

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03740

研究課題名(和文)動物発生環境を利用したヒト臓器創出

研究課題名(英文)Generation of human pancreas in xenogeneic animal

研究代表者

山口 智之(Yamaguchi, Tomoyuki)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：80392158

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)：ヒトiPS細胞はマウス発生初期にはマウス発生環境において協調的に発生することができず、ヒト-マウス異種間キメラは作製することができない。そこで、ヒト-マウス間相互作用に必要なと予想されるマウス細胞接着分子およびタイトジャンクション分子をヒトiPS細胞に発現させキメラ形成を試みたが、協調的に発生させることは出来なかった。発生過程後期は発生様式の種差が大きくなく、ヒト細胞でもマウス体内で協調的発生ができる可能性がある。本研究では、この発生後期に卵黄静脈経由で胎仔に細胞を注入する手法を開発した。これにより、発生後期にヒト細胞をマウス胎仔に注入し、協調的に発生させ、臓器が形成されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、動物発生過程を利用した臓器作製法は多能性幹細胞から形態的にも機能的にも正常な臓器を作製する唯一の手法である。しかし、この手法をヒトの臓器作製に応用することは困難である。それは、動物とヒトの発生初期の発生様式が大きく異なるからである。本研究では、動物とヒトの間でも発生様式の相違が小さい、発生後期の動物胚に細胞を効率良く注入する手法を開発した。これによりこれまでの手法で達成できなかった、ヒト細胞のマウス環境での協調的発生が行われ、さらに、ヒト臓器作製への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Human induced pluripotent stem cells (iPSCs) are unable to cooperatively develop within the mouse developmental environment during early mouse embryogenesis, and it is not possible to create human-mouse chimeras. Therefore, we attempted to express mouse cell adhesion molecules and tight junction molecules, which are expected to be necessary for human-mouse interactions, in human iPSCs to promote chimera formation. However, cooperative development could not be achieved. During the later stages of development, there is less species difference in the developmental pattern, suggesting the possibility of cooperative development of human cells within the mouse body. In this study, we developed a method to inject cells into the fetus via the vitelline vein during the late stages of development. This technique enables us to inject human cells into mouse embryos during the later stages of development, with the expectation that they will cooperatively develop and form organs.

研究分野：再生医学

キーワード：臓器作製 異種間キメラ

1. 研究開始当初の背景

1980年代から始まったI型糖尿病に対する膵島移植治療は、I型糖尿病を根治に導く治療法のひとつであるが、効果的且つ糖尿病を引き起こさない免疫抑制法が無い、さらに、ドナー不足などの原因で十分な成果が出なかった。以来、膵島単離プロトコールの改良、膵島単離デバイスの開発、免疫抑制法の改良、免疫拒絶を回避できるカプセルの開発などが行われ、一定の効果を上げているが、未だ膵島移植の完全な効果が観られていない。この状況は自分自身の細胞から膵臓を作製することができれば大きく改善すると考える。

人工多能性幹細胞(iPS細胞)は自分自身の体細胞から誘導される多能性幹細胞であり、この膵臓作製のソースとして最適である。iPS細胞から*in vitro*で治療用細胞を作り出す手法はこの数年で飛躍的に進歩し、今や実際に自分自身の細胞で自分自身の病気を治療するに至っている。一方で、*in vitro*でヒトiPS細胞から機能的な臓器を作製することは未だ実現していない。

2. 研究の目的

我々はiPS細胞から機能的な臓器を作製するために、動物体内でその発生現象を利用した臓器作製法である胚盤胞補完法を開発した。胚盤胞補完法は膵臓欠損動物の胚盤胞にiPS細胞を注入することで、完全にiPS細胞由来の膵臓を持つキメラ動物を作製する手法であり、この方法がヒトに応用できれば膵島移植時の拒絶反応、ドナー不足の問題は解決できると考える。

我々はこれまでに、この胚盤胞補完法によりラット体内に完全にマウスiPS細胞由来の機能的な膵臓を作製することに成功し、ラット体内のマウス膵臓より膵島を単離し、糖尿病モデルマウスに移植したところ、免疫抑制剤無しで1年以上血糖値を正常に保つことに成功している(Yamaguchi et al, *Nature* 2017)。これにより、小動物でiPS細胞から膵臓再生、さらに膵島移植による治療のコンセプトを完全に示すことに成功した。この手法をヒト臓器作製に応用する実験は、これまでヒトクローン法に関わる特定胚指針でヒト細胞-動物胚キメラ(動物性集合胚)の子宮内発生が禁じられてきたことにより試みることができなかったが、平成31年3月1日付けで個体発生が解禁となった。そこで、本研究では胚盤胞補完法によりマウス体内にヒト膵臓の作製を目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではヒト細胞を注入したキメラ胚をイメージング技術により時空間的に解析し、ヒト細胞がどの段階で排除されているかを正確に知り、さらに発生途中のヒト-マウスキメラ胚から取り出したヒト細胞の遺伝子発現解析により、どのような要因でヒト細胞が排除されているかをstep by stepで解析する。そして、これらの要因を一つ一つ解消(遺伝子改変)していくことで、マウス発生環境に適応できる改変型ヒトiPS細胞を作製する、そしてその改変型ヒトiPS細胞を利用して最終的にマウス体内にヒト膵臓を作製することを目指した。

4. 研究成果

(1) これまでにマウス胚盤胞にマウスエピプラスト幹細胞(EpiSCs)を注入すると24時間以内にEpiSCsは細胞死し排除されるが、細胞死抑制処理をするとキメラを形成す

ることが報告されている (Masaki et al., *Cell Stem Cell* 2016)。そこで、ヒト iPSCs (hiPSCs) に細胞死抑制処理である Bcl2 の過剰発現を施し、マウス胚盤胞に注入し、in vitro で培養したところ、野生型 hiPSCs は4日後には完全に消失するが、BCL2 を過剰発現させた hiPSCs では6日培養後もマウス胚盤胞内で生存することが分かった (図1a)。

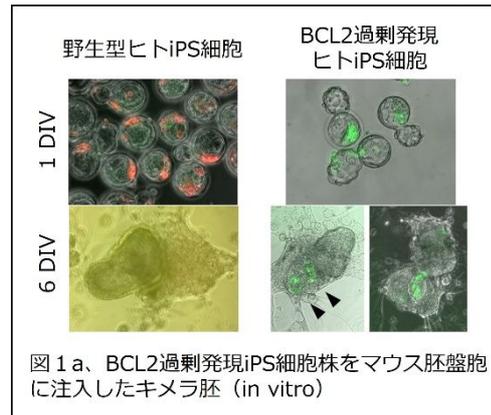


図1a、BCL2過剰発現iPS細胞株をマウス胚盤胞に注入したキメラ胚 (in vitro)

In vitro での培養6日目は着床と同時期であるので、さらに発生の進んだ着床後胚での動向を観察する為にマウス胚盤胞に BCL2 を過剰発現させた hiPSCs およびチンパンジー iPS 細胞 (chimpiPSCs) を注入し、偽妊娠マウスの子宮に移植することで、キメラマウスの作製を行った。その結果、hiPSCs および chimpiPSCs どちらも着床後の胎生6.5日 (E6.5) の時点で iPS 細胞由来の細胞が生存していることが確認できた (図1b)。

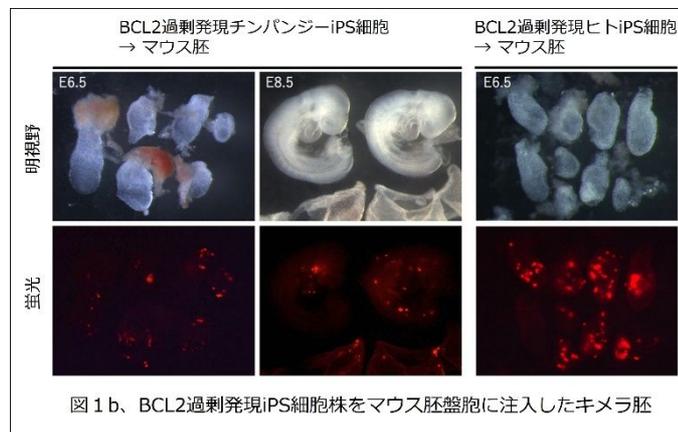


図1b、BCL2過剰発現iPS細胞株をマウス胚盤胞に注入したキメラ胚

一方で、chimpiPSCs を注入して作製したキメラでは奇形の胎仔も多く見られた。そこで、注入した chimpiPSCs 由来の細胞の胎仔における局在を詳細に観察したところ、実質細胞の存在しない間隙に局在していることが分かった。以上の結果から、BCL2 過剰発現による細胞死抑制処理をした hiPSCs または chimpiPSCs は野生型 iPSCs と比較してマウス初期胚から排除されないが、マウス発生過程に協調して分化、増殖することができず、マウス胚の発生を阻害していることが明らかとなった。

(2) hiPSCs や chimpiPSCs はマウス発生環境内に生存はできても協調して発生することができないことが明らかとなった。そこで、異種間の細胞同士が相互作用できるように hiPSCs にマウスの細胞接着因子およびタイトジャンクション分子を強制発現させた。hiPSCs にマウス E-Cadherin (mCdh1)、mDsg2、mDsc2 をそれぞれ強制発現させた細胞をマウス胚盤胞に注入し、偽妊娠マウスの子宮に移植することで、キメラマウスの作製を行ったところ、E6.5 時点ですべての過剰発現株でヒト細胞の生存を確認することができたが、すべて胚体外組織になる visceral endoderm (臓側内胚葉) に局在しており、胚体への寄与は確認できなかった (図2)。

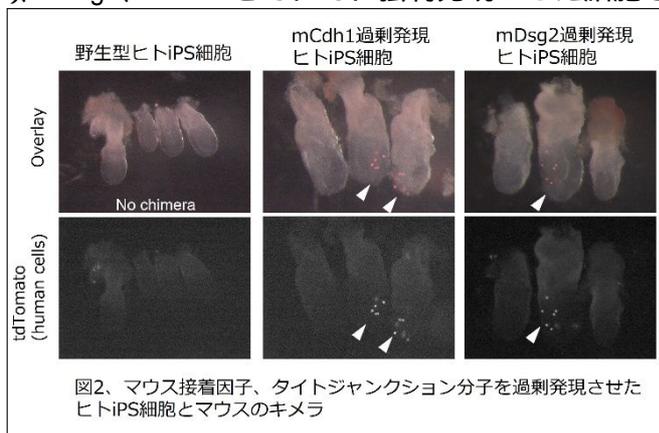


図2、マウス接着因子、タイトジャンクション分子を過剰発現させたヒトiPS細胞とマウスのキメラ

(3) 上記の研究結果からヒトとマウスという遠縁種間では胚盤胞注入によるキメラ形成法では宿主動物と協調的に発生するのは非常に難しいということが明らかとなった。これには3つの原因が考えられる。1つ目は、マウスとヒトの iPSC 細胞の発生ステージの違い (マウスは胚盤胞と同じナীব型、ヒトは着床後胚と同等のプライム型)。

2つ目は、リガンド・レセプター結合の種特異性（ヒト細胞とマウス細胞の相互作用ができない）3つ目は、発生原理の種特異性である（マウスはシリンダー胚を形成し、ヒトはディスク胚を形成する）。デニス・ドゥブールの提唱した発生の砂時計では、発生中期（着床から3日程度まで）の発生様式は非常に種特異性が非常に高いとされている。つまりマウス発生中期の環境中でヒト細胞はマウス細胞と協調的に発生することができずキメラを形成できないと考えられている。一方で、発生後期（着床から4日以降）のマウス胎児にマウスの組織前駆細胞を注入した場合、正常に分化するとの報告がある（Fujimoto et al., *Cell Reports* 2020）。そこで、発生様式の種特異性の低い発生後期（着床から4日以降）の胚に細胞を注入することで動物体内で臓器作製を行う手法を開発することを試みた。発生後期胎児へ細胞を注入する方法は、胎児に直接インジェクションする方法、卵黄静脈経由および胎盤経由の3つである。胎児に直接インジェクションする方法は標的に正確に注入することが非常に難しく、胎児へのダメージも大きいことから選択肢から外し、初めに卵黄静脈経由で蛍光ビーズを注入し、胎児臓器へ注入可能かどうかを確かめた。胎生14.5日齢（E14.5）の胎児の卵黄膜を流れる卵黄静脈に対し、蛍光ビーズをナノパシードル（34ゲージ）で注入して2日間発生させたところ、

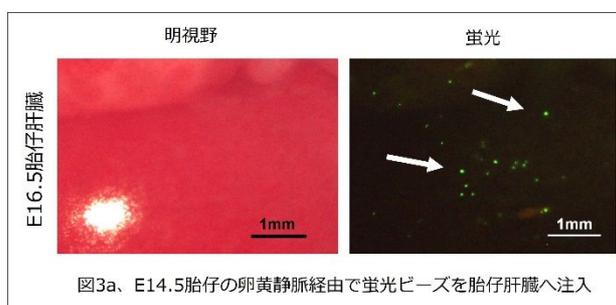


図3a、E14.5胎児の卵黄静脈経由で蛍光ビーズを胎児肝臓へ注入

E16.5時点での胎児の生存と肝臓での蛍光が実体顕微鏡にて確認された（図3a）。また注入のために子宮筋層を取り除くことから、胎児の生存率は約16%、胎児肝臓での蛍光検出率は約9%であった（図3b）。これにより、卵黄静脈経由で胎児に直接細胞を注入できることが分かった。

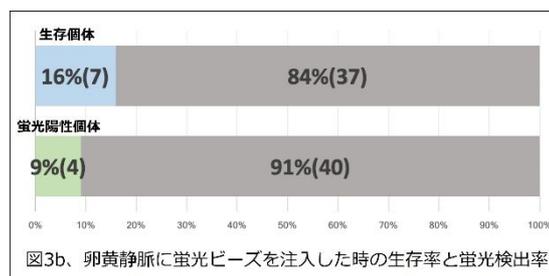


図3b、卵黄静脈に蛍光ビーズを注入した時の生存率と蛍光検出率

（4）次に、細胞の移植も可能であるか、骨髄細胞の注入により検証した。E14.5マウス胎児の胎盤を経由してGFPマウス骨髄細胞を注入し、E18.5の肝臓と脾臓においてGFP陽性細胞を確認できた（図4a）。また、胎児の生存と肝臓で蛍光が検出されるか観察をした結果、注入後の胎児生存率は約38%、胎児肝臓におけるGFP蛍光検出率は約10%であった（図4a）。ドナー細胞を注入した4日後のE18.5に胎児を解析したところ、肝臓と脾臓でGFP陽性細胞を確認できた（図4b）。

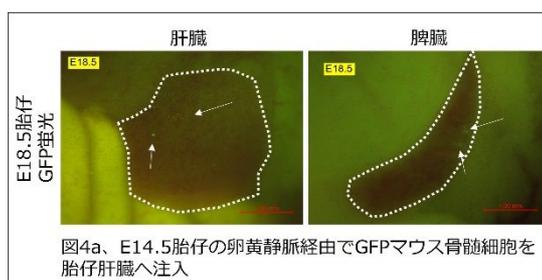


図4a、E14.5胎児の卵黄静脈経由でGFPマウス骨髄細胞を胎児肝臓へ注入

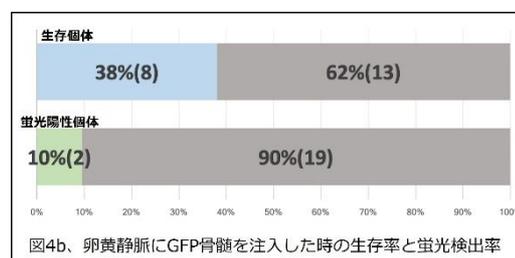


図4b、卵黄静脈にGFP骨髄を注入した時の生存率と蛍光検出率

本研究では、ヒト-マウス異種間キメラができない原因を解明し、解消することは出来なかったが、発生様式の異種間差の小さい発生中期以降に卵黄静脈経由で細胞を触接胎児に注入する手法でキメラ動物を作製することが可能となり、この手法でヒト-マウス異種間キメラ並びにヒト臓器作製への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3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 Harada S, Ando M, Ando J, Ishii M, Yamaguchi T, Yamazaki S, Toyota T, Ohara K, Ohtaka M, Nakanishi M, Shin C, Ota Y, Nakashima K, Ohshima K, Imai C, Nakazawa Y, Nakauchi H, Komatsu N.	4. 巻 VOLUME 30, ISSUE 2
2. 論文標題 Dual-antigen targeted iPSC-derived chimeric antigen receptor-T cell therapy for refractory lymphoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Ther.	6. 最初と最後の頁 534-549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2021.10.006	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 Sone M, Nakamura S, Umeda S, Ginya H, Oshima M, Kanashiro MA, Paul SK, Hashimoto K, Nakamura E, Harada Y, Tsujimura K, Saraya A, Yamaguchi T, Sugimoto N, Sawaguchi A, Iwama A, Eto K, Takayama N.	4. 巻 16(12)
2. 論文標題 Silencing of p53 and CDKN1A establishes sustainable immortalized megakaryocyte progenitor cells from human iPSCs.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports.	6. 最初と最後の頁 2861-2870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.11.001	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 Yamazaki K, Kubara K, Ishii S, Li P, Dairiki R, Hihara T, Ishizuka Y, Izumi Y, Kumai M, Kamisako T, Ishizaki H, Sato H, Masaki H, Mizuno N, Mitsuhashi K, Ito M, Hamanaka S, Yamaguchi T, Watanabe M, Sugiyama F, Nakauchi H.	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 In vitro and in vivo functions of T cells produced in complemented thymi of chimeric mice generated by blastocyst complementation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 3242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-07159-7	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 山口智之	4. 巻 Vol.27 No.2
2. 論文標題 動物の発生環境を利用した臓器作製	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organ Biology	6. 最初と最後の頁 149-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11378/organbio.27.149	査読の有無 無
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 山口智之	4. 巻 Vol.35 No.4
2. 論文標題 オルガノイドによる次世代Drug Delivery System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 276-276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2745/dd.35.276	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中内 啓光, 西村 俊哉, 正木 英樹, 山口 智之
2. 発表標題 臓器ニッチおよび細胞競合ニッチを利用した異種個体内での移植臓器作出
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 個体と臓器のスケーリング機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 キメラ動物を用いた異種移植による臓器再生医療の最前線
3. 学会等名 第103回日本獣医麻酔外科学会オンライン学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 再生医療時代の免疫制御
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 胚盤胞補充法による血管内皮細胞および血液細胞の同時作製
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口智之
2. 発表標題 胚盤胞補充法を用いた三次元臓器再生と自己免疫反応
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2020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	正木 英樹 (Hideki Masaki) (20571988)	東京医科歯科大学・高等研究院・特任助教 (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	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	水谷 英二 (Eiji Mizutani) (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