

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03170

研究課題名(和文) カニクイザル胚を用いたヒト多能性幹細胞キメラ形成能評価系の開発

研究課題名(英文) Development of in vitro chimera assay system utilizing cynomolgus monkey embryos

研究代表者

正木 英樹 (Hideki, Masaki)

東京医科歯科大学・高等研究院・プロジェクト助教

研究者番号：20571988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：カニクイザル胚の体外発生条件およびキメラ胚子宮内発生実験条件を規定することができ、ヒト多能性幹細胞に極めて似た性質を有するチンパンジーnaive型iPSC細胞を樹立することができた。これは生命倫理上の問題を回避しつつヒトnaive型多能性幹細胞の性質を評価する手段として有用である。本研究で得られた成果を元に今後チンパンジーnaive / primed PSCを用いたin vivoキメラ形成実験を行うことで、in vitroキメラ形成実験よりも正確にヒトPSCのbiological potencyを評価することができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトnaive型多能性幹細胞は従来型多能性幹細胞より作出できる組織が多様であり、再生医療での利用や初期発生メカニズムや不妊メカニズムの理解に重要だと考えられます。ただし、発生能の評価を同種胚(=ヒト胚)内で実施することは難しいことから、最もヒトに近縁な動物種であるカニクイザル胚をホストとして評価するのが現実解です。本研究ではカニクイザル胚を用いたin vivo/in vitroでのキメラ形成実験条件を規定するとともに、ヒト多能性幹細胞を用いた実験の前段階のリスク評価に適したチンパンジーnaive型iPSCの樹立にも成功しました。

研究成果の概要(英文)：In this study, we defined ex vivo culture condition of Cynomolgus monkey embryos and in vivo chimera assay conditions with Cynomolgus monkey embryos. We also derived Chimpanzee naive iPSC and blastoid, which are useful as a substitute for human naive PSCs without ethical concerns.

Based on the results obtained in this study, future in vivo chimera formation experiments using chimpanzee naive / primed PSCs will enable us to evaluate the biological potency of human PSCs more accurately than in vitro chimera formation experiments.

研究分野：発生生物学

キーワード：多能性 多能性幹細胞 チンパンジー 霊長類 キメラ blastoid

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マウス ES 細胞とヒト ES 細胞は共に着床前胚の内部細胞塊より樹立される。マウス ES 細胞は着床前エピプラストに相同な発生段階を維持して自己増殖する多能性幹細胞 (Pluripotent Stem Cell: PSC) となる (Naïve PSC)。ところが、ヒト ES 細胞は着床後エピプラストに相同な発生段階に達したのちに自己増殖フェーズに入ることが知られていた (primed PSC)。Human naïve PSC の開発競争によって多様な樹立条件による株が報告されてきたが、評価系の多くは遺伝子発現や培養下での分化能に基づいており、真に着床前段階にあることを証明する機能評価系が存在しなかった。マウス ES 細胞のナイーブ型多能性を証明する機能評価実験はマウス着床前胚とのキメラ形成実験である。しかし、ヒトクローン法からも、生命倫理上の観点からも、ヒト胚にヒト多能性幹細胞を注入することは認められない。

### 2. 研究の目的

上記の背景に基づき、ヒトと最も近縁な実験動物であるカニクイザルを用いてヒト多能性幹細胞のキメラ形成能を評価することを着想した。マウス胚のように進化的に距離のある動物胚をホストとした場合、発生能を正確に評価することが困難である可能性がある。ヒト胚の代替としてカニクイザル胚を用い、ヒト naïve PSC と primed PSC のカニクイザル胚内での挙動の差を検証することを考えた。また、我々の研究グループではヒト→動物キメラ体内でのヒト臓器作出研究を行っていたことから、ヒト→カニクイザルキメラがキメラ個体を形成しうるかを、*ex vivo* 発生系で検証したいとの目的もあった。

### 3. 研究の方法

ヒト→カニクイザルキメラを作出するには当該研究を動物性集合胚作成研究として文科省の承認を受ける必要があるが、ヒトと非ヒト霊長類とのキメラ作成はヒトと動物の境界が曖昧な「曖昧動物」作出のリスクがあり、慎重に研究を進める必要がある。そのため、本研究では human naïve PSC の代替としてチンパンジー naïve PSC を樹立し、まずチンパンジー→カニクイザルキメラ形成実験を実施し、曖昧動物作出のリスクを評価したのちにヒト→カニクイザルキメラ作成研究を申請することとした。

キメラ形成実験は *in vitro/in vivo* を想定し、カニクイザル胚を用いたキメラ形成実験系が確立されていないことから、カニクイザル→カニクイザルキメラ胚を用いて、*in vivo/in vitro* 双方において実験条件の至適下に取り組んだ。

### 4. 研究成果

まず、カニクイザル着床前胚の培養条件の規定を行った。その結果、胚盤胞期以降に IVC1→IVC2 へと変更することにより、着床後エピプラスト形成期まで発生させられることが明らかになった。続いて、IVC1、IVC2 でヒト naïve PSC、primed PSC を培養したが、いずれの条件でも多能性が維持できないことが明らかになった。特に human naïve PSC は IVC1、IVC2 のいずれにおいても 24 時間以内に死滅するか naïve pluripotency を失う結果となった。カニクイザル胚とドナー PSC 双方に適した培養条件を探索するために IVC1/IVC2 と PSC 維持培地を 1:1、3:1 で混合した培地でカニクイザル胚を培養したが、正常には発生できなかった。

カニクイザル胚は非常に貴重で採卵機会も限られるため、培養下での条件検討を中止し、*in vivo* にてカニクイザル胚を用いたキメラ形成実験条件の至適化を行った。カニクイザル naïve PSC が存在しないことから、*BCL2* を導入したカニクイザル primed ESC を用いて胚盤胞期と桑実胚期でのキメラ形成実験を行った。その結果、桑実胚にドナー細胞を注入した群にてドナー細胞の生存が認められた(図 1)。他グループによる先行研究において桑実胚期よりも早い発生段階でドナ

図 1. カニクイザル primed ESC 由来同種間キメラの作出

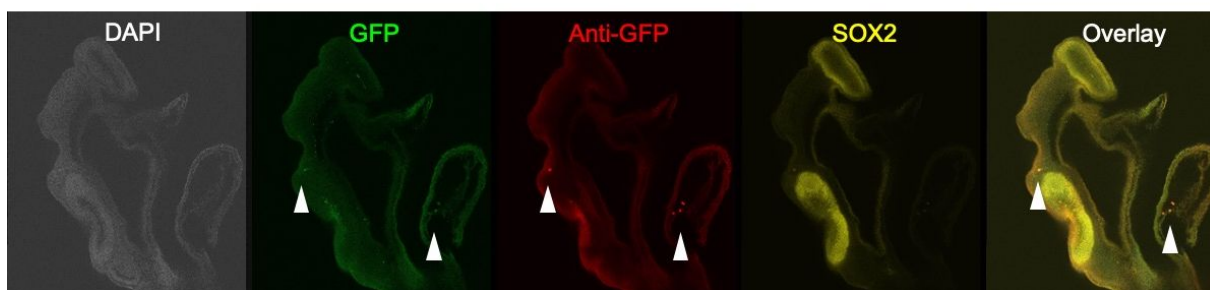
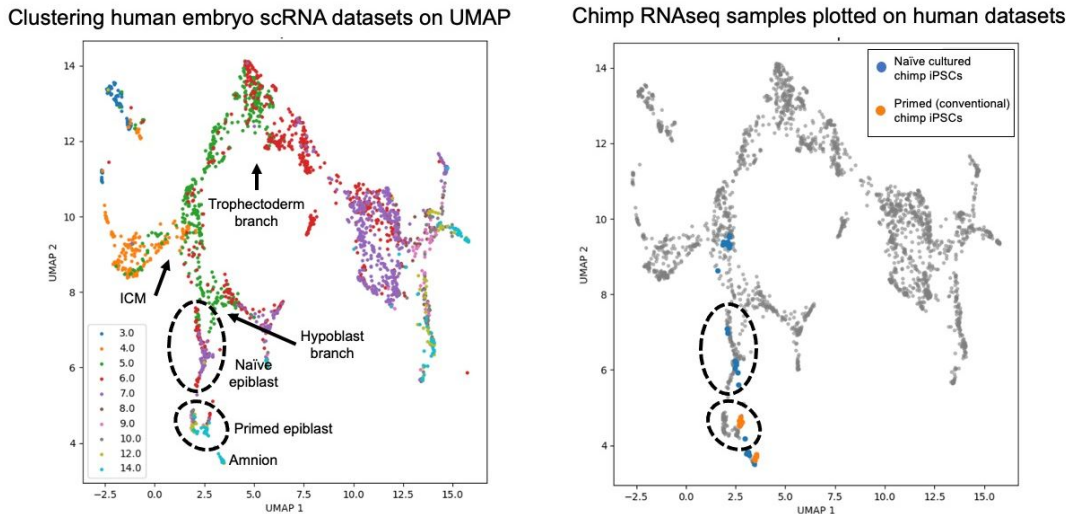


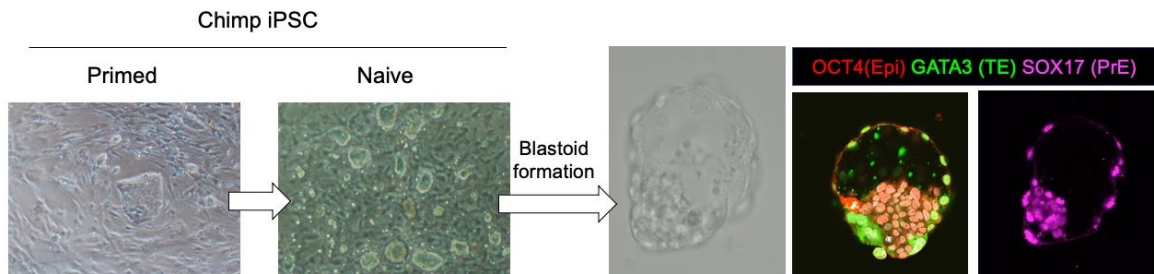
図2. チンパンジープライム型・ナイーブ型 iPSC とヒト胚の遺伝子発現比較



一細胞を注入しないとキメラ個体が形成できないことが報告されていた(Tachibana et al. Cell 2012)が、今回の結果によって桑実胚でもキメラ形成が可能であることが明らかになった。ただし、より早い発生段階の方がキメラ形成効率が高い可能性はあるため、今後さらにキメラ形成実験条件の最適化を進める。

*in vivo* キメラ形成実験の条件が規定できたが、上述のように法令上の制限・生命倫理上の懸念があり、いきなりヒトPSCをカニクイザル胚に注入してキメラ形成実験を行うことはできない。そこで、ヒトに最も近縁な種であるチンパンジーprimed iPSCからnaivePSCを作成し、ヒトnaivePSCの代わりにカニクイザル胚との間のキメラ形成能評価に用いることにした。チンパンジーnaivePSCの樹立は未だ報告されていなかったため、ヒトnaivePSCの培養条件を元に成長因子やシグナル阻害剤を追加することでチンパンジーnaiveiPSCを安定的に維持できる培養条件を規定した。チンパンジーnaiveiPSCの遺伝子発現プロファイルはヒトnaivePSCによく似ており、ヒト胚の遺伝子発現プロファイルと比較すると、着床前エピプラストに近似していた(図2)。また、ヒトnaivePSCの特徴としてtrophectoderm(TE), primitive endoderm(PrE)への分化能を有し、胚盤胞様のオルガノイドである”blastoid”を形成できることがある。今回樹立したチンパンジーiPSCからもblastoidが形成でき(図3)ヒトnaivePSCと同様の性質を有することが確認された。今後、分担機関である滋賀医科大学での実験計画の承認を得た上で、チンパンジーnaiveiPSCを用いたカニクイザル胚との*in vivo*キメラ形成実験を行い、ヒトnaivePSCの発生能とヒト→カニクイザルキメラが成立し得るかを推察する予定である。また、ヒトblastoidが個体形成できるかは大きな注目を集めているトピックであるが、生命倫理上の問題から、原腸陥入期以上の発生が培養下においても認められていない。ヒトblastoidによく似た性質を有するチンパンジーblastoidを*in vitro*/*in vivo*で長期発生させることによって、この命題に答えたい。本研究により、カニクイザル胚の*ex vivo*発生条件・*in vivo*キメラ形成条件が規定され、ヒトnaivePSCに極めて似た性質を有するチンパンジーnaiveiPSCを樹立し、チンパンジーblastoidを作出することができた。当初計画していたヒトPSCの発生能評価のための*in vitro*キメラ形成実験系の開発には至らなかったが、本研究で得られた成果を元に今後チンパンジーnaive/primedPSCを用いた*in vivo*キメラ形成実験を行うことで、より正確にヒトPSCのbiological potencyを評価することができる。本研究の成果をまとめた論文を現在執筆中である。

図3. チンパンジーナイーブ型 iPSC の樹立と blastoid 形成



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 正木英樹
2. 発表標題 ヒト臓器作製を目的としたヒト 動物キメラ作出研究の課題と展望
3. 学会等名 第21回再生医療学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 正木英樹
2. 発表標題 チンパンジー多能性幹細胞を用いた異種間キメラ形成能の評価
3. 学会等名 第50回ホミニゼーション研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 正木英樹
2. 発表標題 Xenobarrier in human-mouse interspecies chimeras
3. 学会等名 第37回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 正木英樹
2. 発表標題 XENOBARRIER IN HUMAN-MOUSE INTERSPECIES CHIMERA FORMATION
3. 学会等名 Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research
4. 発表年 2022年～2023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
研究 分担者	依馬 正次  (Ema Masatsugu)  (60359578)	滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授   (14202)	
研究 分担者	水谷 英二  (Mizutani Eiji)  (80443034)	筑波大学・医学医療系・准教授   (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
英国	University of Exeter		