルラインを確定した。

### (2) 血管内皮欠損動物の作製

胚盤胞補完法では、胚盤胞に注入した多能性幹細胞のみから成る血管内皮細胞を構築させる必要があるため、血管内皮と血液細胞の欠損により胎生8.5日頃に胎生致死となる血管内皮増殖因子(VEGF)の受容体である *Flk-1*(*VEGFR-2*) 遺伝子欠損マウスを用いた。血管内皮欠損動物は、既存のモデル動物、または、TALEN(*Transcription Activator-Like Effectors Nucleases*)による *Flk-1* 遺伝子ヘテロ欠損マウスを作製し、これらを交配することで血管内皮・血液細胞欠損マウス(*Flk-1* 遺伝子ホモ欠損)を作製した。

### (3) 胚盤胞補完法による血管の構築

多能性幹細胞由来の血管内皮細胞および血液細胞を作製するために、血管内皮・血液細胞欠損 (*Flk-1* 遺伝子ホモ欠損) マウス受精卵 (胚盤胞) を用いて胚盤胞補完を行った (図1)。

その結果、血管内皮・血液細胞が欠損したマウスは発生初期の胎生期に死亡するが、胚盤胞補完法を用いてこのマウス受精卵に多能性幹細胞を注入して作製したキメラマウスでは、腫瘍形成などの異常もなく成体まで発育し、マウス多能性幹細胞由来のみで構成された血管内皮および血液細胞を作製することに成功した (図2)。以上より、本研究は、「*in vivo*における臓器内の血管内皮再構築法の開発」を達成した。次に、異種であるラット多能性幹細胞と血管内皮・血液欠損マウスを用いて胚盤胞補完法により異種間キメラを作製したが、胎生期に死亡しラット多能性幹細胞由来のみで構成される血管内皮および血液を作製することはできなかった。不完全な補完は未発達な血管新生・造血による胎生致死を引き起こすことから、発生初期の血管内皮・血液細胞へのラット多能性幹細胞の寄与率の向上が今後の課題となる。

本研究グループは動物体内で多能性幹細胞由来の臓器作製に取り組んでいるが、今回の成果を組み合わせることで、目的の臓器だけでなく臓器内の血管内皮と血液細胞も同時に多能性幹細胞から作製可能であることが予想される。本研究成果は、動物体内での拒絶反応を起こしにくい移植用臓器の作製法として再生医療に大きく貢献するものと期待される。

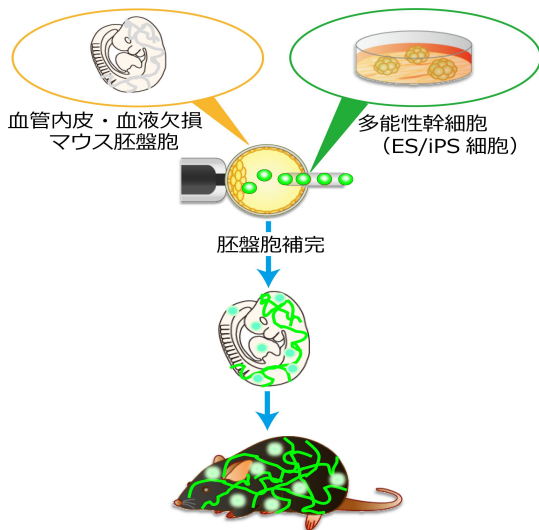


図1. 本研究の概略図。

発生初期の胎生期で死亡する血管内皮・血液欠損マウス胚盤胞にマウス多能性幹細胞 (ES および iPS 細胞) を注入し、血管内皮・血液欠損マウス体内にマウス多能性幹細胞由来血管内皮・血液を作製する (胚盤胞補完)。

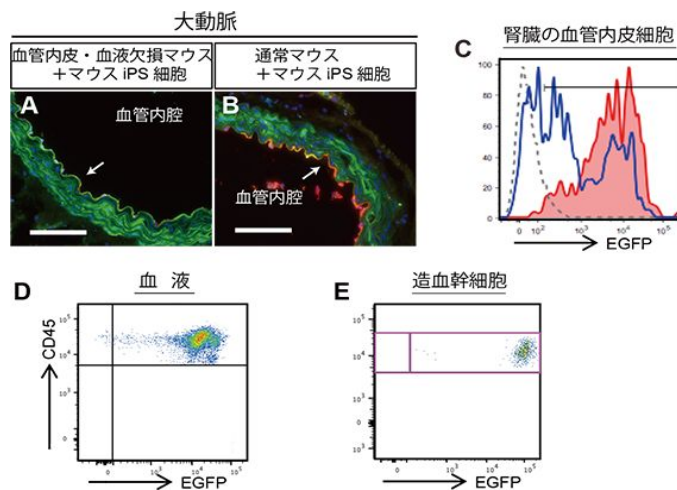


図2. 成体まで発育した血管内皮・血液欠損マウス体内に作製されたマウス多能性幹細胞由来の血管内皮および造血細胞。

(A,B)は、大動脈の組織切片像で血管内腔側が血管内皮である(矢印)。血管内皮は赤色蛍光、マウス多能性幹細胞に由来する細胞は緑色蛍光を呈する。(A)は血管内皮・血液欠損マウスに作製された血管内皮はマウス iPS 細胞由来であったが、(B)血管内皮・血液が通常のマウスでは、マウス iPS 細胞由来の血管内皮は一部だけであった。(C)は腎臓の血管内皮のキメリズムを示した。血管内皮・血液欠

損マウスに作製された血管内皮はマウス iPS 細胞由来であったが、(B)血管内皮・血液が通常のマウスでは、マウス iPS 細胞由来の血管内皮は一部だけであった。(C)は腎臓の血管内皮のキメリズムを示した。血管内皮・血液欠

損マウスに作製した血管内皮は EGFP 陽性マウス iPS 細胞由来であった(赤線)。青線は血管内皮・血液が通常のマウスに作製した血管内皮、破線はコントロールを示す。

血管内皮・血液欠損マウス体内に作製された血液 (D)、造血幹細胞(E)は EGFP 陽性でマウス多能性幹細胞由来であった。白線は長さ 100 $\mu$ m を示す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

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
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamaguchi Tomoyuki, Sato Hideyuki, Kobayashi Toshihiro, Kato-itoh Megumi, Goto Teppei, Hara Hiromasa, Mizuno Naoaki, Yanagida Ayaka, Umino Ayumi, Hamanaka Sanae, Suchy Fabian, Masaki Hideki, Ota Yasunori, Hirabayashi Masumi, Nakauchi Hiromitsu	4. 巻 8
2. 論文標題 An interspecies barrier to tetraploid complementation and chimera formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15289-15298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-33690-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hamanaka Sanae, Umino Ayumi, Sato Hideyuki, Hayama Tomonari, Yanagida Ayaka, Mizuno Naoaki, Kobayashi Toshihiro, Kasai Mariko, Suchy Fabian Patrik, Yamazaki Satoshi, Masaki Hideki, Yamaguchi Tomoyuki, Nakauchi Hiromitsu	4. 巻 11
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) doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.08.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 濱仲早苗
2. 発表標題 胚盤胞補完法による多能性幹細胞由来の血管内皮細胞および造血細胞の同時作製
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 第40回日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱仲早苗
2. 発表標題 胚盤胞補完法による多能性幹細胞由来の血管内皮細胞および造血細胞の同時作製
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

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