

動物発生環境を利用したヒト臓器創出

東京薬科大学生命科学部 再生医学研究室

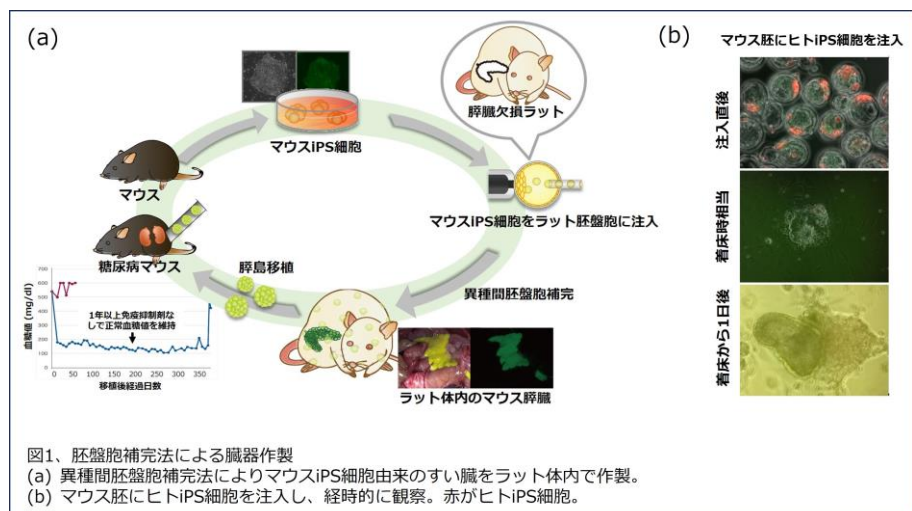
山口 智之

【目的】

臓器移植におけるドナー不足は深刻であり、日本臓器移植ネットワークの2020年の統計によると、14000名以上の移植希望者のうち78名しか臓器移植を受けることができなかった。この問題を解決する為には臓器を作出する手法の開発が喫緊の課題である。その臓器を作出する為のソースとして期待されているのが、人工多能性幹細胞（iPS細胞）である。iPS細胞は胎盤を除くすべての細胞系譜に分化可能であり、実際に加齢黄斑変性症には網膜色素細胞、心不全には心筋シートなど、iPS細胞をin vitroで分化誘導した細胞が治療に用いられている。自分の病気を自分自身の細胞で治療しようとする、まさに究極の再生医療が実現しようとしている。しかし、iPS細胞から、in vitroにおいて3次元構造をもつ機能的な臓器の創出は未だ成し遂げられていない。なぜなら臓器が形作られるには発生過程における非常に複雑な細胞間相互作用が必要であり、それをin vitroで再現できないからである。一方で、多能性幹細胞や組織前駆細胞はin vivoでは体内環境から適切な刺激を受け、臓器や組織を形作ることが可能である。そこで、本研究では多能性幹細胞由来の膵前駆細胞を膵臓欠損マウス胎仔に移植し、マウスの発生環境を利用してヒト膵臓を創出することを目的とした。

我々は iPS 細胞から機能的な臓器を作製するために、動物の発生環境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る。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, Nature2017) (図1 a)。

ヒト臓器作出をめざし、同様の手法でヒト iPS 細胞をマウスの胚盤胞に注入したところ、ヒト細胞は in vitro で 24 時間以内（着床後 24 時間相当）にすべて死亡した (図1 b)。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 iPS 細胞の発生ステージの違い、2つ目は、膜分子の種特異性、3つ目は、発生原理の種特異性である。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いうことであり、これが胚盤胞補完法をヒトに応用する際の最大の問題点である。一方で、発生後期（着床から4日以降）に細胞を注入した場合、正常に分化するとの報告がある (Yamanaka et al, NatCommun2017, Svoboda et al, Proc Natl Acad USA2019)。そこで、発生原理の種間互換性の高い発生後期（着床から4日以降）の胚に、卵黄静脈経由で宿主胚と同等の発生段階に分化誘導した臓器前駆細胞を注入することで、レシピエント動物の標的臓器にヒト細胞を生着させ、キメラ動物の作出および臓器欠損動物体内での



ヒト臓器創出を目指した。

【結果】

1. 本研究では、細胞移植の手法が確立されている肝臓を標的臓器として肝臓作製を試みた。マウス肝臓は胎生9日目頃に前腸内胚葉が肝芽細胞に分化することで始まる。胎生10日目ころには肝芽細胞は横中隔間充織に浸潤し、肝臓の器官原基が形成される。同時期に臍帯静脈および卵黄静脈の血管内皮細胞が横中隔間充織内で分裂、伸長することで血管網を形成し、その内皮細胞が肝芽細胞の横中隔間充織への浸潤を促す。従って、臓器内に血管網が形成される前のマウス胎生9~10日頃に、臍帯静脈または、卵黄静脈経路で肝臓原器を移植することで、目的領域に到達させることが可能であり、発生環境も肝臓の構造的および機能的成熟に適していると考えた。マウス胎仔への細胞

注入手技を確立するために、胎生10~14日齢のマウス胎仔に卵黄静脈経路または胎盤経路で20um径の大きさの蛍光ビーズを注入し、全身の臓器への分布を確認した。初めに、胎生14.5日齢のマウスの卵黄静脈経路で胎仔に蛍光ビーズを注入し、胎生16.5日で蛍光の分布を確認したところ、肝臓を含む全身に分布していることが分かった。この注入法では胎仔の生存率は20%で、蛍光が観察できた胎仔の割合は5%だった。臓器形成が始まる胎生10.5日でも蛍光ビーズの注入を試みたが、卵黄静脈の血管径が注入に使用した針よりも

細く注入が困難であった。次に、胎生10.5日齢の胎仔に胎盤経路で蛍光ビーズを注入し、胎生16.5日齢で蛍光を観察したところ、卵黄静脈経路と同様に肝臓を含む全身で蛍光が観察された(図2)。胎盤経路での移植法では胎仔の生存率は66%、蛍光が観察された胎仔の割合は19%と卵黄静脈経路よりも生存率、蛍光陽性の胎仔の割合、どちらも高く、さらに、臓器形成が始まる胎生10.5日での注入も可能であることから、マウス胎仔への移植法は胎盤経路の移植法と決定した。

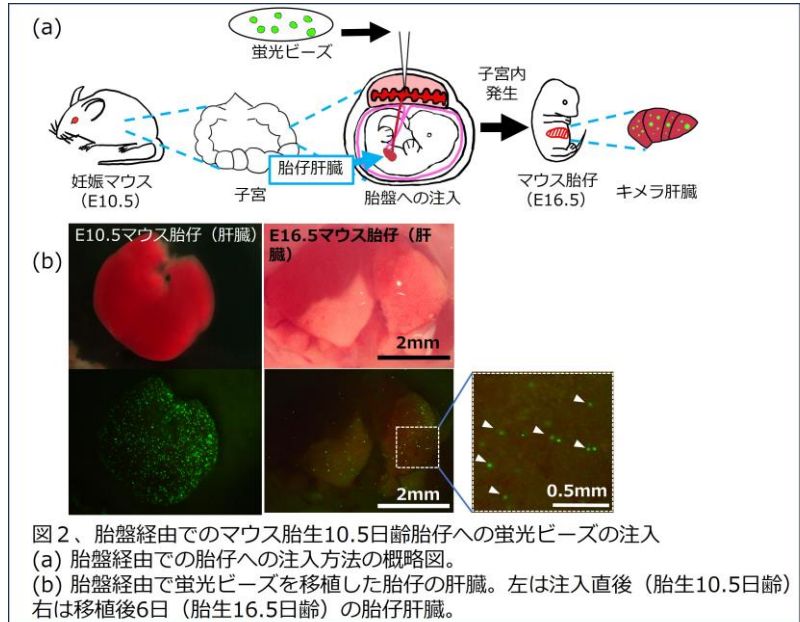


図2、胎盤経路でのマウス胎生10.5日齢胎仔への蛍光ビーズの注入
(a) 胎盤経路での胎仔への注入方法の概略図。
(b) 胎盤経路で蛍光ビーズを移植した胎仔の肝臓。左は注入直後(胎生10.5日齢) 右は移植後6日(胎生16.5日齢)の胎仔肝臓。

2. 結果1. から臍帯静脈が直接流入する肝臓を標的臓器に絞った。胎仔肝臓は造血器官であることから、蛍光ビーズの代わりにマウス骨髄細胞を胎盤経路の注入法により移植し、生着可能かどうかを検証した。胎生10.5日

齢のマウス胎仔に胎盤経路で8週齢以降の成熟したGFPトランスジェニックマウスの骨髄細胞由来の単核細胞(2x10⁵個/胎仔)を注入し、移植4日後の胎生14.5日齢で肝臓における移植した骨髄細胞由来細胞の生着を確認した。その結果、167個体中27個体の肝臓において緑色蛍光が観察された(図3 a, b)。また、肝臓をコラゲナーゼで分散させたのち、フローサイトメーターでヒトのCD45陽性血液細胞の存在を確認したところ、約0.2%~0.3%の頻度でヒトの血液細胞が

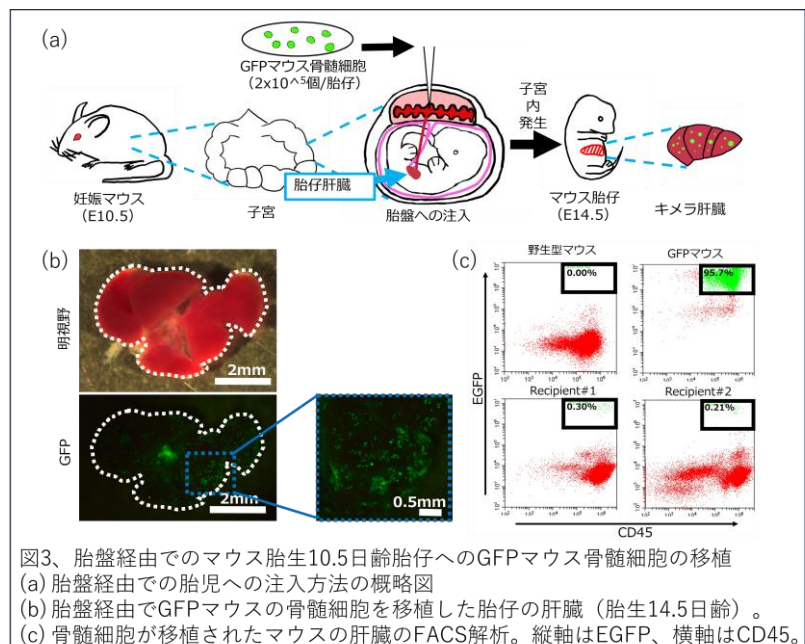


図3、胎盤経路でのマウス胎生10.5日齢胎仔へのGFPマウス骨髄細胞の移植
(a) 胎盤経路での胎仔への注入方法の概略図
(b) 胎盤経路でGFPマウスの骨髄細胞を移植した胎仔の肝臓(胎生14.5日齢)。
(c) 骨髄細胞が移植されたマウスの肝臓のFACS解析。縦軸はEGFP、横軸はCD45。

検出された (図3 c)。この結果から、胎生10.5日齢のマウス胎仔胎盤経由で造血前駆細胞を移植することで、臍帯静脈から造血前駆細胞が肝臓に注入され、胎仔肝臓に生着可能であることが分かった。

3. マウス胎仔肝臓中のDelta-like 1 homolog (Dlk1)陽性細胞は、肝細胞と胆管細胞に分化可能な bi-potentな肝前駆細胞である。そこで、GFPトランスジェニックマウスよりこのDlk陽性マウス胎仔肝臓由来肝前駆細胞を分離し、胎盤経由で胎生10.5日齢のマウス胎仔に移植することで (1000~6000個/胎仔)、

肝前駆細胞が生着可能かどうかを検証した。肝前駆細胞移植後12日目の生後1日目に移植したマウスの肝臓を観察すると、肝臓全体に一樣にGFPの蛍光を確認することができた (図4 a, b)。さらに、この肝臓の切片を胆管マーカーである Cytokeratin19 (CK19) および肝細胞マーカーである hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4a) で免疫染色したところ、GFP陽性かつCK19陽性の細胞およびGFP陽性かつHNF4a陽性の細胞がそれぞれ確認された (図4 c)。

この結果から、胎生10.5日齢のマウス肝臓に肝前駆細胞を移植することで生着し、肝細胞、胆管細胞に分化できることが明らかとなった。

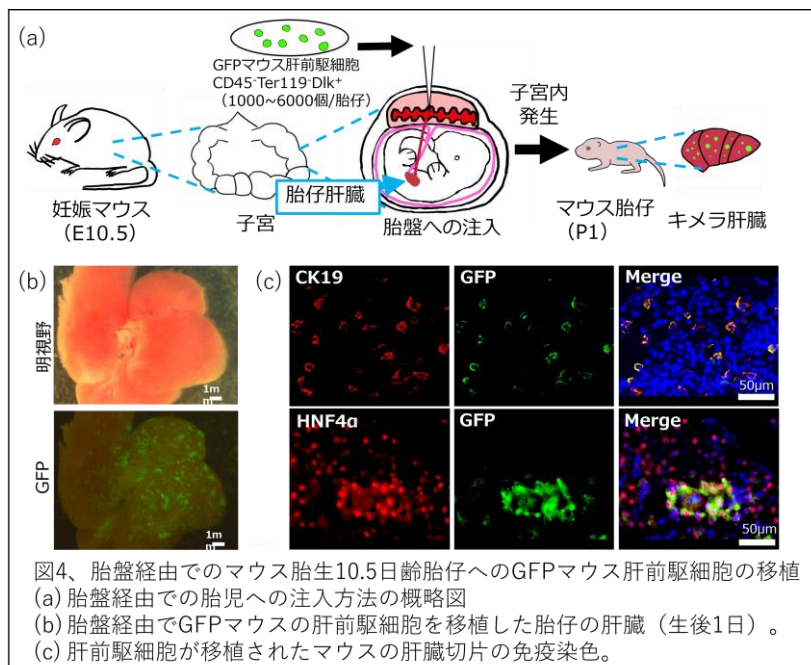


図4、胎盤経由でのマウス胎生10.5日齢胎仔へのGFPマウス肝前駆細胞の移植
(a) 胎盤経由での胎児への注入方法の概略図
(b) 胎盤経由でGFPマウスの肝前駆細胞を移植した胎仔の肝臓 (生後1日)。
(c) 肝前駆細胞が移植されたマウスの肝臓切片の免疫染色。

【考察】

本研究により、マウスの臓器形成が始まる胎生10.5日齢のマウス胎仔に肝前駆細胞を移植することで、胎仔肝臓に生着し、胆管および肝細胞に分化できることが分かった。胎仔肝臓に肝前駆細胞を移植し、ホストマウスの発生環境に協調して分化増殖させ、臓器形成させるには、胎生9.5~10.5日齢の臓器形成開始時にホストとレシピエントの肝前駆細胞が共存している必要がある。胎仔肝臓への細胞移植法は、肝臓直接注入法、卵黄静脈経由の移植、胎盤経由の移植の3種類が考えられるが、上記条件を満たすことができるのは、胎盤経由の移植だけであり、この手法により移植細胞由来の胆管をもつ肝臓の形成が期待できる。一方で、異種間のキメラ作製においては免疫制御が重要である。ルドワランらは、免疫系構築前の胎仔に異種細胞を移植して生着させるためには胸腺の同時移植が必要だということを報告している。さらに、我々の過去の研究において、ラット胚盤胞にマウスiPS細胞を注入することで作製したラット-マウス異種間キメラにおいても全身で拒絶反応が観察されている。本研究も免疫系構築前の移植であるが、拒絶反応なくヒトの細胞を生着させるには、ホスト動物を免疫不全動物にする、もしくはドナー細胞が免疫系で攻撃されないようにMHCを欠損させ、NK細胞による攻撃を回避できるように抑制シグナル分子を発現させるなどの処置が必要である。今後は、拒絶反応回避処置の検討、生着率の向上、ヒトiPS細胞から様々な段階に分化誘導した細胞を移植することで移植細胞の最適化を行い、臓器欠損動物などの発生ニッチが空いているマウスをレシピエントとし、マウス体内でのヒト臓器作製を目指したい。

【謝辞】

本研究遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に心より感謝申し上げます。