

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2018～2022

課題番号：18H05366・20K20375

研究課題名（和文）幹細胞による人工胚盤胞の作製

研究課題名（英文）Reconstitution of artificial blastocysts by stem cells

研究代表者

大日向 康秀（Yasuhide, Ohinata）

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：70415107

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,800,000円

研究成果の概要（和文）：胚盤胞は着床前エピブラスト、栄養膜、原始内胚葉の3つの細胞系譜で構成される組織である。これまでに、着床前エピブラストからES細胞が、栄養膜からTS細胞が樹立されていたが、残る原始内胚葉の幹細胞は未樹立であった。我々は、無血清培地にFGF4、CHIR99021、PDGF-AAを添加した条件で、原始内胚葉幹細胞の樹立に成功し、報告した。人工胚盤胞作製に必要な全ての細胞系譜の要素が揃ったことから次に、ES細胞、TS細胞、PrES細胞で、初期胚オルガノイドを作製し、偽妊娠マウス子宮への移植を行なった。これら人工胚は、高効率で着床し、臍側卵黄嚢、壁側卵黄嚢様構造に取り囲まれた胚様構造を派生させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚盤胞を構成する3つの細胞系譜の内、最後に残された原始内胚葉系列からPrES細胞が樹立されたことにより、概念的にはES細胞、TS細胞、PrES細胞を組み合わせることで、胚盤胞を再構成できる可能性が示唆された。幹細胞のみで胚を作製する研究は、近年、幹細胞研究分野の中でも最も競争の激しいテーマとなったが、PrES細胞の樹立により、分野の発展はさらに加速すると予想される。生命発生現象を幹細胞間相互作用として捉え、理論を解明する技術的基盤が確立されたことにより、生命とは何かという人類の根源的問いを解き明かす糸口を作ることができた。

研究成果の概要（英文）：The blastocyst is composed of three cell lineages: preimplantation epiblast, trophoblast, and primitive endoderm. ES cells have been established from the preimplantation epiblast and TS cells from the trophoblast, but stem cells from the remaining primitive endoderm have not yet been established. We report the successful establishment of primitive endoderm stem cells in serum-free medium supplemented with FGF4, CHIR99021, and PDGF-AA. After all the cell lineage components necessary for the production of artificial blastocysts were prepared, we next produced early embryo organoids with ES cells, TS cells, and PrES cells, and transferred them into the uteri of pseudopregnant mice. These artificial embryos implanted efficiently and derived embryo-like structures surrounded by visceral yolk sac and parietal yolk sac-like structures.

研究分野：発生生物学

キーワード：原始内胚葉 胚盤胞 胚オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

我々の生命は唯一つの受精卵から派生する。受精卵は卵割を繰り返し、やがて胚盤胞と呼ばれる初期胚を形成する。胚盤胞は、着床前エピプラスト、栄養膜、原始内胚葉の3種類の細胞系譜で構成される数10個の細胞の集合であり、それぞれからは主に胚、胎盤、卵黄嚢が派生するが、このような単純な構造が個体生命を発生させる能力を保持する理論は解明されていない。しかし、近年の幹細胞研究分野の急速な発展によって、試験管内で幹細胞のみから初期胚オルガノイドを作製し、少数の細胞集団から生命が発生する現象を、幹細胞間相互作用の問題として捉え、解析・解明、更には人為的再構成に挑戦し得る時機が来ている。マウスにおいては、胚盤胞からは、従来、着床前エピプラストの幹細胞としてES細胞(Evans & Kaufman, *Nature* (1981))、栄養膜の幹細胞であるTS細胞(Tanaka et al, *Science* (1998))が樹立されていた。しかし、残る原始内胚葉の幹細胞は未樹立であった。原始内胚葉由来の細胞株としてはXEN細胞(extraembryonic endoderm cell)が知られていたが、胚盤胞への移植によっては壁側内胚葉の遠位領域にしか寄与できず、原始内胚葉の幹細胞としては不十分な性質しか保持していなかった。従って、幹細胞のみで胚盤胞を再構成するためには、ES細胞、TS細胞と共に、原始内胚葉の幹細胞を用いる必要があることが強く示唆された。

2. 研究の目的

胚盤胞を幹細胞のみで再構成可能とするためには、ES細胞、TS細胞に加え、原始内胚葉と同等の未分化性を保持する新たな幹細胞が必要であると考えられたため、本研究においては、1.残された原始内胚葉から高いキメラ寄与能を保持する原始内胚葉幹細胞(primitive endoderm stem cell, PrES細胞)を樹立すること、2.薬剤処理によって原始内胚葉を欠損した致死の胚盤胞を宿主として用い、PrES細胞を注入することで原始内胚葉系列の胚盤胞補完が可能であることを示すこと、3.試験管内でES細胞、TS細胞、PrES細胞を組み合わせることで胚オルガノイドを作製すること、4.それら胚オルガノイドの発生能を偽妊娠マウス子宮内に移植することで評価することにより幹細胞のみで胚盤胞を再構成可能とすることを目的としている。

3. 研究の方法

マウス胚盤胞において未分化な内部細胞塊の運命はFGFシグナリングによって制御されることが知られており、FGFシグナルをFGF4の添加等によって促進すれば強めれば原始内胚葉系列に、PD0235901等の低分子化合物によって抑制すればエピプラスト系列に分化することが知られていた。また内部細胞塊の増殖はGSK3阻害剤であるCHIR99021の添加により促進されること、原始内胚葉がPDGFの受容体を高いレベルで得意的に発現することが知られていた。我々は、FGF4の添加により、内部細胞塊の分化方向性を原始内胚葉に傾け、さらにCHIR99021、PDGF-AAを添加することによりPrES細胞を樹立できることを見出した。PrES細胞の幹細胞性を解析するために、胚盤胞への移植を行い、高い原始内胚葉系列へのキメラ寄与能を保持することを示した。PD0325901処理によって原始内胚葉を欠損させた胚盤胞を宿主として用いれば、原始内胚葉系列がPrES細胞によって補完されたキメラを作製できることを示した。さらに試験管内でES細胞、TS細胞、PrES細胞を組み合わせ、胚オルガノイドを作製し、偽妊娠マウス子宮に移植することによって、高効率に着床し、卵黄嚢様構造に囲まれた胚様組織を派生することを示した。しかし、今回の研究においては正常な胚発生能を再構成することには成功しなかった。

4. 研究成果

胚盤胞を構成する3つの細胞系譜のうち、これまで幹細胞が樹立されていなかった原始内胚葉からPrES細胞を樹立することができた。また、試験管内でES細胞、TS細胞、PrES細胞を組み合わせることによって、胚オルガノイドを作製し、子宮内で胚様構造を形成することができた。本成果は、主に以下の原著論文および講演で公表した。

原著論文

1) Ohinata Y, Endo AT, Sugishita H, Watanabe T, Iizuka Y, Kawamoto Y, Saraya A, Kumon M, Koseki Y, Kondo T, Ohara O, Koseki H. Establishment of mouse stem cells that can recapitulate the developmental potential of primitive endoderm. *Science* 375, 574-578 (2022)

招待講演

1)RIKEN BDR-CuSTOM Joint Organoid Symposium 2023年2月15日(神戸)

Establishment of mouse stem cells that can recapitulate the developmental potential

of primitive endoderm.

2)第 67 回日本生殖医学会学術講演会 2022 年 11 月 3 日(横浜)

マウスにおける原始内胚葉幹細胞の樹立及び試験管内胚様構造の作製

3)第 55 回日本発生生物学会シンポジウム 1(金沢市)、2022 年 6 月 1 日

Establishment of mouse stem cells that can recapitulate the developmental potential of primitive endoderm.

4)第 21 回日本再生医療学会総会シンポジウム 12(web 開催)、2022 年 3 月 17 日

マウスにおける原始内胚葉幹細胞の樹立及び試験管内胚様構造の作製

大日向康秀、

5)東京大学医科学研究所若手研究者シンポジウム (目黒区)、2022 年 3 月 15 日

Establishment of mouse stem cells that can recapitulate the developmental potential of primitive endoderm.

6)第 66 回日本生殖医学会総会 (米子市)、2021 年 11 月 11 日

マウスにおける原始内胚葉幹細胞の樹立

しかしながら、今回の研究で分かったこととして、従来の ES 細胞、TS 細胞に PrES 細胞を組み合わせるだけでは、発生能を保持するプラストイドを作製することはできず、これら幹細胞間で胚盤胞様の細胞間相互作用を再接続し、胚盤胞との同等性を実現するための、新たな課題も浮き彫りとなった。

近年、幹細胞および発生生物学の分野では、幹細胞を用いて、初期胚オルガノイドを作製し、人工的に生命を発生させることが現実的なテーマとなり、極めて注目される分野となった。PrES 細胞の樹立は、今後、初期胚オルガノイド形成分野において、胚発生能の再構成を成功に導く鍵となる可能性があり、世界的に注目されると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroki Sugishita, Takashi Kondo, Shinsuke Ito, Manabu Nakayama, Nayuta Yakushiji-Kaminatsui, Eiryu Kawakami, Yoko Koseki, Yasuhide Ohinata, Jafar Sharif, Mio Harachi, Neil P Blackledge, Robert J Klose, Haruhiko Koseki	4. 巻 12
2. 論文標題 Variant PCGF1-PRC1 links PRC2 recruitment with differentiation-associated transcriptional inactivation at target genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-24894-z	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 Ohinata Yasuhide, Endo Takaho A., Sugishita Hiroki, Watanabe Takashi, Iizuka Yusuke, Kawamoto Yurie, Saraya Atsunori, Kumon Mami, Koseki Yoko, Kondo Takashi, Ohara Osamu, Koseki Haruhiko	4. 巻 375
2. 論文標題 Establishment of mouse stem cells that can recapitulate the developmental potential of primitive endoderm	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 574-578
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aay3325	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9件（うち招待講演 6件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 大日向康秀、古関明彦
2. 発表標題 マウスにおける原始内胚葉幹細胞の樹立
3. 学会等名 第10回日本マーマネット研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大日向康秀、古関明彦
2. 発表標題 マウスにおける原始内胚葉幹細胞の樹立
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhide Ohinata
2. 発表標題 Establishment of primitive endoderm stem cells in mice.
3. 学会等名 IMSUT, International Joint Usage/Research Center-Young Researchers Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大日向康秀
2. 発表標題 マウスにおける原始内胚葉幹細胞の樹立及び試験管内胚様構造の作製
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会シンポジウム12 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大日向康秀
2. 発表標題 幹細胞による人工胚盤胞の作製
3. 学会等名 新学術領域研究「全能性プログラム：デコーディングからデザインへ」キックオフシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大日向康秀
2. 発表標題 原始内胚葉幹細胞の樹立と幹細胞による人工胚盤胞作製の試み
3. 学会等名 第42回分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大日向康秀
2. 発表標題 幹細胞による人工胚盤胞の作製
3. 学会等名 新学術領域研究「全能性プログラム：デコーディングからデザインへ」キックオフシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大日向康秀
2. 発表標題 Establishment of mouse stem cells that can recapitulate the developmental potential of primitive endoderm
3. 学会等名 日本発生生物学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大日向康秀
2. 発表標題 Establishment of mouse stem cells that can recapitulate the developmental potential of primitive endoderm
3. 学会等名 RIKEN BDR-CuSTOM Joint Organoid Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 原始内胚葉幹細胞誘導剤	発明者 大日向康秀、古関明彦	権利者 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-118733	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

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

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
---------	---------