

# 日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 事後評価報告書

## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 動物生体内環境を利用した移植用ヒト臓器の開発  
(英語) Generation of transplantable human organs using animal in vivo environment

研究開発実施期間：令和2年9月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 中内 啓光  
(英語) Hiromitsu Nakauchi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 東京医科歯科大学 高等研究院 特別荣誉教授  
(英語) Tokyo Dental and Medical University, TMD-Advanced Research Institute, Distinguished Professor

## II 研究開発の概要

移植用臓器は世界的に不足しており、特に臓器提供者が低水準に留まる我が国においては臓器移植を受けることは一層困難である。再生医療的アプローチによるこのアンメットメディカルニーズの解決が期待されるが、現在の細胞培養技術では培養下で移植に用いられるサイズのヒト臓器を作製することは不可能である。このような背景から、研究代表者らは動物体内で移植用ヒト臓器を作出する研究に従事してきた。これまでに、個体発生のプロセスを経ることで正常な構造・機能を有する多能性幹細胞由来臓器を作製できること (Kobayashi et al. *Cell* 2009; Matsunari et al. *PNAS* 2013)、異種体内で作製された多能性幹細胞由来自家臓器を移植することで、免疫抑制剤なしに糖尿病疾患モデル動物の血糖値を生涯に亘って正常化できること (Yamaguchi and Sato et al. *Nature* 2017) を報告してきた。本技術の実用化に向けては旧動物性集合胚指針にてヒト→動物キメラ胚の子宮内発生が禁じられていたことが障壁となっていたが、2019年3月の改定により動物子宮内での発生・出生が可能になり、実用化研究への環境が整った。以上の経緯から、本研究開発課題ではヒト→動物キメラ個体を出生させ、当該動物体内で機能的なヒト臓器

を作出することを最終目標に研究を進めた。ヒトへの移植に十分なサイズの臓器を作出するには、臓器サイズがヒトに近く多胎であるブタを宿主とすることが望ましいが、飼育スペースとコスト・妊娠期間の長さからブタ胚でトライ&エラーを行うことは困難である。そのため、ヒト→マウスキメラにて技術開発を進め、開発された技術を順次ブタ胚で評価する研究体制を採った。

まず我々はヒト→マウスキメラ個体を出生させることに取り組んだ。ドナー細胞と宿主胚のキメラ形成には両者の間にある程度の発生段階の一致が必要である。従来型のヒト ES 細胞/iPS 細胞は着床後エピブラストに相同な発生段階まで分化が進んでいることが知られており、マウス着床前胚に移植してもアポトーシスを引き起こし着床直後である E6.5 までには消失してしまう。そこで細胞死阻害因子である *BCL2* を強制発現させたところ、ドナーヒト iPS 細胞の生存を E10.5 まで延長させることに成功した。更にドナーヒト iPS 細胞の生存期間を伸ばすために様々な因子を共発現させたところ、遺伝子 X を共発現させたヒト iPS 細胞 (*BCL2;X*-hiPSC) を有するヒト→マウスキメラの出生を達成することができた。ただし、生存したヒト細胞は宿主組織と完全に分離した自己凝集塊を形成しており (図 1)、ヒト→マウス間の協調的組織形成が次の課題とな

図1. *BCL2;X*-hiPSC → マウスキメラ の出生

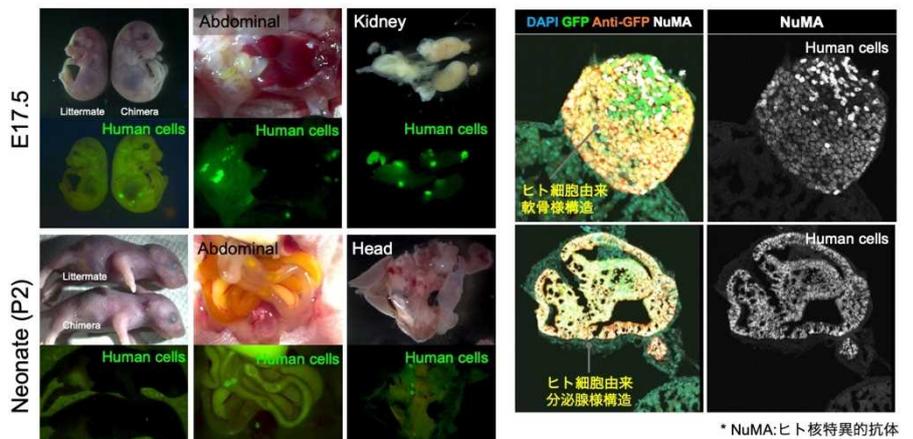
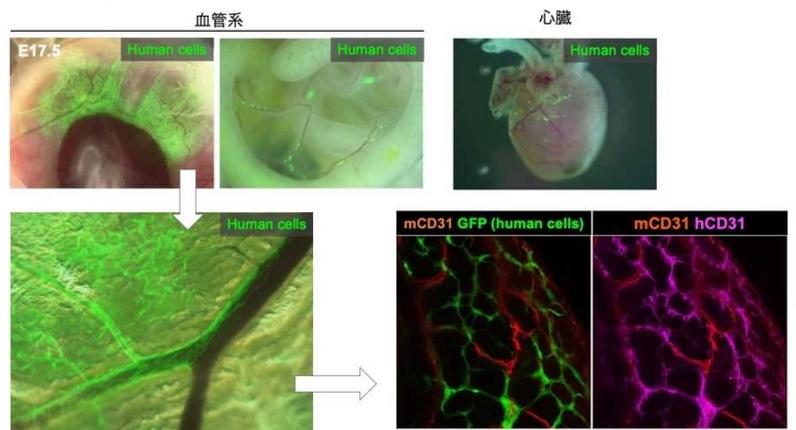
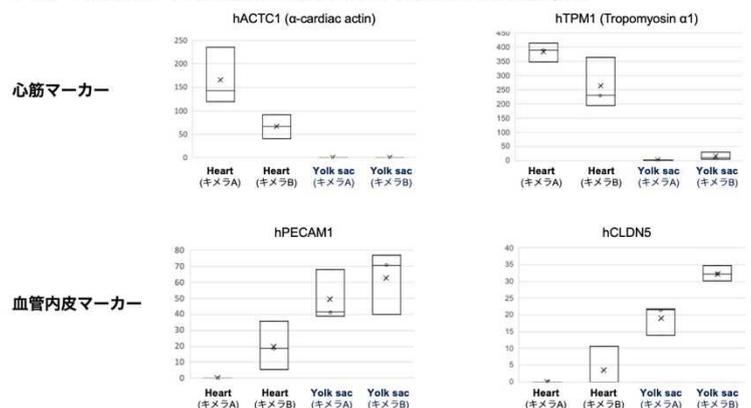


図2. *BCL2;Y*-hiPSC → マウスキメラ の心血管系における協調的組織形成



● ヒト→マウスキメラ E12.5胎仔から採取したヒト組織に対するRNAseq解析



った。

遺伝子 X に類似した機能を持つ候補遺伝子群を *BCL2* と共発現させたところ、遺伝子 Y と *BCL2* の強制発現株 (*BCL2;Y*-hiPSC) が心血管系において協調的組織形成を示した (図 2)。組織学的解析からドナーヒト細胞はホストマウス細胞と協調的に血管網を形成しており、心臓から採取されたヒト細胞は拍動し心筋特異的機能分子を発現していた。また、血管網・心筋についてドナーヒト細胞の遺伝子発現プロファイルを確認したところ、血管網から採取されたヒト細胞からは血管内皮細胞特異的なマーカー遺伝子の発現が認められる一方で心筋マーカー遺伝子の発現はみとめられられず、心臓から採取された細胞は同様に心筋マーカー遺伝子のみを発現していた。以上の証拠から、*BCL2;Y*-hiPSC は周囲の同系譜(心筋あるいは血管内皮)のマウス細胞と共に協調的に組織を形成したと確認された。*BCL2;Y*-hiPSC 由来ヒト→マウスキメラ個体は出生させることも可能であった。また、*BCL2;Y*-hiPSC をブタ胚に移植したところ、E15 胎仔にてドナー細胞が生存していることが確認され(図 3)、ヒト→ブタキメラにおいてもその後の発生段階でヒト→マウスキメラと同様に協調的組織形成ができると期待される。

最終目標であるヒト膵臓を有するヒト→マウスキメラ作出のためには、心血管系ではなく膵組織における協調的キメラを形成する必要がある。*BCL2;Y*-hiPSC 由来ヒト→マウスキメラにおいて、ドナーヒト細胞はほぼ心血管系のみへの寄与を示した。このメカニズムを解明するために各発生段階でのドナーヒト細胞の挙動を検証したところ、遺伝子発現プロファイルから、移植された *BCL2;Y*-hiPSC がマウス胎仔環境下でホスト胎仔の心血管系形成より先に心血管系前駆細胞に分化していることが明らかになった。*BCL2;Y*-hiPSC 由来細胞は心血管系に分化したまま胎仔内で生存し、心血管形成のタイミングで協調的な組織形成を開始したと考えられる。*BCL2;X*-hiPSC 株の結果 (図 1) 等から、接着因子等の改変によってヒト-マウス細胞間の親和性を高める必要性を想定していたが、少なくとも心血管系形成では異種間の細胞表面分子の立体構造の差は大きな影響を及ぼさないことが明らかになった。過去にも発生過程の胎仔にヒト細胞を移植し領域特異的な協調的キメラを形成する報告がある一方、着床前胚のような発生初期には同質の細胞が集合するように自律的に制御されていることが知られている (図 4)。すなわち、異種間キメラを阻害する“異種の壁”は発生初期に非常に高く、発生の進行に伴い次第に影響が減衰してくると考えられる。以上から、ヒト→動物キメラにおいてヒト細胞の膵臓への寄与およびヒト膵臓形成は、マウス胎仔内で膵臓形成期よりも早く *BCL2;Y*-hiPSC を膵臓系譜へと分化誘導することにより達成できると想定される (図 4)。現在はドナーヒト細胞のマウス胎仔内での膵臓系譜への誘導方法について技術開発を進めている。

また、本研究開発課題を進める過程では、ホスト胚 *Igf1r* KO によるドナー細胞のキメリズム向上 (Nishimura et al. *Cell Stem Cell* 2020)、動物体内での皮膚 (Nagano et al. unpublished) や副甲状腺 (Kano et al. *PNAS* in press) 形成といった、臓器補完をサポートする有用な派生技術が開発された。

本研究開発課題では、最終目標であったヒト→動物キメラ体内での膵臓形成には至らなかったものの、ヒト→マウスキメラ個体の出生を達成すると共に、ヒト→マウスキメラ個体内においてヒト細胞とマウス細胞が協調的に組織形成できることを証明し、

図3. *BCL2;Y*-hiPSC → ブタキメラ

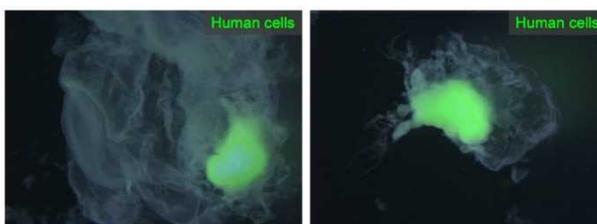
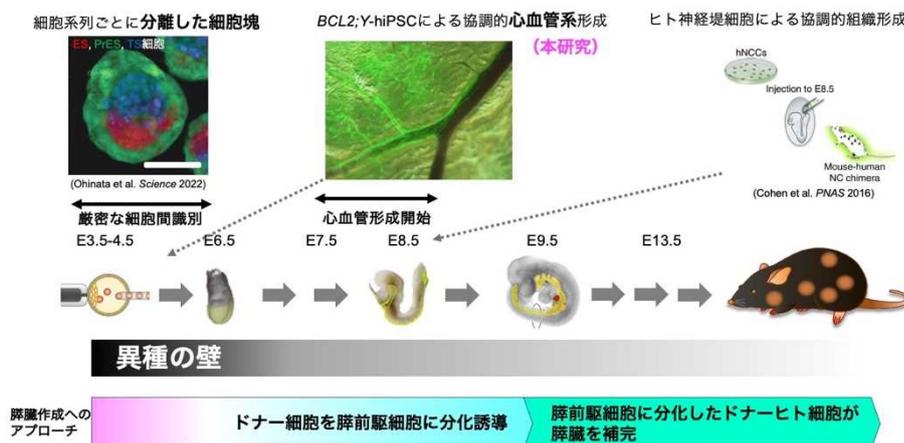


図4. ヒト膵臓作成に向けた「異種の壁」攻略へのアプローチ



動物体内でのヒト膵臓形成までの道程を示すことができた。本研究課題の成果に基づき、今後 2-3 年間で動物体内にヒト膵臓を形成できると想定している。

There is a worldwide shortage of organs for transplantation, and it is especially difficult for patients to receive organ transplants in Japan, where the number of organ donors remains at a low level. Although regenerative medicine approaches are expected to solve this unmet medical need, producing human organs of the size used for transplantation in culture using current cell culture technology is impossible. Based on this background, we have been engaged in research on the production of human organs in animals. In this project, we aimed to create a functional human pancreas in the animal body by generating human-to-animal chimeras. Firstly, we worked on the birth of human to mouse chimeras. It is known that a certain degree of matching of developmental stages is required for chimera formation. Conventional human ES cells/iPS cells have differentiated to the postimplantation epiblast stage, and even if transferred to mouse preimplantation embryos, they induce apoptosis and disappear by E6.5. Therefore, we forced the expression of BCL2, a cell death inhibitor, and succeeded in prolonging the survival of donor human iPS cells to E10.5. We further coexpressed various factors with BCL2 to extend the survival of donor human iPS cells and achieved the birth of human to mouse chimeras by introducing “gene X” (*BCL2;X*-hiPSC). However, the surviving *BCL2;X*-hiPSC formed aggregates that were completely separated from the host tissue (Fig. 1). We coexpressed various candidate genes with BCL2 in hiPSCs and analyzed their distribution in human-to-mouse chimeric fetus, and found that “gene Y”-coexpressing hiPSC (*BCL2;Y*-hiPSC) line-derived chimeras showed cooperative tissue formation in the cardiovascular system (Fig. 2). Human progeny in the heart pulsed and expressed cardiac-specific functional molecules, and the progeny in the vessels indicated integration into vascular network and vascular marker expression. Gene expression profiles of donor human cells in the vascular network and cardiac muscle showed that human cells from the vascular network expressed vascular endothelial cell-specific marker genes, but not cardiac muscle marker genes, while cells from the heart expressed only cardiac muscle marker genes. Thus, *BCL2;Y*-hiPSCs can cooperatively form tissues with mouse cells of the same lineage (cardiac muscle or vascular endothelium) in the same distribution region. In addition, *BCL2;Y*-hiPSCs showed chimera formation with pig embryos at E15, suggesting that the same method is applicable to human to pig chimeras.

New technologies, which support organ complementation, have been derived such as a technology to increasing donor cell chimerism via *Igf1r* KO in host animals (Nishimura et al. *Cell Stem Cell* 2020), a technology generating of donor-cell derived skin (Nagano et al. *unpublished*) or parathyroid gland (Kano et al. *PNAS* in press) in the animal body during this project.

In summary, although the final goal of pancreas formation in human-to-animal chimeras was not achieved, the birth of human-to-mouse chimeras was achieved, and it was demonstrated that human cells and mouse cells can cooperatively form tissues in human-to-mouse chimeras, showing the path to human pancreas formation in animals. Based on the findings through the project, we expect to be able to form a human pancreas in animals in the next 2-3 years.

Fig.1 Birth of *BCL2;X*-hiPSC → Mouse Chimera

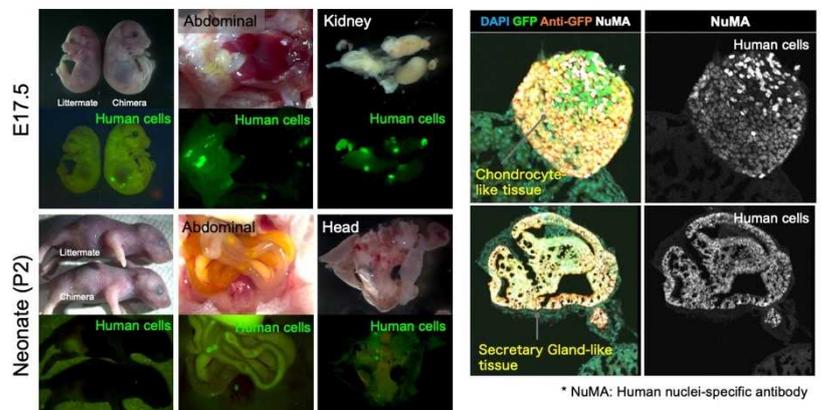


Fig.2 Coordinated Cardiovascular Tissue Formation in *BCL2;Y*-hiPSC → Mouse Chimera

