

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21513

研究課題名(和文) 経胎盤細胞移植法と組織幹細胞欠損マウスを用いた異種間キメラマウス作製法の開発

研究課題名(英文) Development of cross-species chimeric mouse production method using transplacental cell transplantation method and tissue stem cell deficient mouse.

研究代表者

高橋 智 (Takahashi, Satoru)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50271896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：造血欠損マウスとしてTie-2-Cre;Runx1cK0を用いて、造血系をラットで置換したマウスの作製を行い、ラットの造血系のみを有するマウスを長期生存させることに成功した。本成果から、本方法により異種動物の造血系のみを有するマウスを作製できることを実証できたと考えられる。また、ヒトの造血幹細胞を用いて野生型マウスに移植した場合でも、成体においてもヒト造血細胞が維持されていることを明らかにした。また、膵臓を欠損するPdx1欠損マウスを用いてヒト膵臓の作製を試みた結果、Pdx1欠損マウスが生後8日目まで生存できること、そのマウスでは、ヒトインスリンのmRNAが検出できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物を用いたヒト臓器の開発は、胚盤胞補完法を用いて研究が進んでいるが、倫理的問題があること、ヒト幹細胞を用いた場合は、ヒト幹細胞が急速に排除されるなどの問題点が挙げられている。我々が開発した経胎盤細胞移植法はこれらの問題点を克服できる方法として学術的に重要であるとともに、動物を用いたヒト臓器の新たな作製方法として社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using Tie-2-Cre;Runx1cK0 as hematopoietic-deficient mice, we have successfully generated mice in which the hematopoietic system was replaced by that of rats, and mice with only the hematopoietic system of rats were successfully sustained for a long time. From these results, we think that we were able to demonstrate that mice with only the hematopoietic lineage of a heterologous animal can be generated by this method. We also demonstrated that human hematopoietic cells are maintained in adult mice even when human hematopoietic stem cells are transplanted into wild-type mice. We also attempted to generate human pancreas using Pdx1-deficient mice which lack pancreas and Human pancreatic progenitor cells. We demonstrated that Pdx1-deficient mice can survive up to 8 days of age and that mRNA for human insulin can be detected in these mice.

研究分野：発生工学

キーワード：キメラマウス ヒト化マウス 経胎盤 遺伝子改変マウス 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

実験動物学では、これまでの疾患モデル動物開発の歴史の中で、ヒト疾患と類似の症状を示す疾患モデル動物の開発と、ヒト細胞を有するヒト型モデル動物の開発が行われてきた。これらの開発はマウスを始めとして、近年ではゲノム編集技術の利用により、ブタやコモンマーモセットなどの家畜動物や霊長類までを含めて開発が行われるようになってきた。特にヒト型モデル動物は、これまでの新薬開発で大きな問題となっている、実験動物における薬効試験結果と臨床試験結果の大きなギャップ、いわゆる「死の谷」を渡るための最も可能性のある「架け橋」として期待されている。そのヒト型モデル動物として、最も早くから開発が行われていたのが、ヒト血球を有するヒト造血系マウスである。しかし、これまでのヒト造血系マウスの作製では、NOG や NSG マウスのような高度免疫不全マウスに、出生直後にブスルファンによりマウス造血細胞を傷害してヒトの造血系を移植する方法か、放射線照射を行い、マウス造血系を傷害した後にヒトの造血系を移植する方法が用いられてきた。いずれの方法においても、マウスの造血系が残存するために、100%のヒト造血細胞を有するマウスを作製することは困難だった。また、マウス本来の造血系があるために、移植したヒトの免疫系が機能すると組織傷害を起こすため、移植したヒト造血系の免疫は機能しないマウスしか生存できなかった。このように、これまでの方法では機能的な免疫系を有する異種間キメラマウスを作製することは困難であり、移植した異種細胞が機能するマウスを作製するためには、全く新たな作製方法が必要であった。一方研究代表者らは、これまでの研究の中で様々な遺伝子改変マウスの作製を行っており、Runx1 欠損マウスを始めとする組織幹細胞欠損マウスを作製してきた。これらの組織幹細胞を欠損するマウス胎児に、異種由来の細胞を移植した場合には、異種移植細胞は自己として認識され、生着するとともに、高いキメリズムが得られるとの着想に至った。本研究はこのような経緯で計画された。

## 2. 研究の目的

現在、ヒトを含めた異種の細胞を有するマウス（異種間キメラ）を作製する場合は、免疫不全マウスを用いて異種の細胞を移植することにより、異種細胞を有するキメラマウスを作製しているが、免疫不全マウスを使用する必要があること、高キメリズム個体が得られないことが問題となっている。本研究では、経胎盤細胞移植法と組織幹細胞を欠損する遺伝子改変マウスを用いることにより、ヒトを含めた組織幹細胞を用いた異種間キメラマウス作製法を開発することを目的として行われた。

## 3. 研究の方法

### 1) 経胎盤細胞移植法の開発

成体マウスに異種動物由来の細胞を移植した場合は、レシーピエントマウスの免疫により拒絶反応が起こるため、必ず免疫不全マウスをレシーピエントに使用する必要があった。免疫拒絶反応は、免疫系が完成する以前の胎児に異種細胞を移植することで、移植細胞が自己として認識されるため、回避できると考えられる。そこで、マウス胎児への細胞移植の文献を検索したところ、1979年に Fleischman RG.らが、マウス胎児への経胎盤的な造血細胞移植により、貧血マウスの治療に成功している論文があることを発見した (Fleischman RG. and Mintz B. PNAS. 1979)。この方法を用いて実際に細胞移植が可能かどうかを検討したところ、胎生 11.5 日のマウス胎児に移植が可能であることを確認した。この方法をさらに改良することにより異種細胞のマウス胎児への移植方法の確立を行った。

### 2) 組織幹細胞移植による高いキメリズムを実現するための組織幹細胞欠損マウスの利用

これまでの組織幹細胞移植による異種間キメラマウスの作製では、NOG マウスや NSG マウスのような高度免疫不全マウスに、ヒトなどの異種動物の細胞を移植する方法が用いられてきた。この方法ではマウス自体の細胞が残存するため、100%異種細胞を有するマウスを作製することは困難だった。そこで本研究では、遺伝子改変により、組織幹細胞を欠損するマウスの利用を検討した。その検証例として、造血幹細胞が存在しない遺伝子改変マウスを用いた。申請者らは、2007年に Runx1 欠損:GATA-1 プロモーターRunx1 Tg 部分レスキューマウス(造血幹細胞欠損マウス)を報告した。Runx1 欠損マウスは、二次造血に必須な造血幹細胞が Runx1 の欠損により形成されず、胎生 12.5 日に造血不全に伴う出血のために死亡するが、このマウスに GATA-1 プロモーター制御化に Runx1 を発現するトランスジーン (GATA-1 プロモーターRunx1 Tg) を導入することにより、卵黄嚢での一次造血を促進させ、造血幹細胞は依然として形成されないが、赤血球系だけが形成されて出生前後までマウスが生存できることを明らかにしている。このマウスを用いることにより、異種の組織幹細胞の経胎盤細胞移植法と組織幹細胞を欠損する遺伝子改変マウスを用いることにより、異種間キメラマウスを作製できることを検証した。

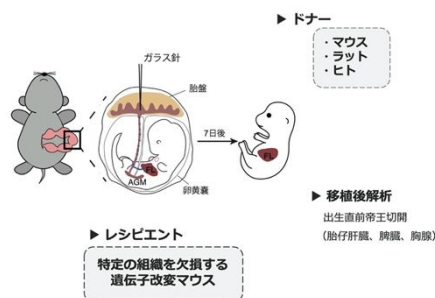
### 3) ラット由来造血幹細胞を用いた異種間造血キメラマウスの作製

本研究を実施するにあたり、最初から種間の距離が遠いヒトの造血細胞の移植を実施することはハードルが高いため、まず初めに Ly5.1/5.2 のシステムを用いてマウス同士の移植実験を行い、マウスで移植した造血細胞由来の血液細胞が確認できるかを観察する。予備的な実験では、出生直後のマウスでは、100%に近い移植したマウスの造血細胞の寄与率が確認できており、本方法が技術的に可能であることが示されつつあった。マウスでの移植データが確認された後に、ラットやヒト造血細胞の移植を行い、ラットやヒトの造血細胞を有するマウスの作製を行なった。

### 4) 経胎盤細胞移植法と膵臓幹細胞欠損マウスを用いた異種間膵臓キメラマウスの作製

本方法が造血系以外でも利用可能であることを明らかにするために、膵臓が形成されない Pdx-1 欠損マウスを用いて、ラット胎児やヒト iPS 細胞から分化誘導して単離した Pdx-1 陽性膵臓幹細胞を経胎盤的に移植し、ラットやヒト由来の膵臓が形成されるかを確認した。

図1 経胎盤移植法の確立



## 4. 研究成果

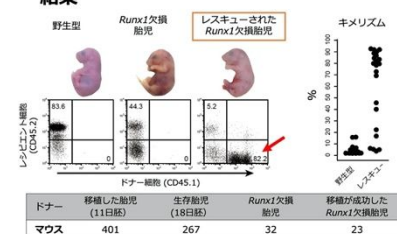
### 1) 経胎盤細胞移植法の開発

経胎盤移植法について、細胞を移植するためのガラス管を改良することで、効率良く細胞を移植する方法を確立することができた(図1)。細胞の移植時期についても、胎生 14.5 日から開始し、最終的には胎生 9.5 日のマウス胎児への移植が可能となった。胎生 9.5 日は様々な臓器の誘導が始まる時期であり、今後の幅広い応用が期待される。

### 2) 組織幹細胞移植による高いキメリズムを実現するための組織幹細胞欠損マウスの利用

次に、造血系を欠損するマウスとして Runx1 欠損 GATA-1 レスキューマウスを用いて、造血幹細胞を移植することで、造血系を再構築できるかを検討した。初めに、マウスの造血幹細胞を移植したところ、造血系を再構築することができた(図2)。そこで、種を超えて造血系の再構築が可能かを明らかにするために、ラットの造血幹細胞を移植した。その結果、ほぼ 100%に近いラットの造血系を有するマウスを作製することに成功した(図3)。Runx1 欠損 GATA-1 レスキューマウスは造血系にも異常があり、残念ながら出生直後に呼吸不全により死亡してしまったが、造血系を再構築したマウスの造血系を解析して、完全に機能的な造血系が再構築されていることを明らかにした。この成果を論文として発表した。

図2 Runx1欠損マウスへのマウス造血幹細胞移植結果



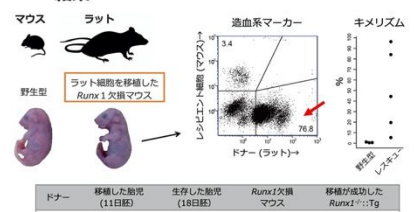
“高いキメリズムを示すRunx1欠損胎児を確認し、この個体は貧血や出血 (Runx1欠損胎児の表現型) が認められなかった”

→ 胎児への移植法を確立し、この方法によるドナー細胞の生着を確認した

### 3) ラット由来造血幹細胞を用いた異種間造血キメラマウスの作製

2020 年度の解析で、Runx1 欠損 GATA-1 レスキューマウスでは、造血系以外の異常もあり、増血系を 100% ラットで置換することができても、長期生存させることができなかった。そこで、Runx1 を造血系だけで欠損する Tie-2-Cre;Runx1cKO を用いて、造血系をラットで置換したマウスの作製を行った。その結果、ラットの造血系のみを有するマウスを長期生存させることに成功した。このことは、Tie-2-Cre;Runx1cKO を用いることにより、異種動物の造血系を有するマウスを作製できることを実証できたものと考えられる。また、ヒトの造血幹細胞を用いて、ヒト造血系を有するマウスの作製を試みた。その結果、野生型マウスに移植した場合でも、成体においてもヒト造血細胞が維持されていることを明らかにした。Tie-2-Cre;Runx1cKO にヒト造血幹細胞を移植した場合は、生存マウスを得ることができなかった。この結果は、ヒト造血細胞の増殖が十分ではなく、発生の早いマウスの生存を維持できるだけの血液細胞が得られないためと考えられる。

図3 Runx1欠損マウスへのラット造血幹細胞移植結果



“高いキメリズムを示すRunx1欠損胎児を確認し、ラット由来の血球細胞が生着していた”

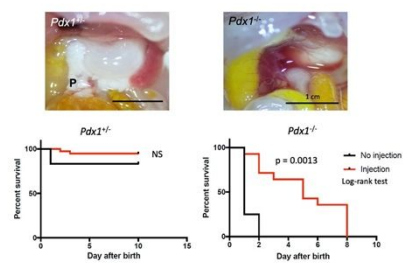
→ 胎児期の移植により、造血幹細胞領域処置を行うことなく異種由来細胞の生着が可能であることを証明した。

### 4) 経胎盤細胞移植法と膵臓幹細胞欠損マウスを用いた異種間膵臓キメラマウスの作製

膵臓を欠損する Pdx1 欠損マウスを用いてヒト膵臓を有するマウスの作製を試みた。その結果、出生直後に死亡する Pdx1 欠損マウスが生後 8 日目まで生存できること、そのマウスで

は、ヒトインスリンのmRNA が検出できることを明らかにした(図4)。この結果より、少なくともヒト細胞がマウス体内で維持されていると考えられる。また、ヒト細胞を移植したマウスには、ヒト細胞に対する免疫寛容が誘導されていること、混合リンパ球培養法により明らかにした。

図4 *Pdx1*欠損マウスへのヒトiPS細胞由来膵臓前駆細胞移植結果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jeon Hyojung, Asano Keigo, Wakimoto Arata, Kulathunga Kaushalya, Tran Mai Thi Nhu, Nakamura Megumi, Yokomizo Tomomasa, Hamada Michito, Takahashi Satoru	4. 巻 11
2. 論文標題 Generation of reconstituted hemato-lymphoid murine embryos by placental transplantation into embryos lacking HSCs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83652-9	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

マウス胎仔の血液を他種のものに置き換えることに成功 <a href="https://www.tsukuba.ac.jp/journal/medicine-health/20210225140000.html">https://www.tsukuba.ac.jp/journal/medicine-health/20210225140000.html</a>
--

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