

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670388

研究課題名(和文)「胚盤胞補完による異種キメラ臓器再生」～マウス生体内にラット幹細胞由来心臓を作製

研究課題名(英文) Inter-specific organ formation using blastocyst complementation: creation of rat-pluripotent stem cell-derived heart in mouse

研究代表者

李 鍾國 (LEE, JONG-KOOK)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：60303608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：心臓形成転写因子Nkx2.5^{+/-}マウス同士を交配し、2.5dpcの受精卵を採取し、DsRed標識マウスES細胞を培養、の受精卵に、のES細胞を注入し、仮親マウス子宮に移植。得られた胎仔におけるDsRed陽性細胞の分布を調べたところ、同種キメラの形成が観察された。同種キメラ胎仔の全身臓器を固定し、DsRed標識ES細胞の分布を調べた。その結果、一部マウスで比較的心臓に限局したDsRed蛍光が観察された。ただし、Nkx2.5^{-/-}受精卵は得られていなかった。蛍光標識ラットiPS細胞由来心筋細胞の電気生理特性をライブセルイメージングシステムを用いて観察評価した。

研究成果の概要(英文)：#1: Nkx2.5 hetero knockout(Nkx2.5^{+/-}) mice were mated and fertilized eggs were harvested at 2.5 dpc. #2: DsRed expressing murine ES cells were prepared. #3: DsRed expressing murine ES cells were injected into the Blastocysts of mated Nkx2.5^{+/-} mice. #4: In vivo and in situ analyses using fluorescent stereoscopic microscope showed that intra-specific chimeric mice were obtained. #5: After the fixation or organs including hearts, in vitro analyses showed that DsRed-positive cells existed relatively confined to the heart in several mice, which suggested the formation of intra-specific chimeric hearts was feasible. However, genotyping of DsRed negative cells (which were originated from fertilized eggs of mated Nkx2.5^{+/-} mice) isolated from embryonic liver showed that Nkx2.5^{-/-} mice was not obtained. #6: Electrophysiological analysis of rat iPS cell-derived cardiomyocytes were conducted for the ongoing analysis of the inter-specific chimera between rats and mice.

研究分野：再生医学、循環器内科学

キーワード：胚盤胞補完 キメラ動物 発生工学 臓器創成 心臓

1. 研究開始当初の背景

東京大学医科学研究所中内教授らのグループは、膵臓が形成されないマウスPdx1欠損 (Pdx1^{-/-})の受精卵(胚盤胞)にラット由来のiPS細胞を注入し、ラットの膵臓を有するマウスの作製を報告した(Kobayashi et al. Cell 2010) (図1)。このことは、臓器形成転写因子欠損動物の受精卵に、正常動物由来の未分化多能性幹細胞を注入することにより生体内に臓器が形成される可能性、すなわち「胚盤胞補完による異種キメラ臓器構築」の可能性を世界に先駆けて示している。

2. 研究の目的

本研究においては、心臓形成転写因子欠損マウス(Nkx2.5^{-/-})の受精卵に野生型ラット由来iPS細胞を移植し、異種動物由来の心臓再生の可能性を探求することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)同種キメラマウスの作成

異種キメラマウス作成上で必要となる技術を確認するために、同種キメラマウス作成実験を以下の方法で施行した。

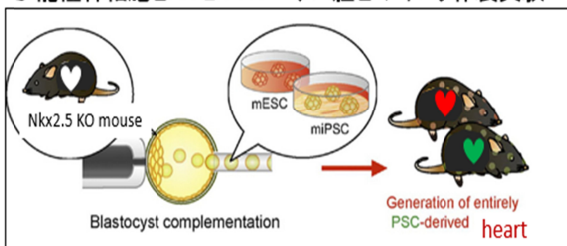
心臓形成転写因子欠損マウス：Nkx2.5 ノックアウトマウスの分与を受け、繁殖。ヘテロマウス同士をメイティングし、2.5dpcの受精卵(8細胞期)を採取。液体窒素(液相)で保存した。

マウス蛍光標識ES細胞：DsRed標識ES細胞を未分化状態で維持培養。(本細胞株においては、発生の全段階でDsRedが発現する。)

胚盤胞にES細胞注入：上記で採取した受精卵を胚盤胞まで培養し、のES細胞を顕微鏡下で注入する。その後、仮親マウスの子宮に移植(図1)。

図1

多能性幹細胞とNkx2.5 KOマウス胚とのキメラ作製実験



(2) 同種キメラマウス心の形態・機能評価

(in vivo実験)：仮親マウス子宮内に移植した受精卵について移植後14日で取り出し実体蛍光顕微鏡を用いて全身、胸部などのDsRed陽性細胞(マウスES細胞由来)の分布を調べる。この胎仔は17.5日胚(17.5E)に相当する。

(3) 同種キメラマウス心の形態・機能評価

(in vitro実験)

仮親マウス子宮内に移植した胎仔の心臓および全身臓器を固定、凍結切片を作成し蛍光免疫染色画像を撮影する。

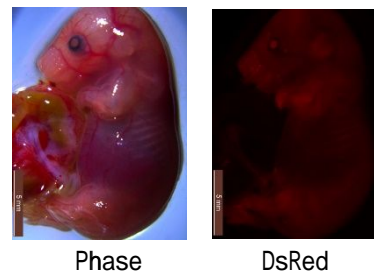
DsRed陽性細胞の分布を調べる。

キメラを形成しているDsRed陽性細胞の心臓特異的トロポニンI、アルファアクチニンなどの発現を調べる。

4. 研究の成果

(1) 同種ES細胞注入後の胚盤胞を約40個移植した結果、仮親胎内で17.5E相当の大きさまで育っていたのは6匹で、そのうち4匹にキメラ形成が認められた。マウスES細胞由来細胞(DsRed陽性細胞)はほぼ全身の表皮に分布し、特に四肢と頭部で強い傾向があり、胎盤にはES細胞は寄与していない事も確認された(図2)。仮親マウスの子宮内には明らかに未熟である胎仔1匹と胎盤11個も認められた。移植した受精卵が17.5Eにまで正常に成育する割合は15%、キメラを形成した割合は10%程度であった。

図2 移植胎仔(17.5E)表皮におけるキメラ形成

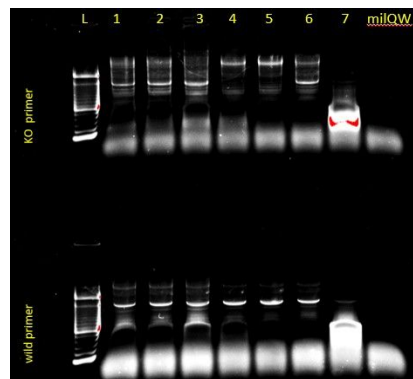


(2)表皮にDsRed陽性細胞の寄与が高いキメラマウスの一部で、比較的心臓に局限したDsRed蛍光が観察され、胚盤胞に注入したES細胞によるキメラ形成が行われている様子を観察記録した(図4-1)。心臓のほぼ全体にDsRed陽性細胞が分布している個体と、心房部分のみに分布している個体が認められた。

次にその肝臓から細胞を単離しFACSによりDsRed(-)細胞(すなわち交配マウスの受精卵由来、宿主卵子由来)を採取し、Nkx2.5のジェノタイピングを行った結果、Nkx2.5(+/-)ヘテロノックアウトマウス4匹、ワイルドタイプマウスNkx2.5(+ +)2匹であった。Nkx2.5(-/-)のホモノックアウトマウスは認められなかった(図3)。

図3 ジェノタイピング結果

1,2,3,6 ; Nkx2.5 (+/-) 4,5;WT
7;発達不良未熟個体(明らかに異常なバンド)

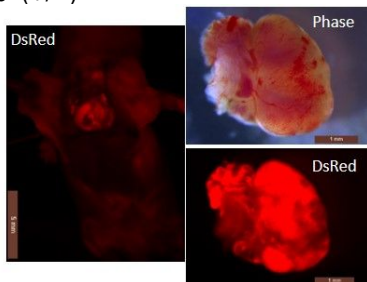


(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)を使用し、複数ページの場合には両面印刷すること。

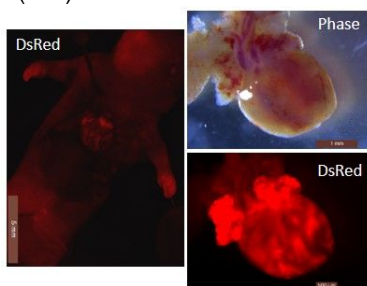
キメラ形成率は、Nkx2.5(+/-)マウス心臓でDsRed陽性細胞の占める範囲がNkx2.5(+/+)マウス心より多い傾向があった(図4-1~5)。ただしNkx2.5(+/-)マウス心でもキメラを形成していない場合もあり(図4-6)注入細胞の寄与率の違いが何によるのかは不明である。さらに検体数を増やしてホスト受精卵の遺伝子型によるキメラ形成率との相関を解析する必要がある。

図4 移植胎仔(17.5E)心臓におけるキメラ形成

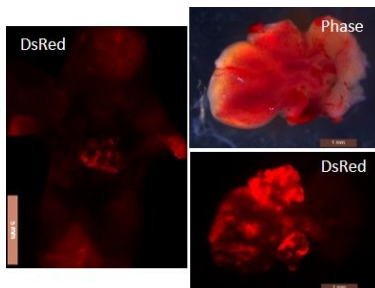
1 Nkx2.5 (+/-)



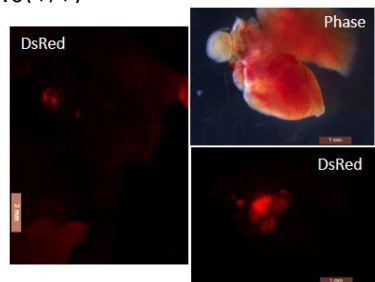
2 Nkx2.5 (+/-)



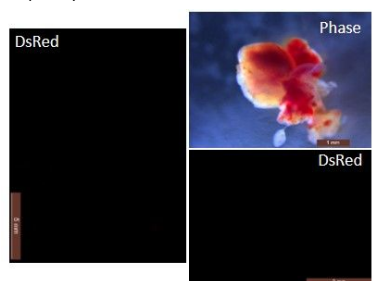
3 Nkx2.5 (+/-)



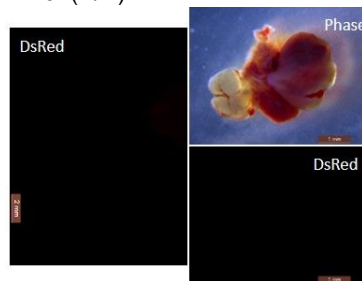
4 Nkx2.5(+/+)



5 Nkx2.5(+/+)



6 Nkx2.5 (+/-)



さらにキメラ形成心臓全体で自己拍動が記録され、機能的にも寄与している可能性が示唆された。

(3) 同種キメラマウス心の形態を詳細に調べるために凍結切片の蛍光免疫染色標本を作製し、低倍率画像を蛍光実態顕微鏡で(図5)、高倍率画像を共焦点蛍光顕微鏡で(図6)観察した。

図5 同種キメラマウス心臓のDsRed陽性細胞の分布と心筋特異的アルファアクチニン蛋白の発現

Nkx2.5 (+/-)

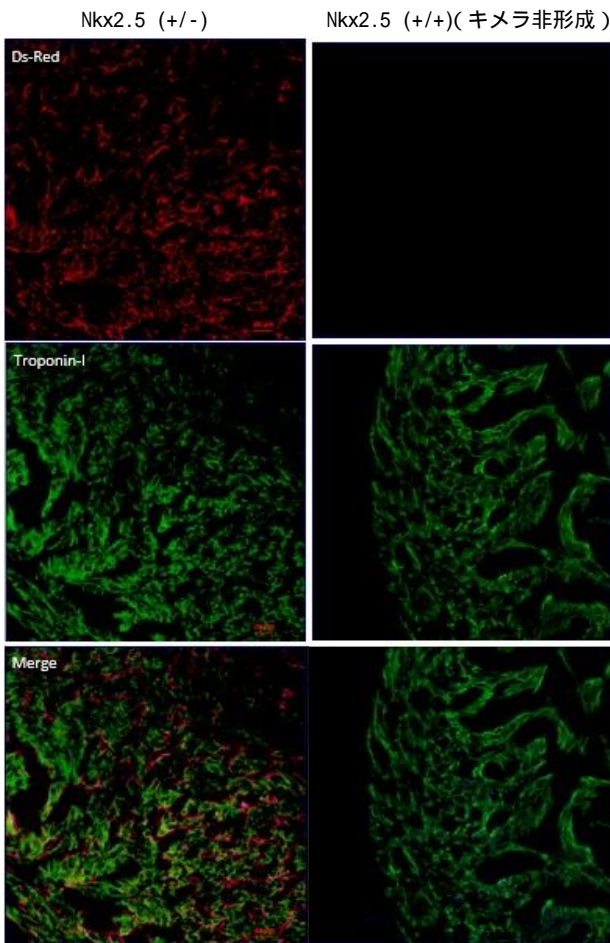


DsRed陽性細胞が心臓の組織の中にモザイク状に組み込まれて、心筋の構造タンパクであるアルファアクチニンを発現しており、ホスト受精卵細胞と一体化して臓器を形成していることが認められた(図5)。

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)を使用し、複数ページの場合には両面印刷すること。

さらにキメラ形成DsRed陽性細胞の形状と心筋特異的トロポニンIの発現を共焦点顕微鏡で撮影し観察をしたところ、ホスト受精卵細胞と同様に発現していることが認められた(図6)。

図6 同種キメラマウス心臓のDsRed陽性細胞の分布と心筋特異的トロポニン蛋白の発現



(4)以上の結果より、同種キメラマウス心の形態は、ホスト受精卵細胞と注入されたDsRed陽性ドナー細胞が形態的にモザイク状に分布し、機能を持つ心臓を正常に形成する可能性が示唆された。

心臓形成転写因子ヘテロ欠損マウス(Nkx2.5 +/-)の受精卵に野生型マウス由来ES細胞を移植した場合、WTに注入した場合より寄与率が増加する傾向がある。Nkx2.5-/-ホモ欠損ホストマウスでの寄与率を確認する必要がある。

さらに同種キメラマウスは、仮親の胎内で成長して出産後2日まで生存することは確認しているが、長期に生育させた場合の形態を解析する必要がある。

(5) 胚盤胞補完法により異種キメラ動物が作成された場合の、異種動物由来の細胞がどのような機能を示すかを調べるために、マウス胚盤胞にラットiPS細胞を注入して得られる、異種動物キメラ細胞の機能を解析することを目的として、ラットiPS細胞の培養：ラット蛍光標識iPS細胞を未分化状態で維持培養後、心筋細胞への分化・誘導を行い、ラットiPS

細胞由来心筋細胞の電気生理特性を、ライブセルイメージングシステムを用いて観察し・評価を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Yasui H, Lee JK, Yoshida A, Yokoyama T, Nakanishi H, Miwa K, Naito AT, Oka T, Akazawa H, Nakai J, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I. Excitation propagation in three-dimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix. *Bio materials*. 査読有、2014;35(27):7839-50. DOI: 10.1016/j.biomaterials.

Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Yoshida A, Kashiya N, Kawamura A, Ito E, Saito A, Maeda A, Eguchi H, Toda K, Lee JK, Miyagawa S, Sawa Y. N-glycans: phenotypic homology and structural differences between myocardial cells and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One*. 査読有、2014 Oct 30;9(10):e111064. doi: 10.1371/journal.pone.0111064. eCollection 2014. PMID: 25357199

6. 研究組織

研究代表者

李 鍾國 (LEE, Jong-Kook)

大阪大学・大学院医学系研究科・心血管再生医学寄附講座・寄附講座准教授

研究者番号：60303608

研究協力者

三輪 佳子 (MIWA, keiko)

大阪大学・大学院医学系研究科・心血管再生医学寄附講座・特任研究員

研究者番号：90630476