■本資料のご利用にあたって（詳細は「利用条件」をご覧ください）

本資料には、著作権の制限に応じて次のようなマークを付しています。
本資料をご利用する際には、その定めるところに従ってください。

＊：著作権が第三者に帰属する著作物であり、利用にあたっては、この第三者より直接承諾を得る必要があります。

CC：著作権が第三者に帰属する第三者の著作物であるが、クリエイティブ・コモンズのライセンスのもとで利用できます。

：パブリックドメインであり、著作権の制限なく利用できます。

なし：上記のマークが付されていない場合は、著作権が東京大学及び東京大学の教員等に帰属します。無償で、非営利的かつ教育的な目的に限って、次の形で利用することを許諾します。

Ⅰ　複製及び複製物の頒布、譲渡、貸与
Ⅱ　上映
Ⅲ　インターネット配信等の公衆送信
Ⅳ　翻訳、編集、その他の変更
Ⅴ　本資料をもとに作成された二次的著作物についてのⅠからⅣ

ご利用にあたっては、次のどちらかのクレジットを明記してください。

東京大学　Todai OCW　学術俯瞰講義
Copyright 2013, 中内啓光

The University of Tokyo / Todai OCW　The Global Focus on Knowledge Lecture Series
Copyright 2013, Hiromitsu Nakauchi

生命の堅牢性と可塑性

キメラ動物を用いた臓器の作出

東京大学医科学研究所
幹細胞治療研究センター・幹細胞治療分野
ERATO中内幹細胞制御プロジェクト
中内　啓光

生命の堅牢性と可塑性

生物

生物は一個の受精卵からゲノムの情報をもとに分化と分裂を繰り返すことにより個体を形成する。

種

自然条件下で交配し、子孫を残すことができれば同一種とみなす。

可塑性

遺伝子（ゲノム）が生物の全てを規定しているように思えるが、生物自体は思わぬ可塑性を示すことがある。

再生医療とは

自然には再生できない臓器・組織の
欠損、障害等を修復させ、
機能を回復する医療

組織工学（Tissue engineering）

セラミクス、コポリマー等を用いて組織再生の足場を提供し、組織・臓器の 再生を促進する

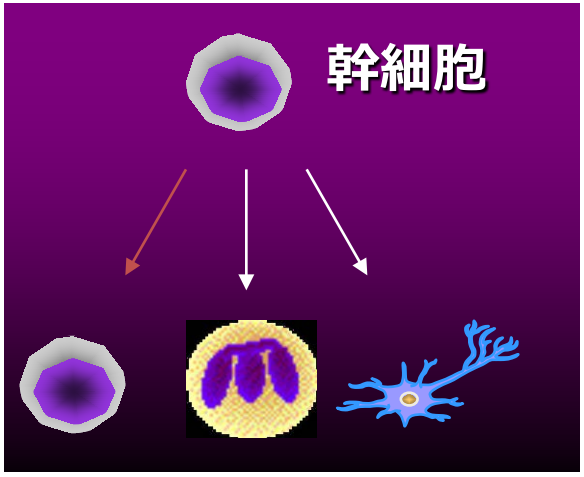
幹細胞生物学（Stem cell biology）

幹細胞を利用して組織・臓器の再生のための細胞を供給する

幹細胞とは

「多分化能」複数の細胞系譜に分化する能力

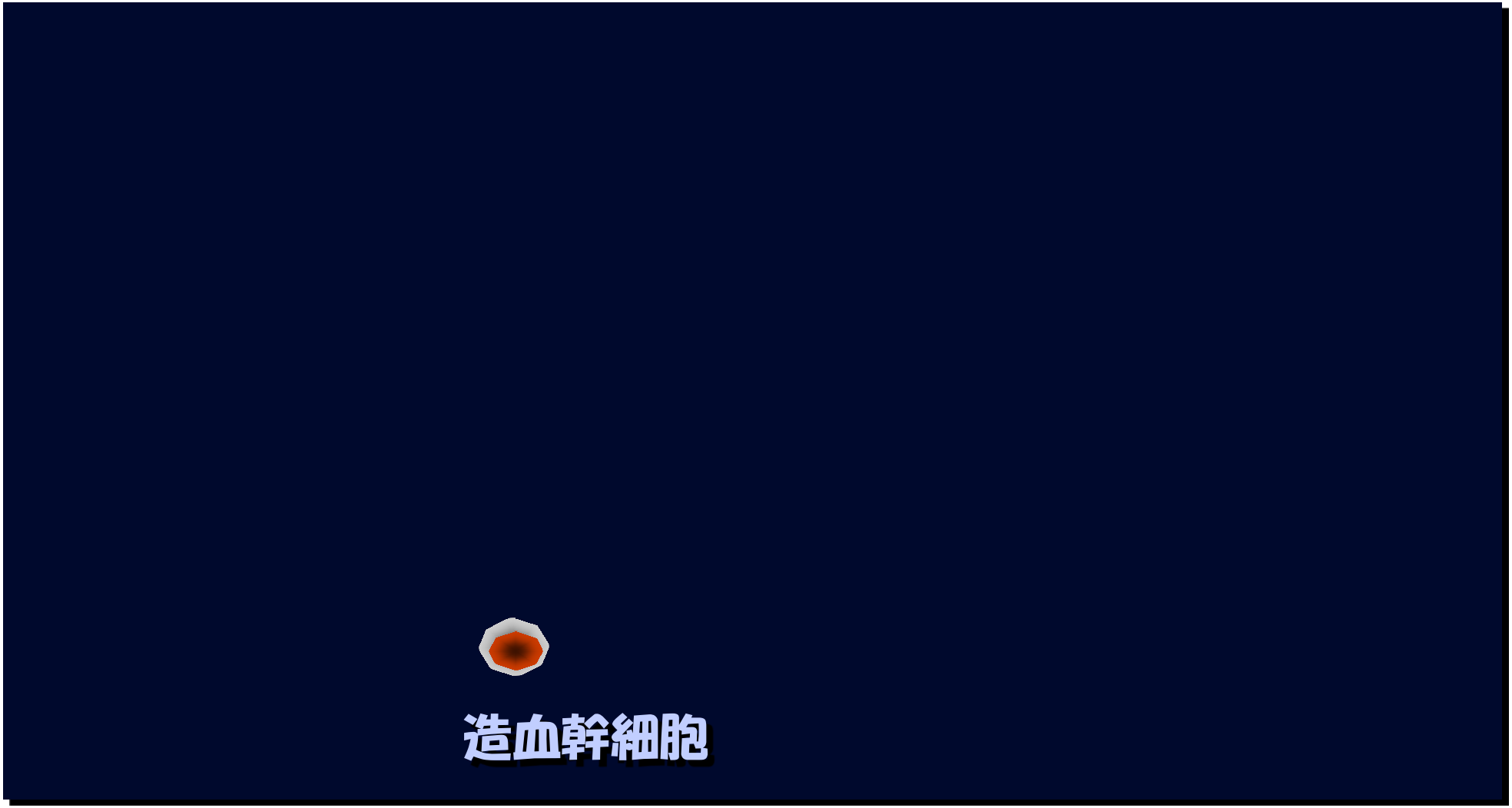
「自己複製能」多分化能を保持したまま分裂する能力



この二つの能力を兼ね備えた細胞で自らを維持しながら組織や臓器の発生、修復、維持を行う

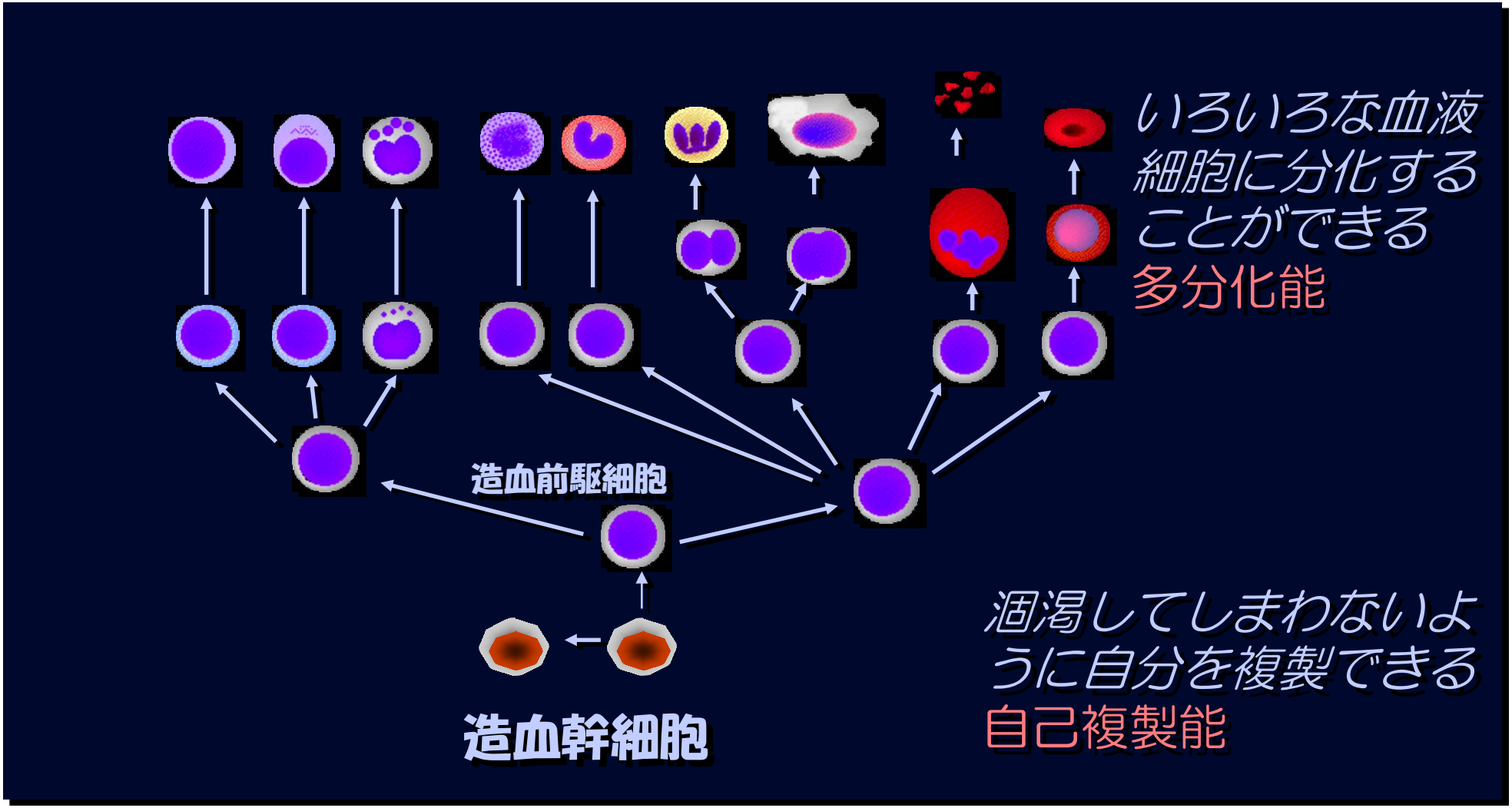
幹細胞の自己複製能と多分化能

造血幹細胞は多分化能と自己複製能を兼ね備えた細胞で、
毎日200億個の血液細胞を作り続けることによって血液系を一生にわたって維持する



幹細胞の自己複製能と多分化能

造血幹細胞は多分化能と自己複製能を兼ね備えた細胞で、
毎日200億個の血液細胞を作り続けることによって血液系を一生にわたって維持する



Stem Cells / 幹細胞

多能性幹細胞:

胎盤、羊膜以外の全ての細胞に分化可能

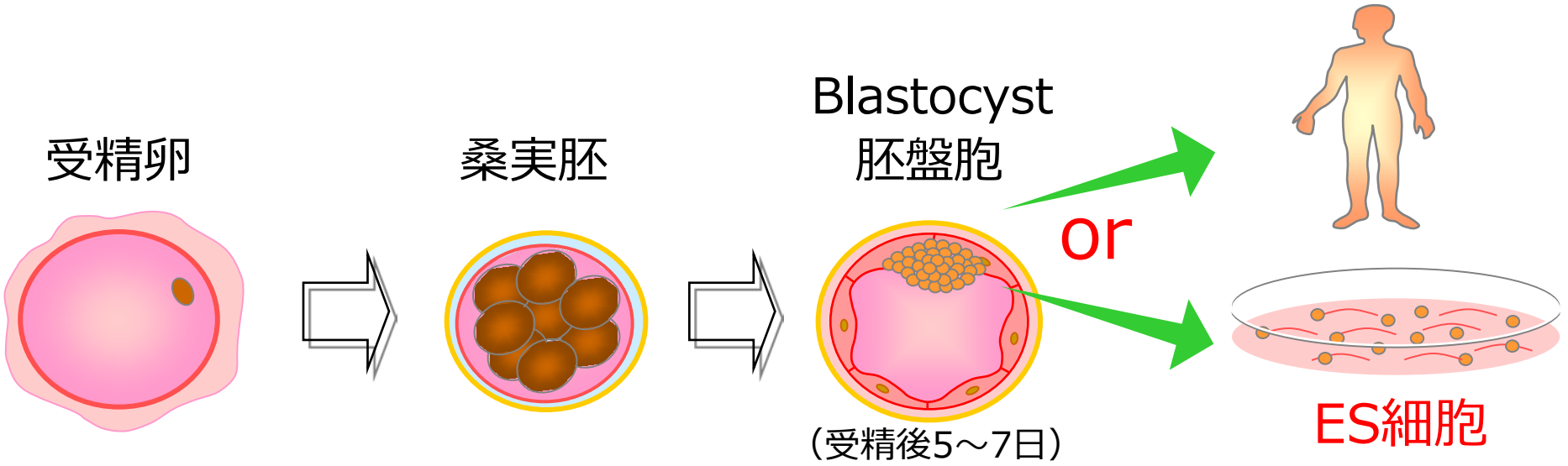
*ES (*胚性幹）細胞、*iPS*細胞

組織幹細胞、成体幹細胞:

特定の組織・臓器に限局した分化能を持つ

造血幹細胞、 神経幹細胞など

ES（胚性幹）細胞



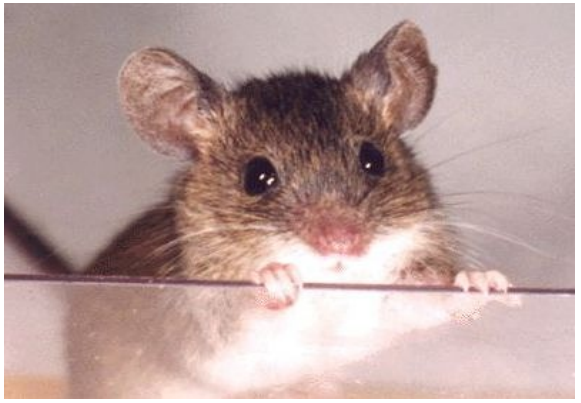
- ●無限に培養可能である
- ●広い分化能を持っている
- ●遺伝子導入や相同組み換えが容易
- ●現存しているヒトからは樹立できない
- ●本当に正常な人間を代表しているか判らない

マウスES細胞の樹立

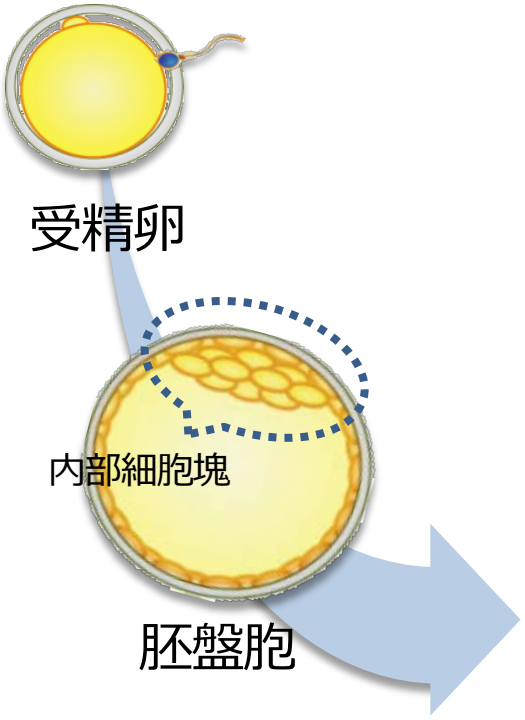
Photo credit: Cardiff University, from Wikimedia Commons CC BY 3.0
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Martin_Evans_Nobel_Prize.jpg

Martin Evans
(2007年 ノーベル医学生理学賞)

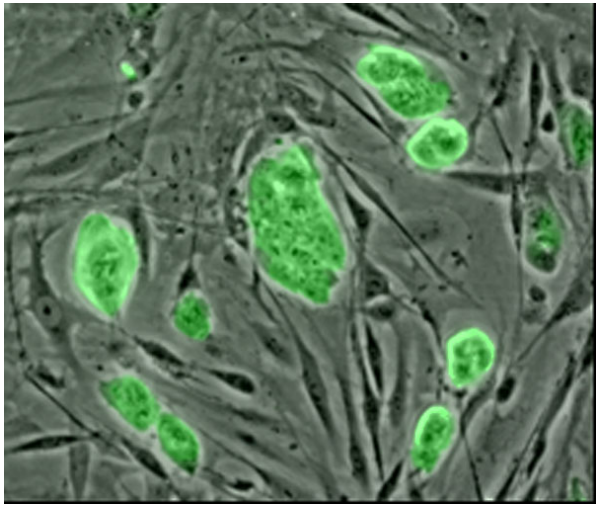
1981年
マウスES細胞の樹立に成功



＊画像提供：北海道大学理学部生物科学科（生物学）

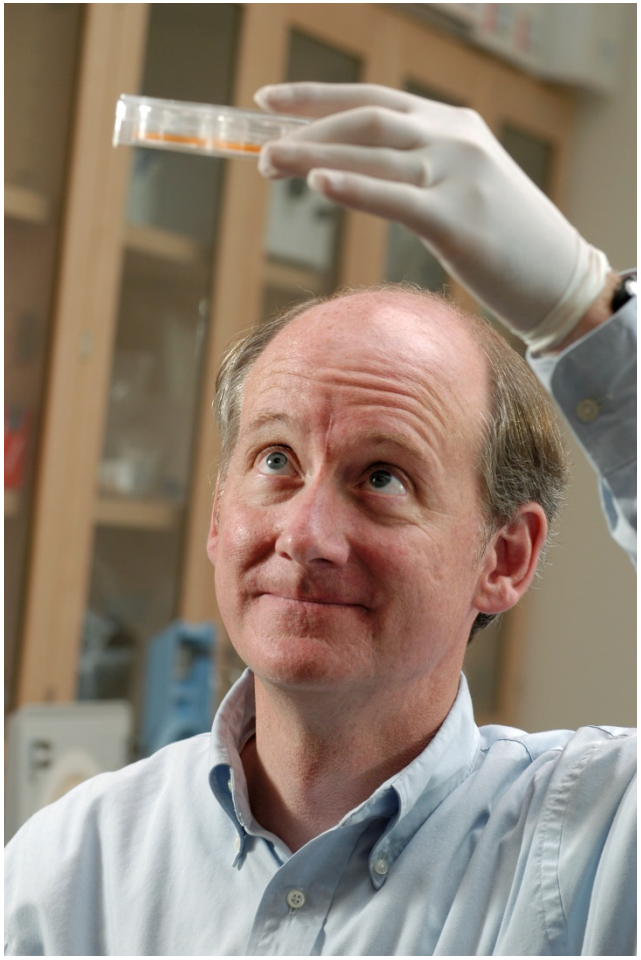


マウスES細胞



＊Image Credit: Niels Geijsen, Massachusetts General Hospital/National Science Foundation

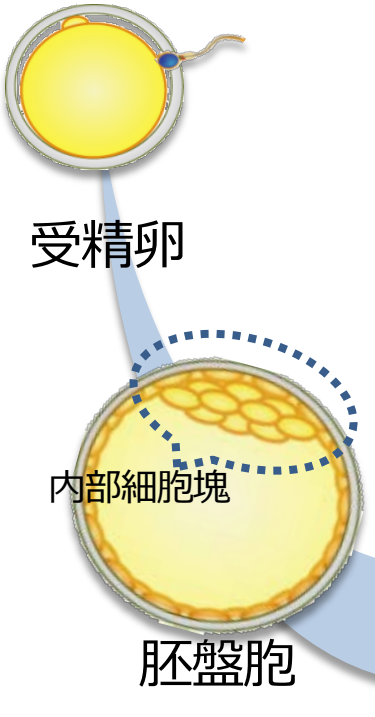
ヒトES細胞の樹立



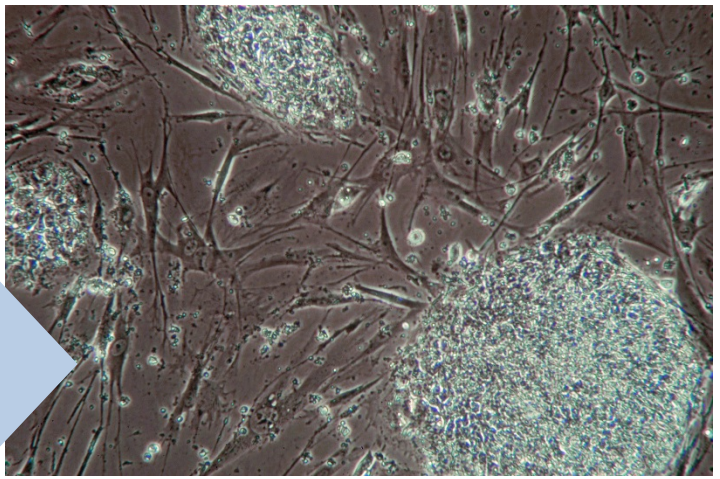
* Photo credit: Jeff Miller / University of Wisconsin-Madison

James Thomson

1998年
ヒトES細胞の樹立に成功



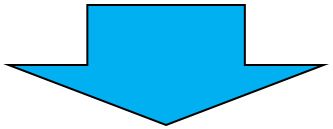
ヒトES細胞



* Photo credit: Jeff Miller / University of Wisconsin-Madison

ES細胞を用いた治療の問題点

ＥＳ細胞由来の細胞を治療に使用する場合の問題点は患者自身の細胞でないため免疫反応や感染の可能性があること。



免疫拒絶の無い安全な細胞移植を
実現するには？

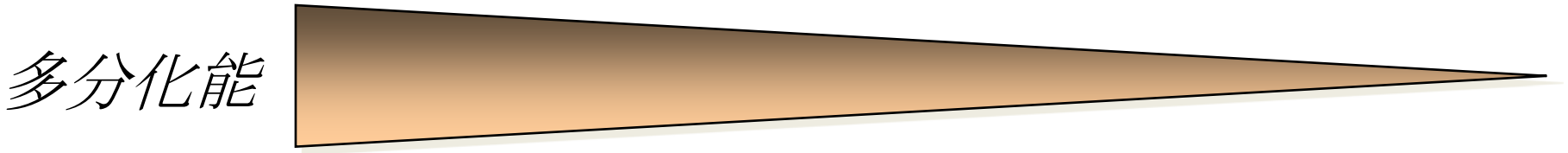
患者自身の多能性幹細胞の樹立

細胞分化の非可逆性

細胞の分化の過程は一方向性でもとには戻らない！？

多能性幹細胞　　前駆細胞　　分化細胞

Multi-potency　　Oligo-potency　　Uni-potency

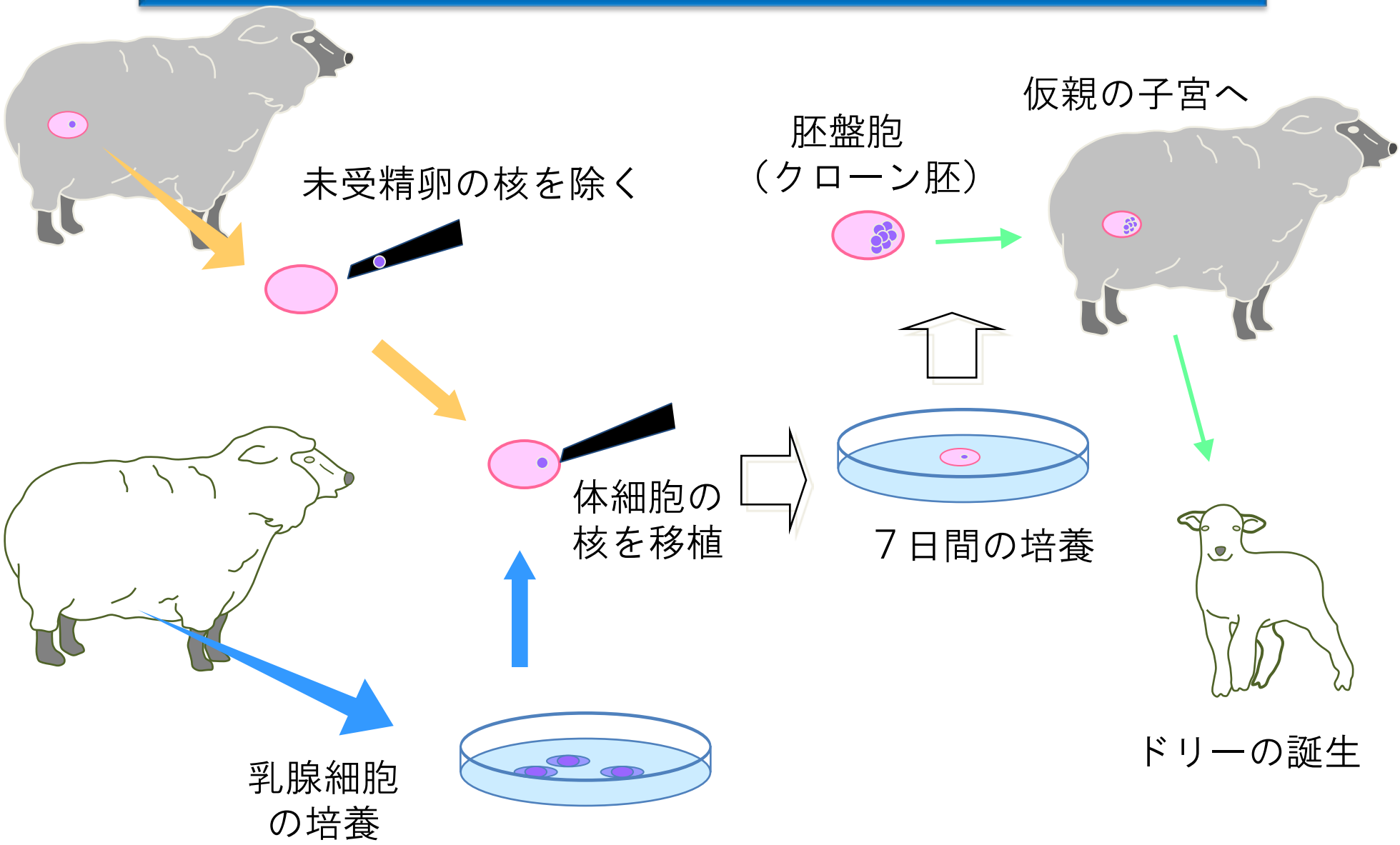


クローン胚技術とは？
Therapeutic Cloning

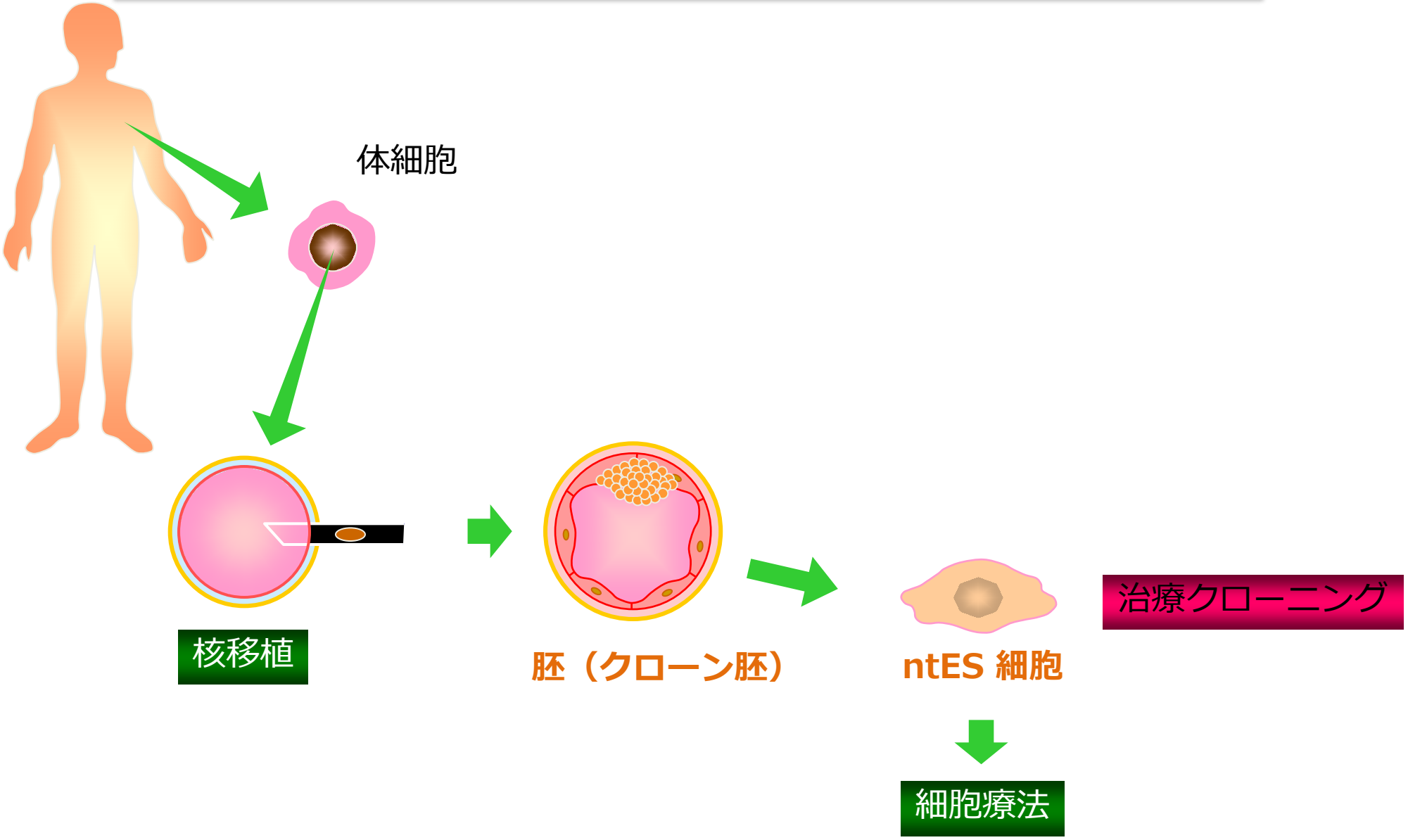
体細胞の核を未受精卵に注入すること（体細胞核移植）により、核の状態を受精卵と同じレベルに戻すこと（初期化）が可能である。
（体細胞から受精卵への若返り）
この技術を利用して患者由来の体細胞からES細胞を作り出して再生医療に応用すること。

体細胞核移植を利用した
細胞（ゲノム）の若返り技術

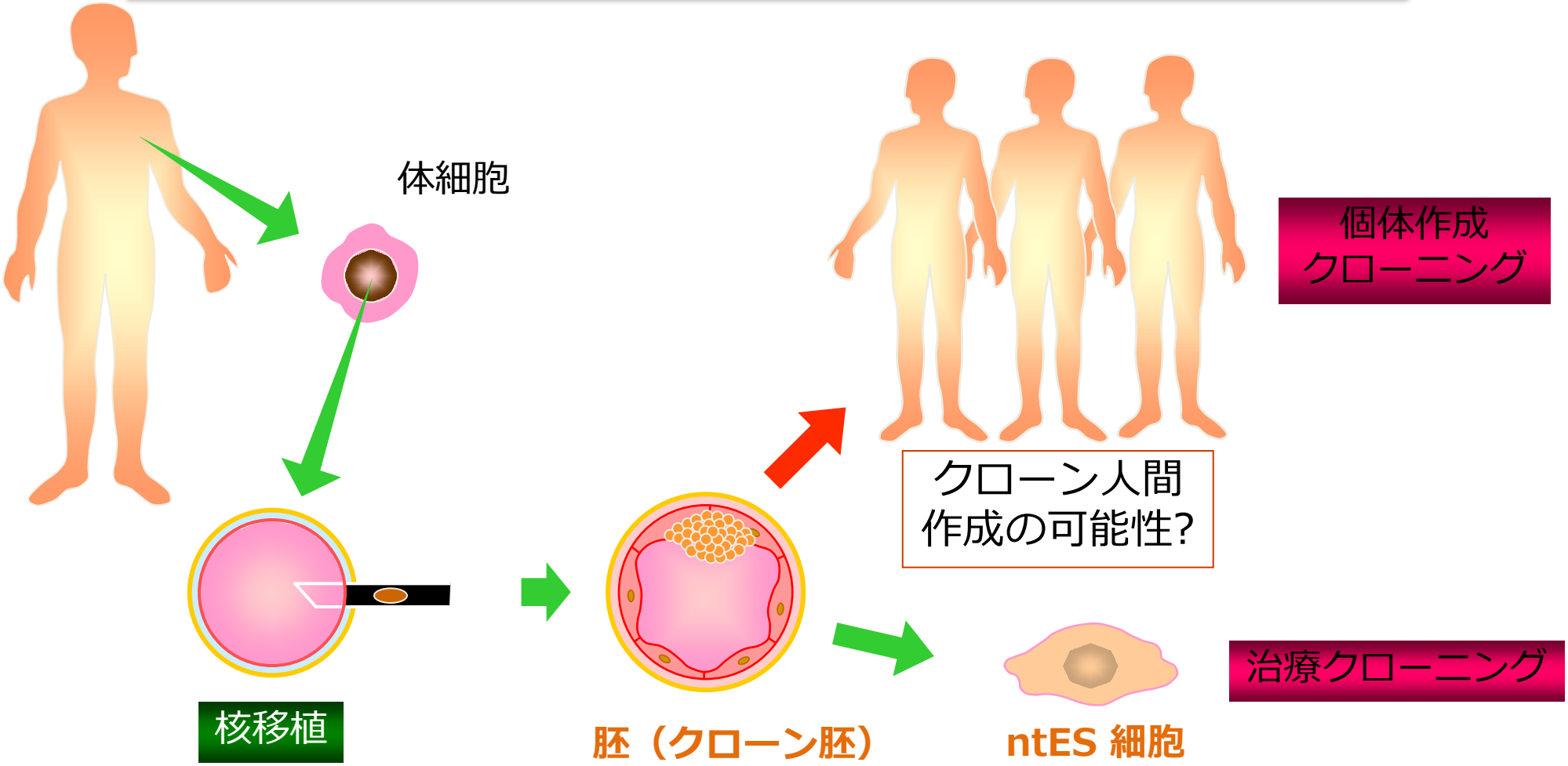
核移植によるクローン動物の作成



核移植ES細胞作成の原理と問題点



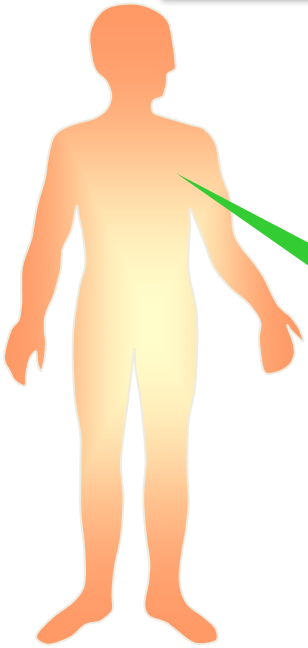
核移植ES細胞作成の原理と問題点



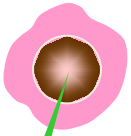
ヒト未受精卵の
採取・使用

生命の萌芽である
胚の破壊

核移植ES細胞作成の原理と問題点

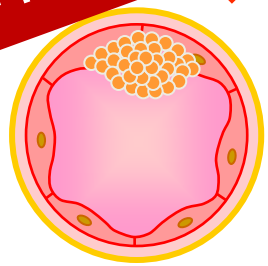


体細胞

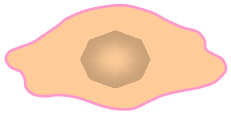


技術的・社会的に極めて高いハードルがある！

核移植



胚（クローン胚）



ntES 細胞

細胞療法

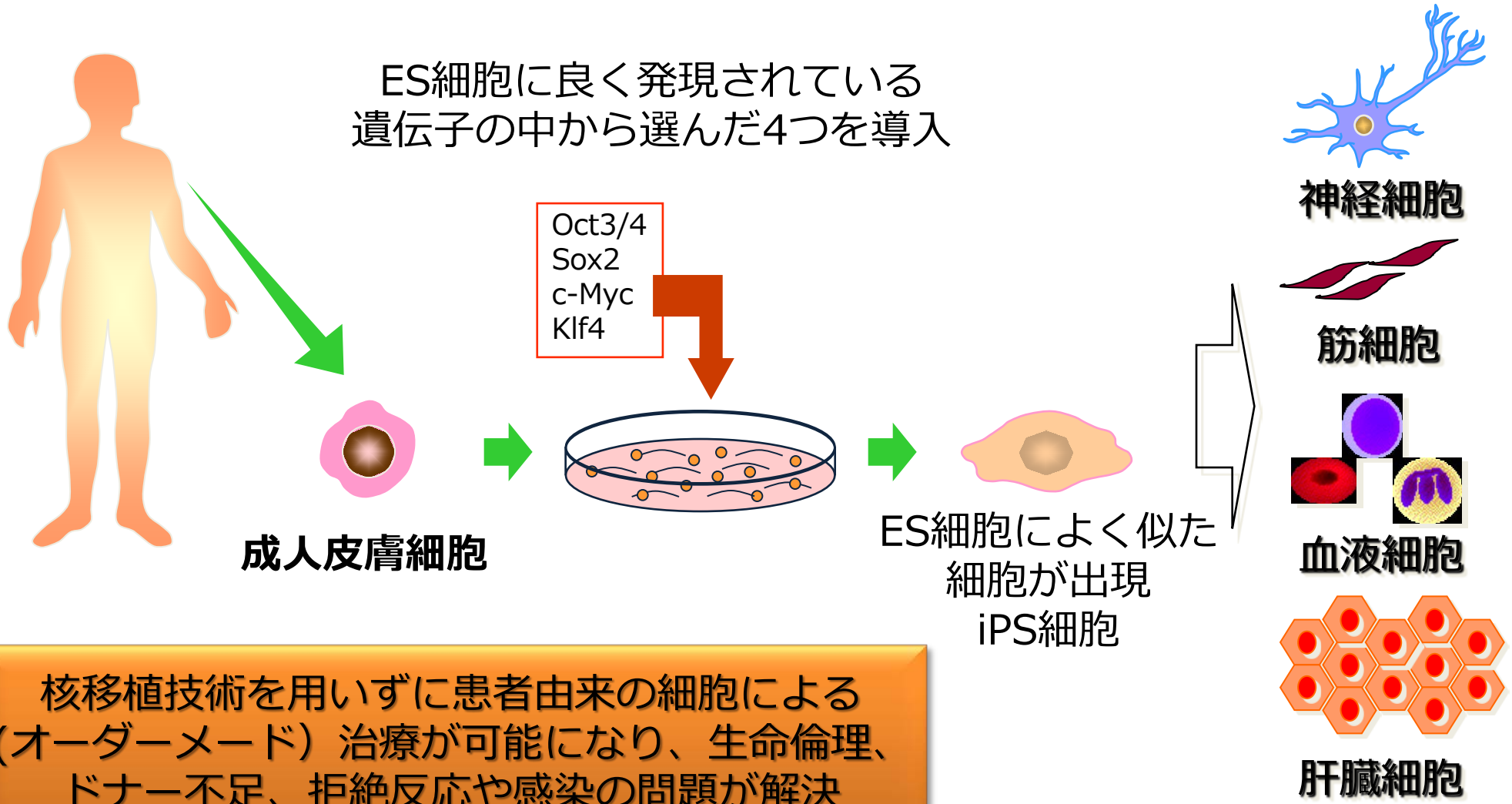
クローン人間
作成の可能性?

ヒト未受精卵の
採取・使用

生命の萌芽である
胚の破壊

治療クローニング

人工多能性幹細胞（iPS細胞）とは？



核移植技術を用いずに患者由来の細胞による（オーダーメード）治療が可能になり、生命倫理、ドナー不足、拒絶反応や感染の問題が解決

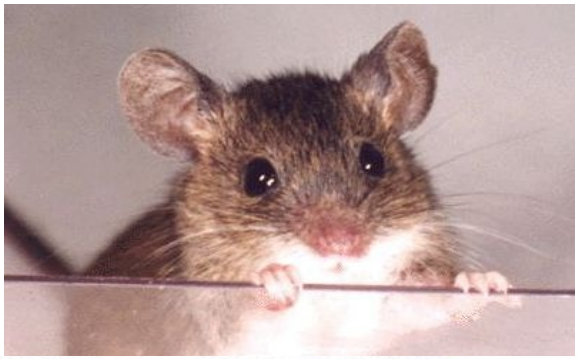
マウスiPS細胞からヒトiPS細胞へ

2006年 マウスiPS細胞の樹立

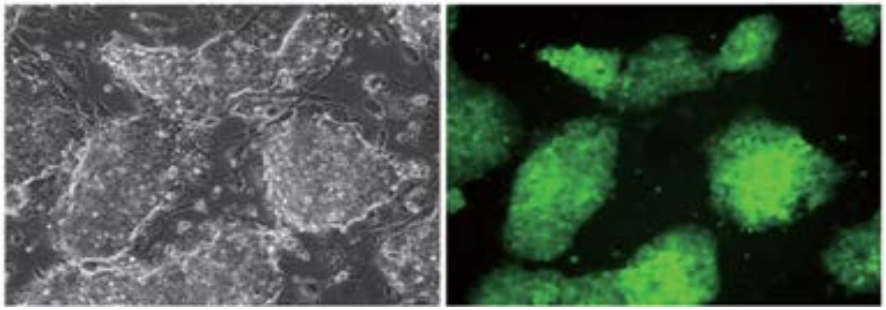
Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi and Shinya Yamanaka

Cell, Volume 126, Issue 4, 25 August 2006, Pages 663–676



＊
画像提供：北海道大学
理学部生物科学科
（生物学）



＊ Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature* vol.448:313-317, Fig.2d. copyright 2007.

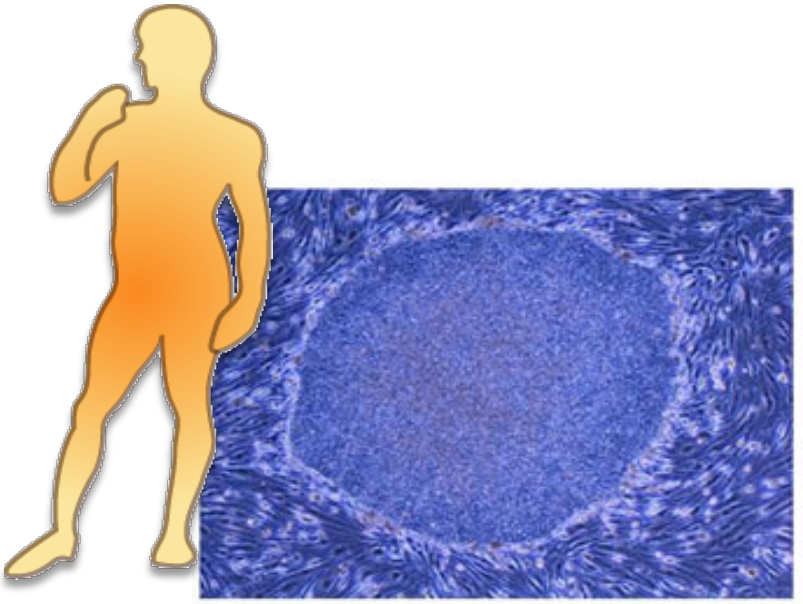
2007年 ヒトiPS細胞の樹立

Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda and Shinya Yamanaka

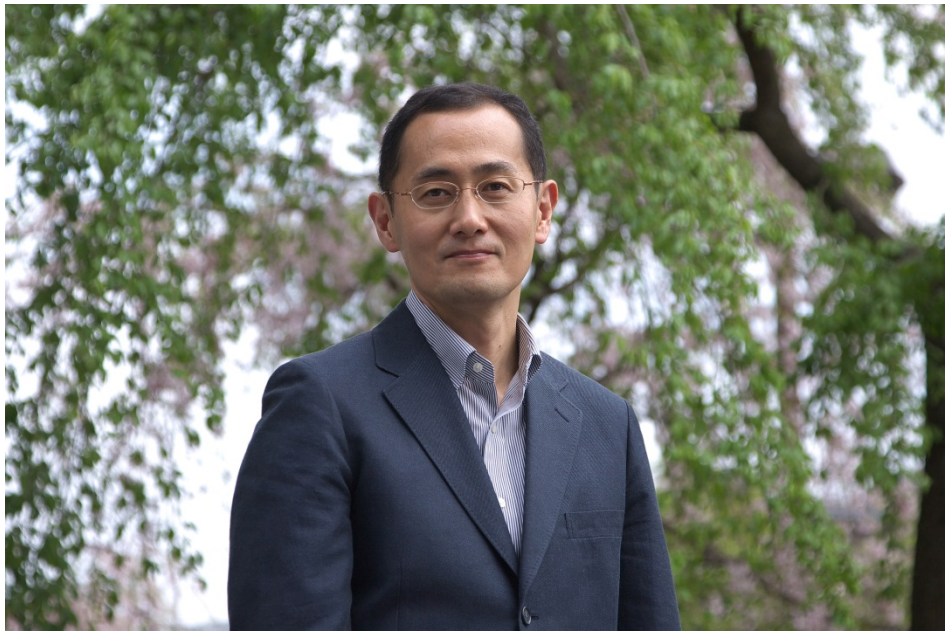
Cell, Volume 131, Issue 5, 30 November 2007, Pages 861–872

同じ4つの遺伝子



＊ 京都大学iPS細胞研究所

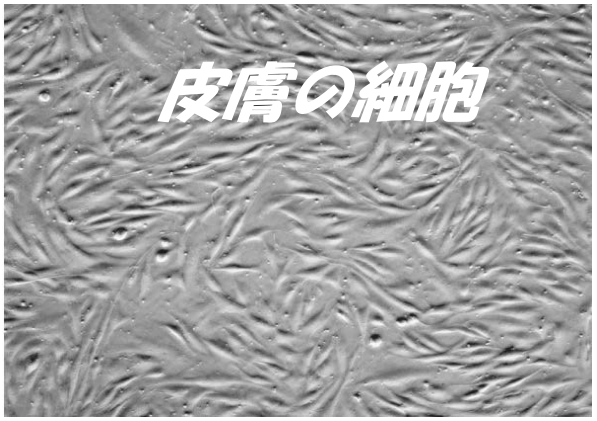
体細胞を多能性幹細胞に変換



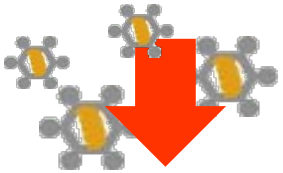
＊ 京都大学iPS細胞研究所

Shinya Yamanaka

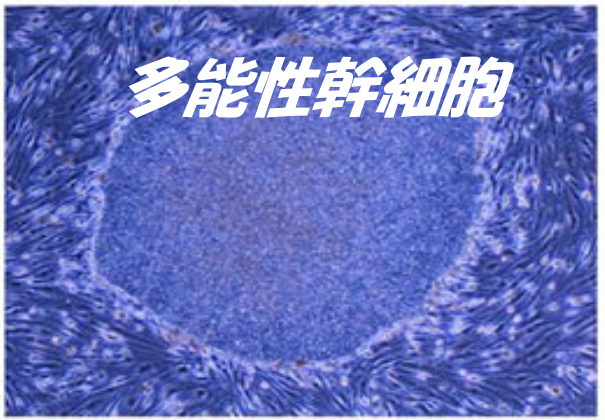
(2012年 ノーベル医学生理学賞)



Adapted from: Nakamura, et.al. (2009) Gi-Coupled GPCR Signaling Controls the Formation and Organization of Human Pluripotent Colonies, PLoS ONE, vol.4 (no.11):e7780, Fig.1. http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0007780
CC BY 3.0

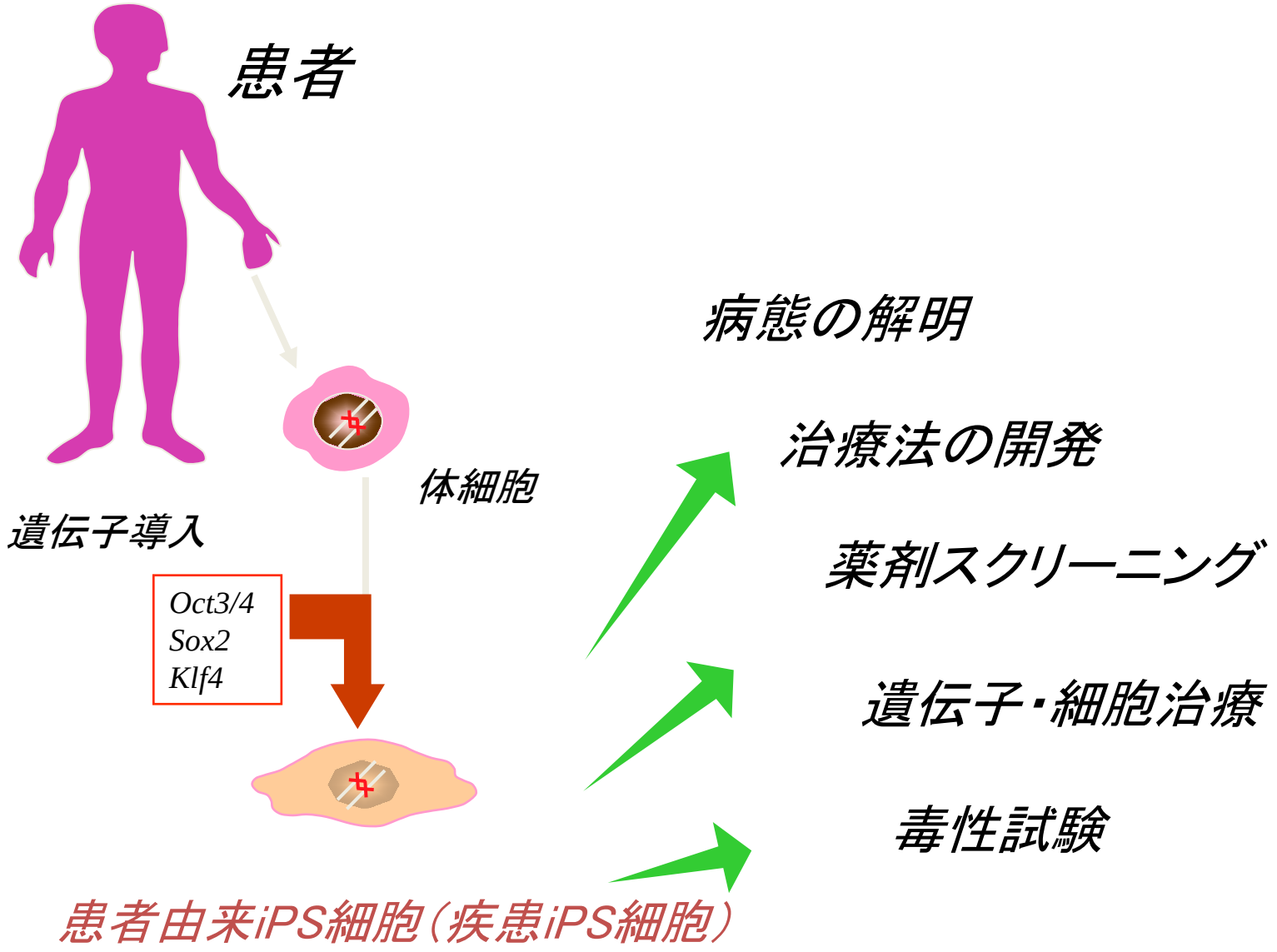


＋４つの遺伝子



＊ 京都大学iPS細胞研究所

患者由来iPS細胞はヒト細胞の無限のソースとして有用



iPS細胞から臓器を作る

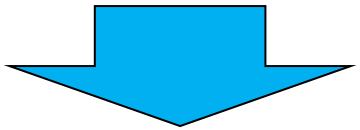
－ 次世代の再生医療を目指して －

ドナー臓器の不足が移植医療を妨げている

1. 現在日本では３０万人が慢性腎不全のため人工透析を受けていて、年間一人約５００万円、毎年1兆3千億円を超える医療費を必要とし保険財政を逼迫させている。３０万人分の移植用腎臓を用意することは不可能。糖尿病の増加に伴い腎不全患者は毎年１万人増加している。

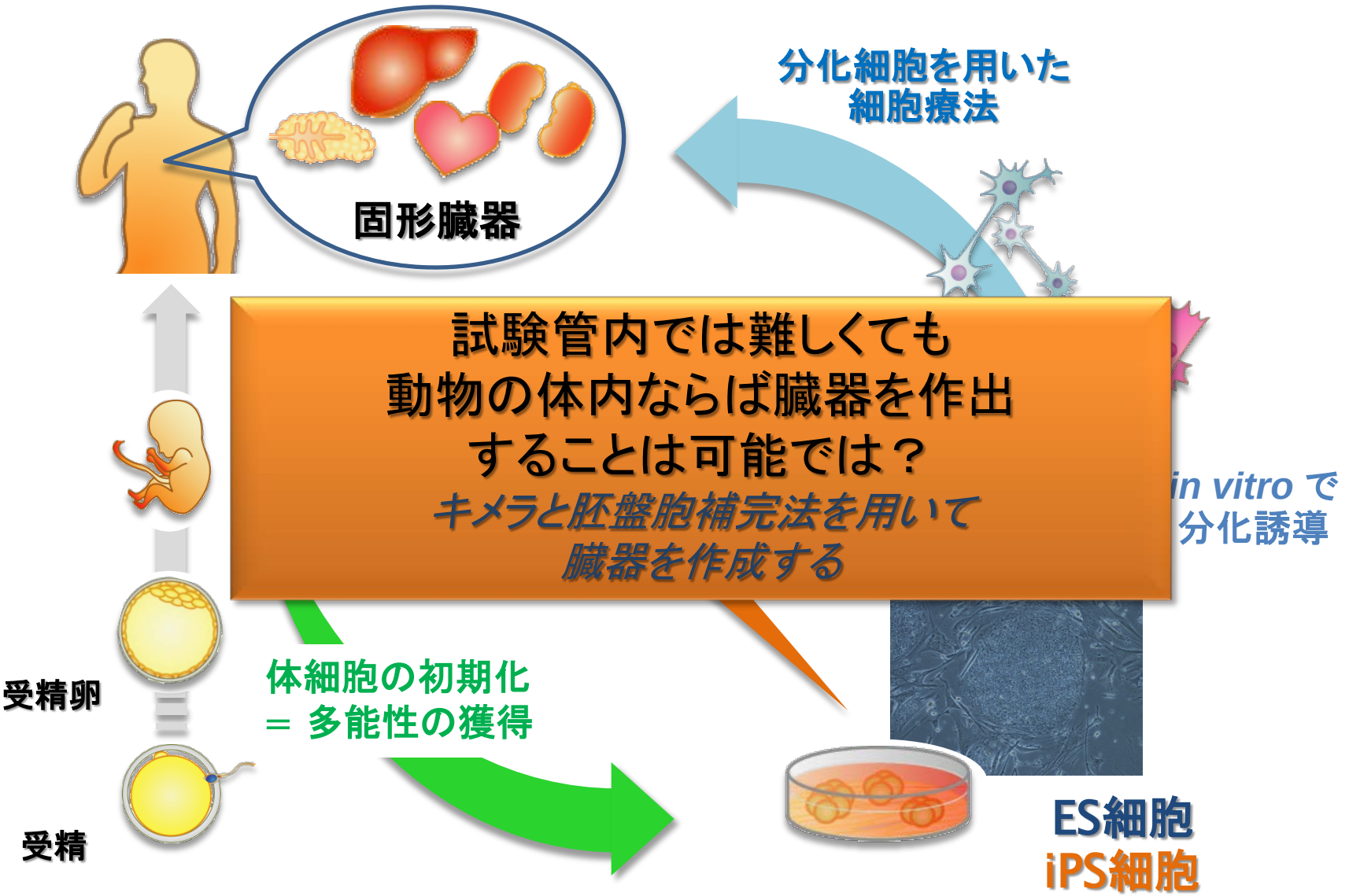
2. 心臓、肝臓、肺、膵臓等の移植を希望する患者は多数いるが、圧倒的なドナー不足と高額の費用（生体部分肝移植で約２０００万円）のため手術は難しい。国内で移植が必要とされた患者の３割しか移植が受けられず、その半数（１５歳未満では９割）以上が海外で移植を受けている。

3. 国際移植学会や世界保健機構（WHO)は渡航移植自粛を提唱。海外で移植を受けていた臓器不全症患者もその道を閉ざされつつある。



ドナー臓器の圧倒的な不足を解消する方法が求められている

多能性幹細胞を利用したin vivoでの臓器の再生



キメラ動物とは

交配では精子と卵子が受精することによりそれぞれが持つ遺伝子が交ざりあう。

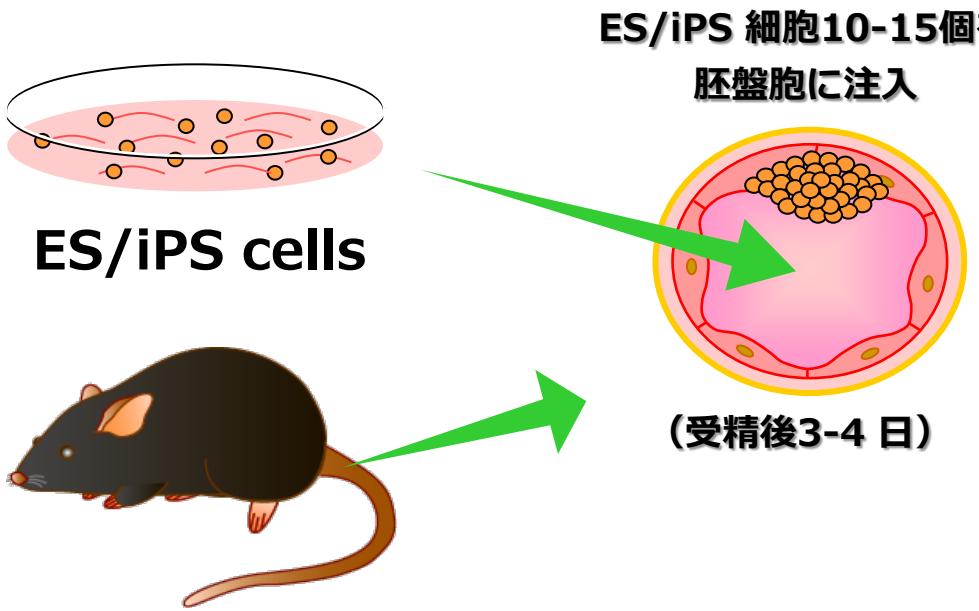
これに対し、キメラ動物とは(ゲノムが異なる）細胞が混じりあった状態の個体を　意味する。キメラは部分キメラと全身性キメラに区別できる。

部分キメラ：　輸血や骨髄移植、臓器移植を受けた人。二卵性双生児のペアの８%が血液キメラであるし、母親の血液中に子供の血液が長年にわたって存在する場合があることが知られている。また研究分野でもマウス、ラット、羊、ウシ等の動物にヒト血液幹細胞、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞、ヒトがん細胞などを移植することは日常的に行われていて、ヒト神経細胞を持つマウスなども作成されている。これらは全て部分キメラである。

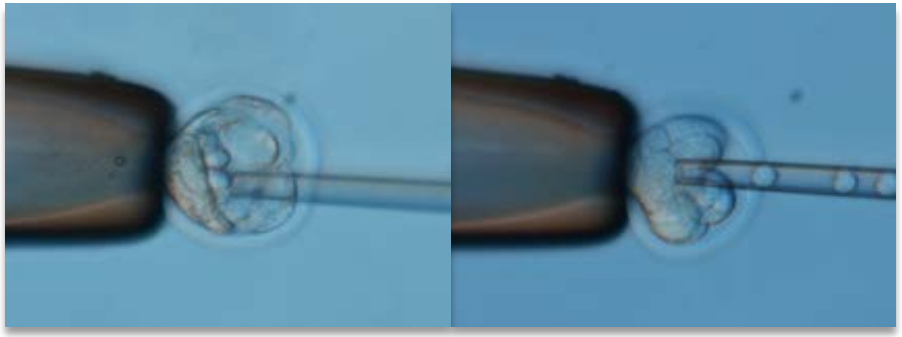
全身性キメラ：発生の極めて早期にゲノムが異なる胚細胞が混じると体全体に両方の細胞が入り混じった個体が生まれてくる。異種間の胚を混ぜてキメラ個体作出まで至った非常に稀な例として羊とヤギのキメラ（Geep）が 1984年に生まれている。

キメラ動物を作る方法

ES細胞やiPS細胞を受精後間もない胚（胚盤胞）に移入してキメラマウスを作る

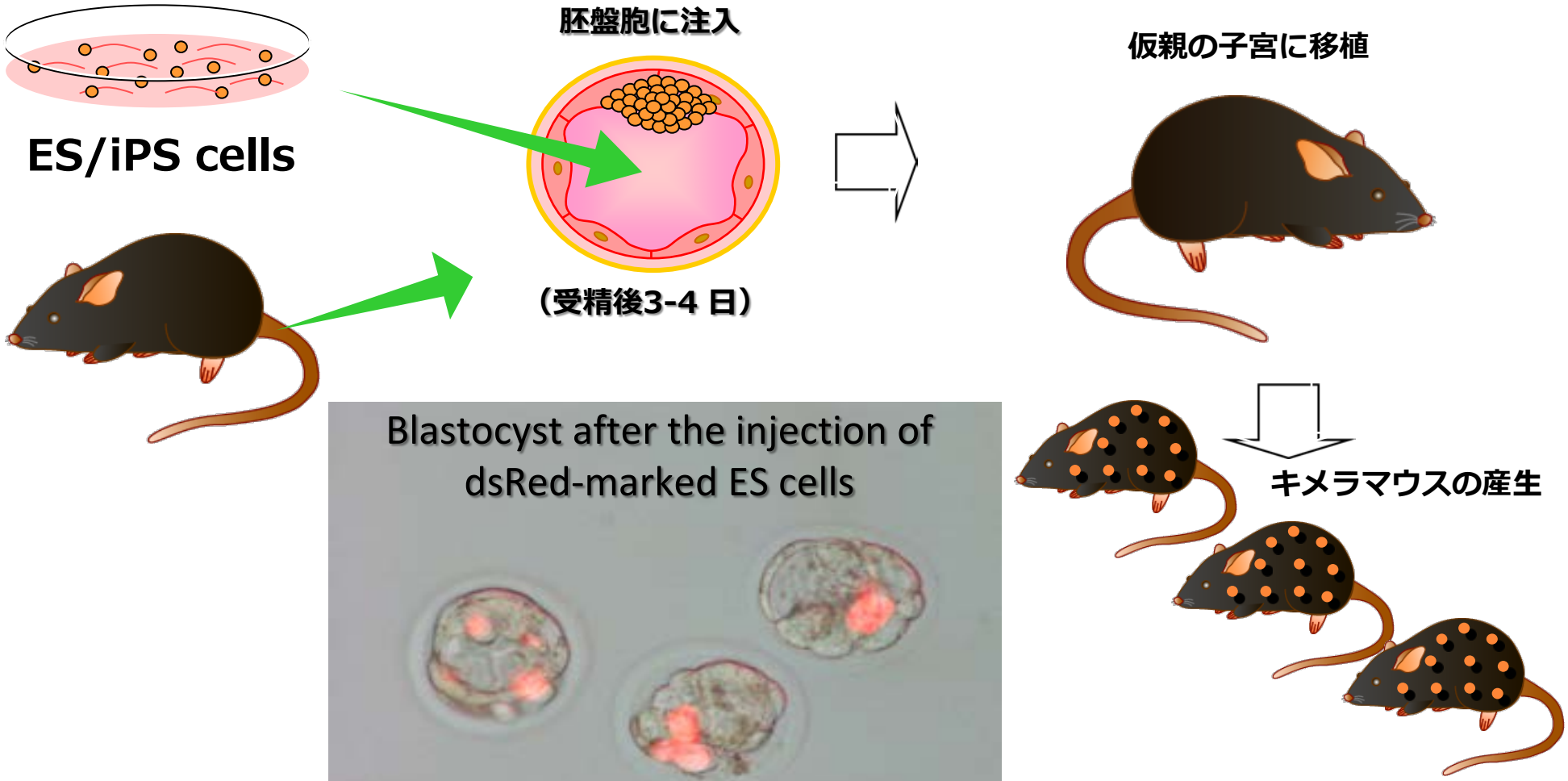


Injection of ES cells into blastocyst



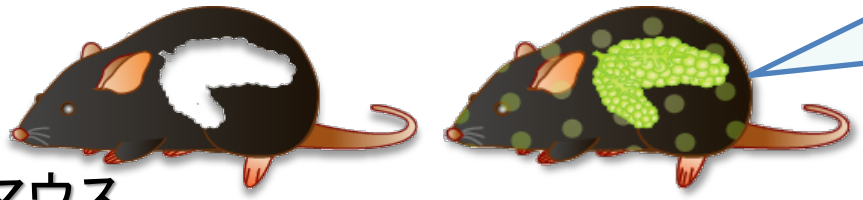
キメラ動物を作る方法

ES細胞やiPS細胞を受精後間もない胚（胚盤胞）に移入してキメラマウスを作る



胚盤胞補完法を利用して多能性幹細胞から臓器を作る

膵臓を欠損する
遺伝子改変マウス



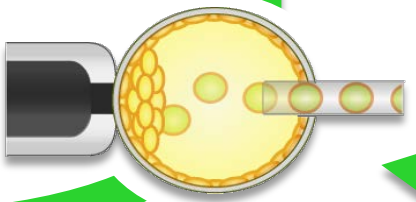
Pdx1KOマウス

*Pdx1*KOマウス個体内でドナー
iPS細胞由来臓器が
再生されるのではないか？

胎児

胚盤胞

受精

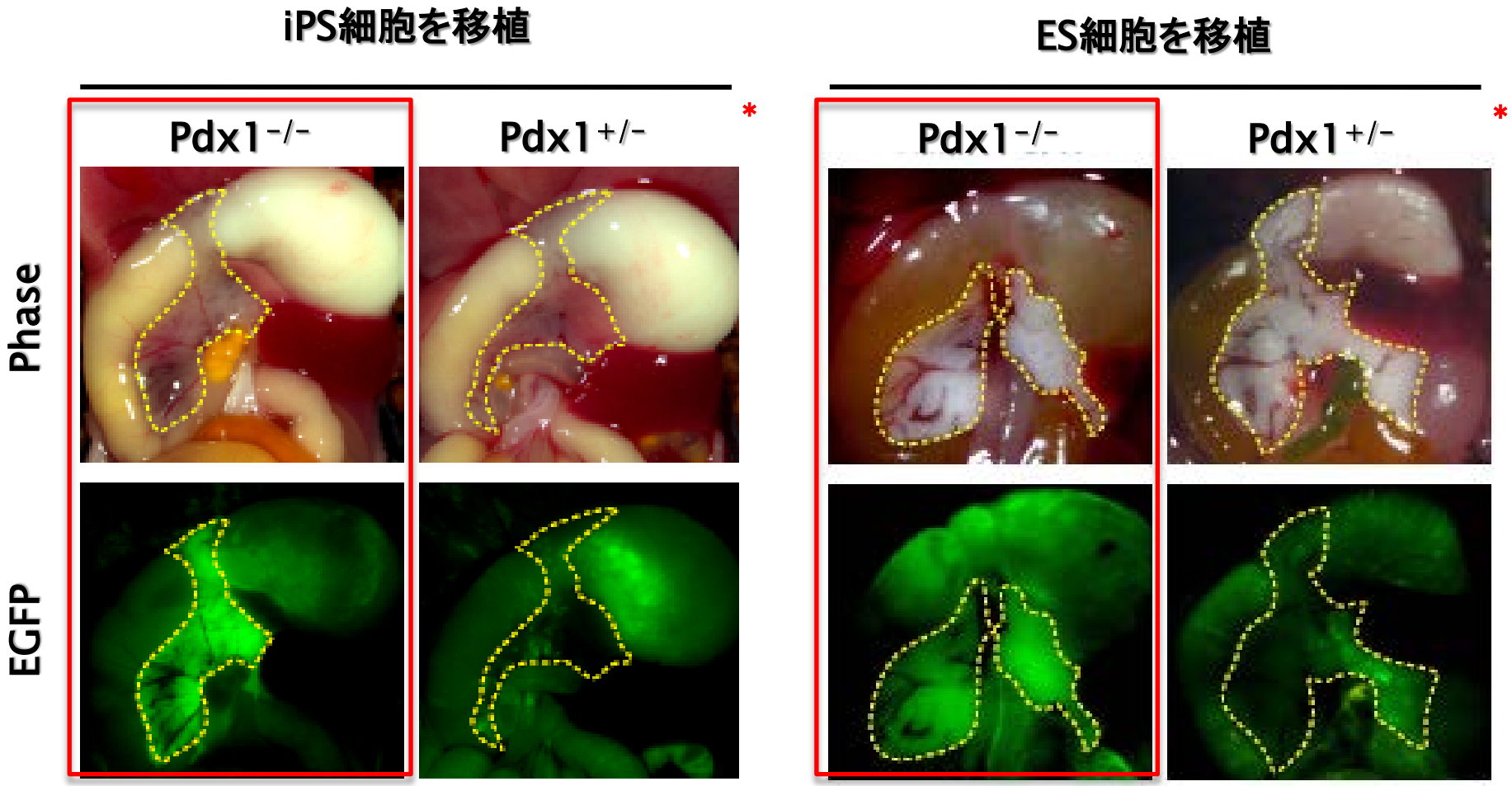


胚盤胞へ注入

マウス多能性幹細胞
(ES 細胞、iPS 細胞…)

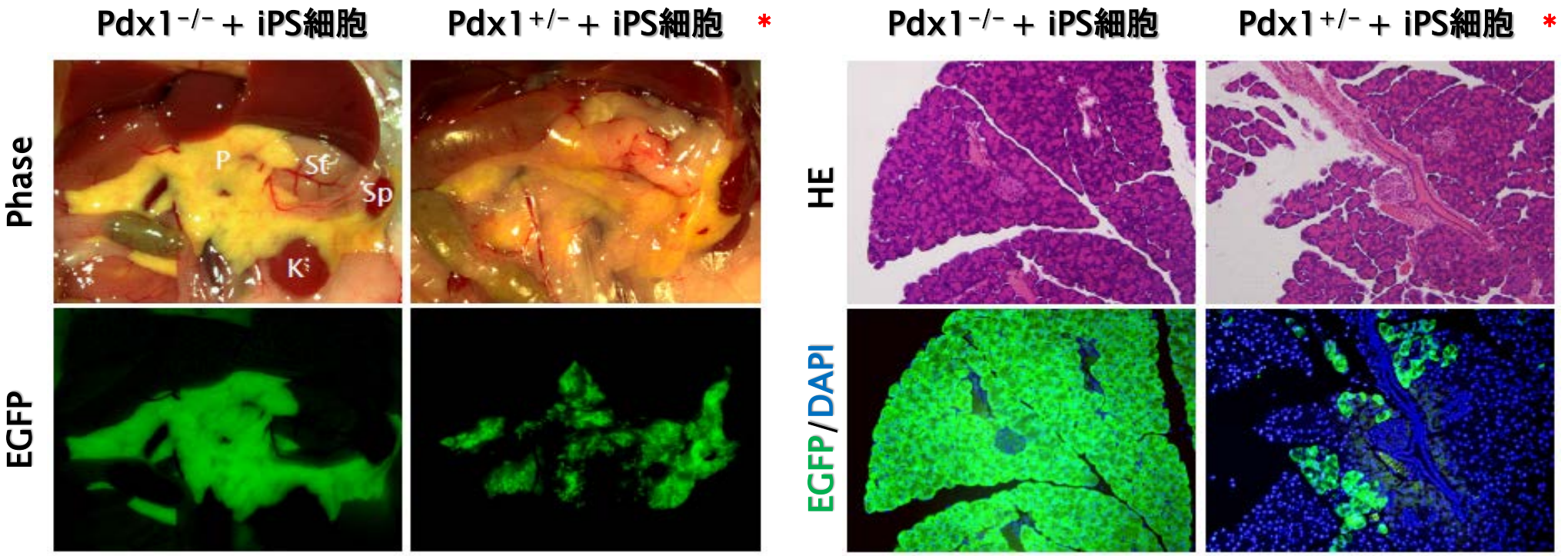
遺伝子改変により膵臓が発生できない
マウスの胚盤胞に正常な多能性幹細
胞を注入することによって欠損を補完
する。 (胚盤胞補完法)

胚盤胞補完法により Pdx1 KO マウス内に ES/iPS 細胞由来の膵臓が形成された（新生仔期の解析）



Images from: T. Kobayashi, H. Nakauchi et.al. (2010) Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells, Cell, vol.142 (no.5):787–799, p.789 Fig.1A. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867410008433
Copyright © 2010 Elsevier Inc. License: http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/

膵臓が補完されたPdx1 KO マウスは成体にまで正常に発育し膵臓はiPS細胞由来の細胞より構成されていた



Images from: T. Kobayashi, H. Nakauchi et.al. (2010) Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells, Cell, vol.142 (no.5):787–799, p.790 Fig.2B, C. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867410008433 Copyright © 2010 Elsevier Inc. License: http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/

腎臓においても同じ動作原理が働くか？

腎臓を欠損する遺伝子
改変マウス

Sall1 KO マウス

Sall11KOマウス個体内でドナー
iPS細胞由来腎臓が
再生されるのではないか？

胎仔

胚

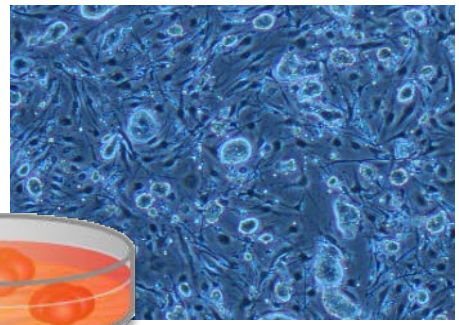
授精

胚盤胞に移植

（胚盤胞補
完）

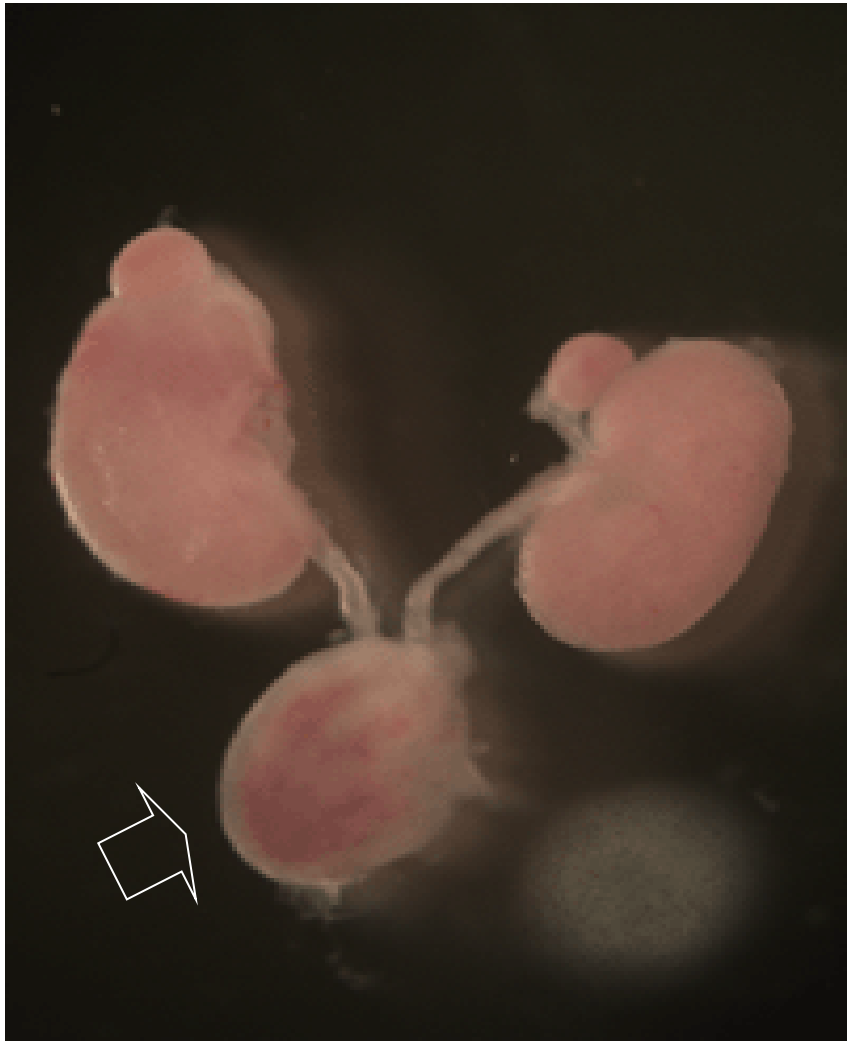
多能性幹細胞

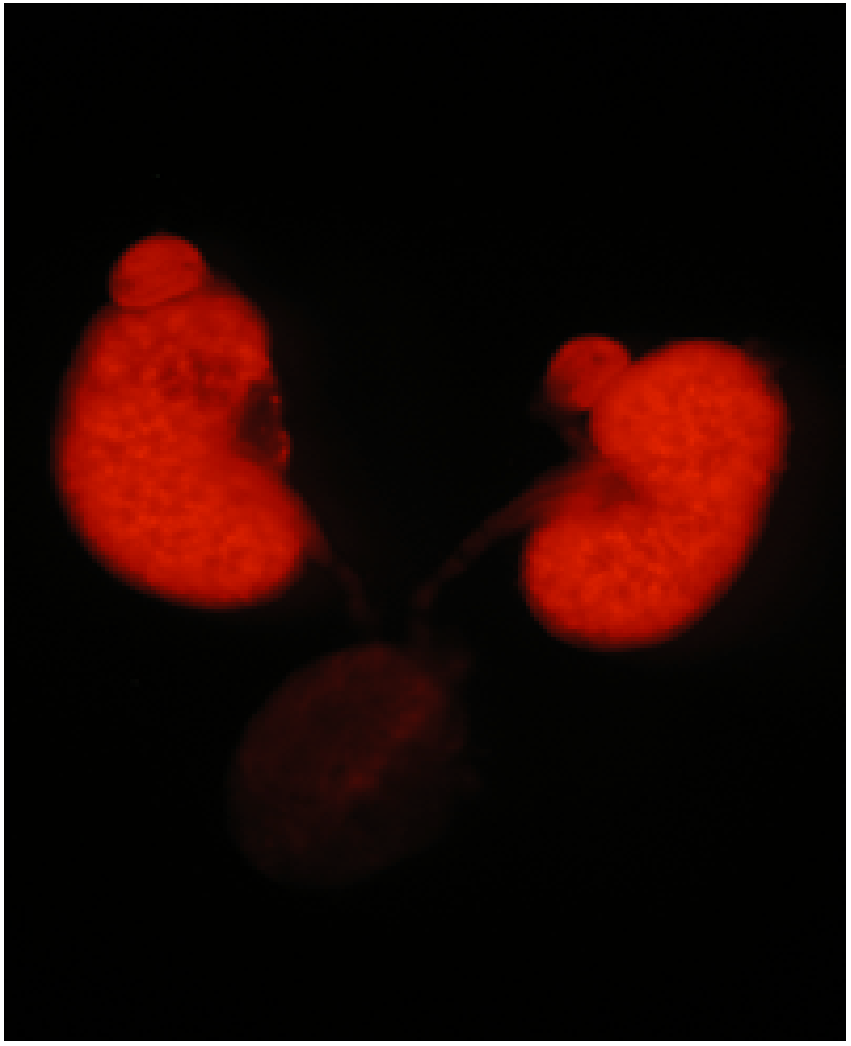
(ES細胞, iPS細胞)



ES細胞由来の腎臓の作出

赤色蛍光遺伝子でマークした ES細胞 → Sall1KOマウス胚盤胞に移植

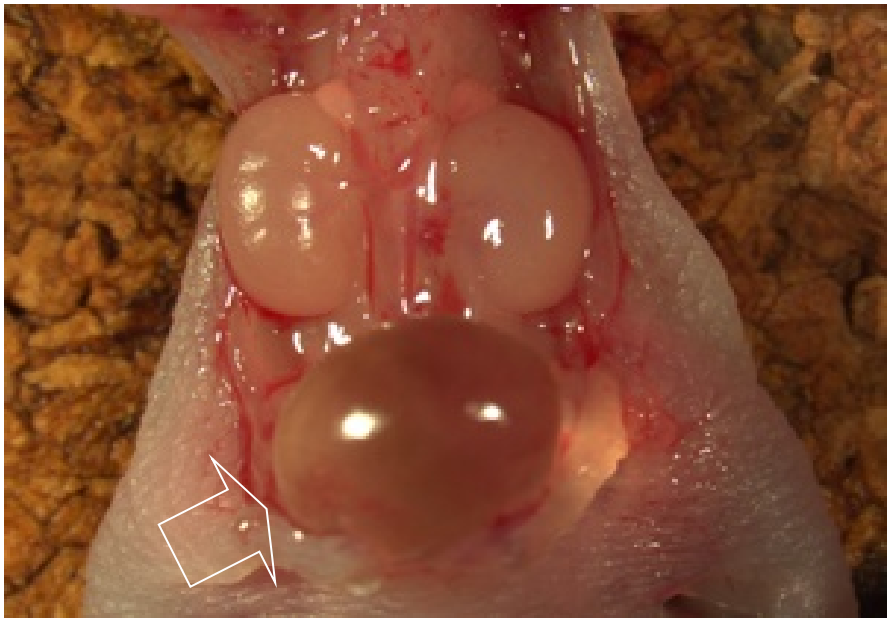




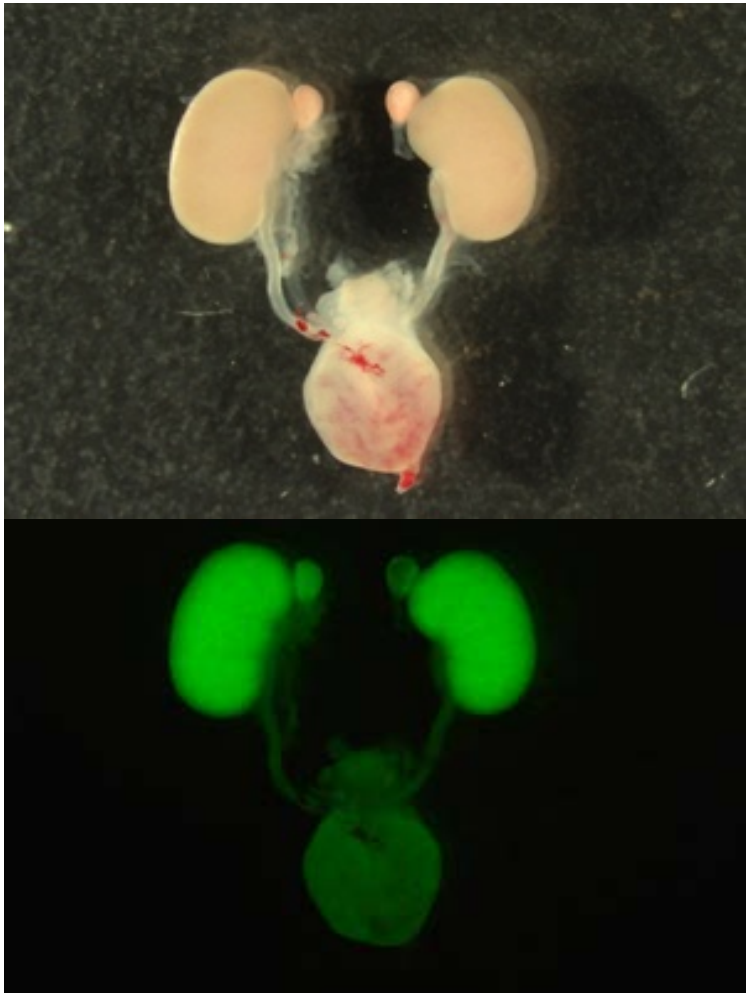
iPS細胞由来の腎臓の作出

Usui *et al. Am. J. Pathol.* 2012

GFP-marked iPS cells → Sall1$^{-/-}$ blastocyst



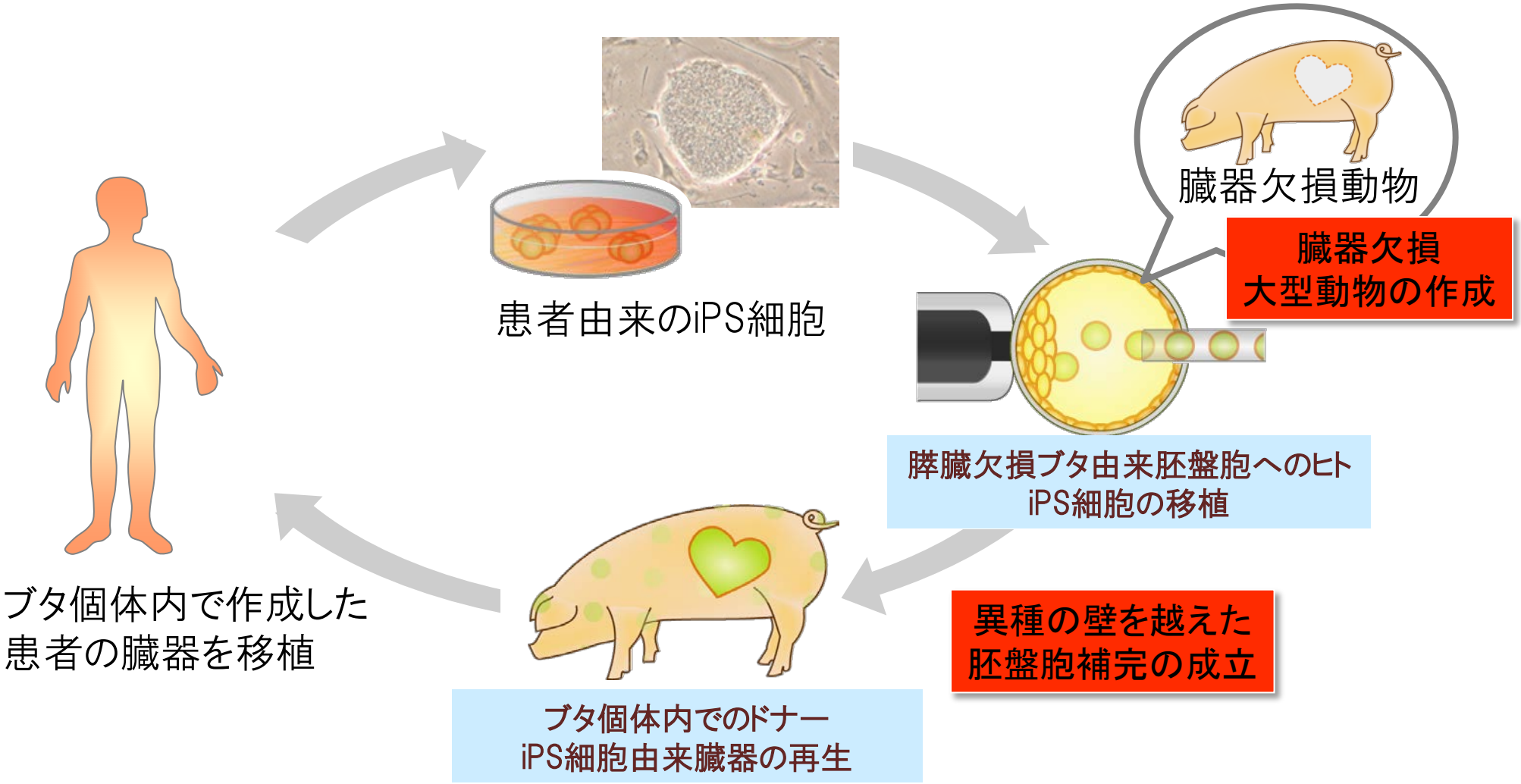
*



*

Reprinted from *The American Journal of Pathology*, vol.180 (no.6):2417-2426, J. Usui, H. Nakauch et.al. (2012) Generation of Kidney from Pluripotent Stem Cells via Blastocyst Complementation, p.2422 Fig.5A [above], B [left], with permission from the journal. Copyright 2012.

動物の個体内でヒトの臓器を作れないだろうか？



異種動物の体内で臓器を作ることは可能か？

iPS細胞を用いてマウス-ラット間で動作原理を確認する

Photo by Rama, from Wikimedia Commons CC BY-SA 2.0 fr
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lab_mouse_mg_3216.jpg

マウス

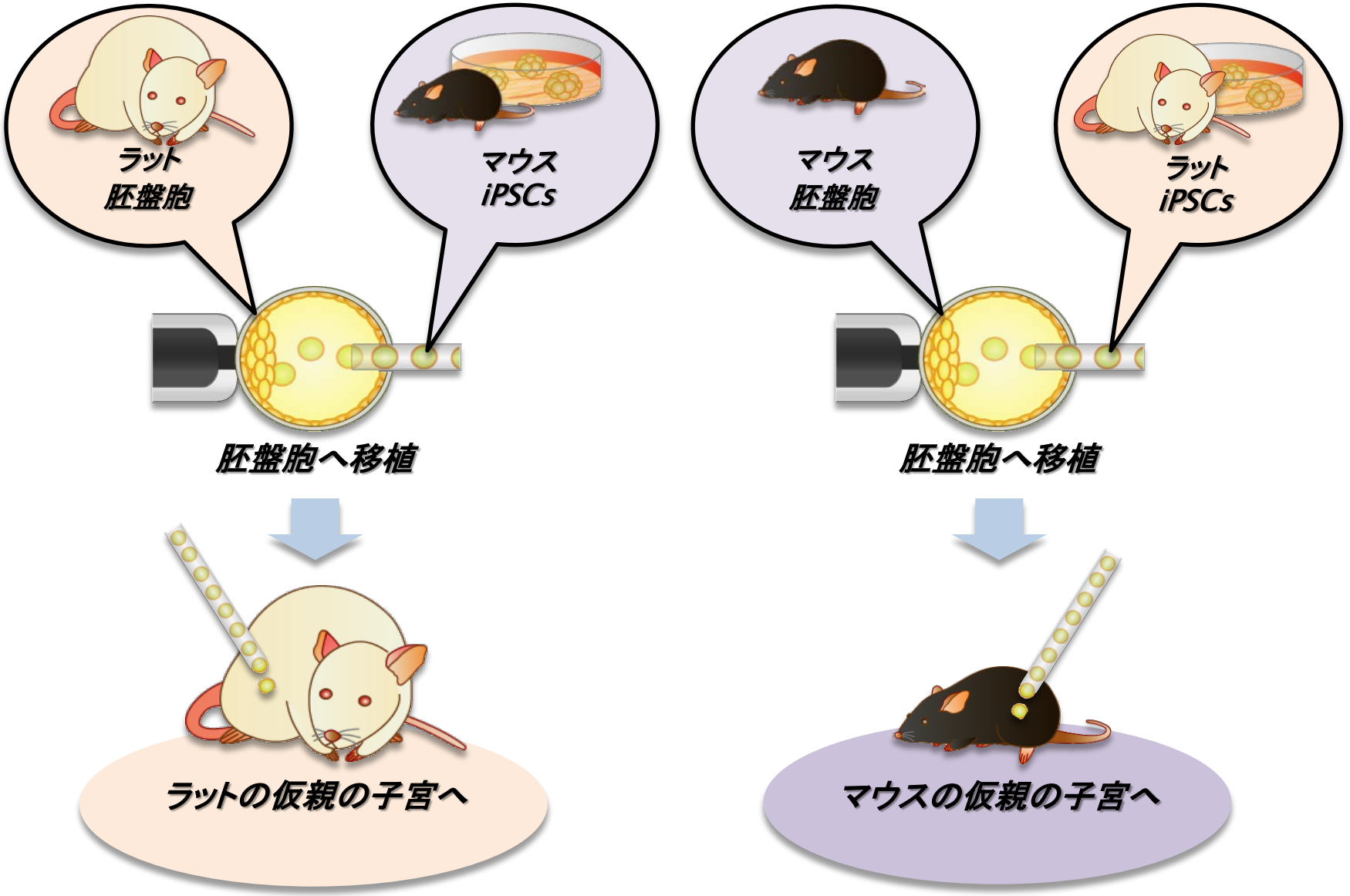
* Photo by Janet Stephens, from the Web site of the National Cancer Institute
http://www.cancer.gov

ラット

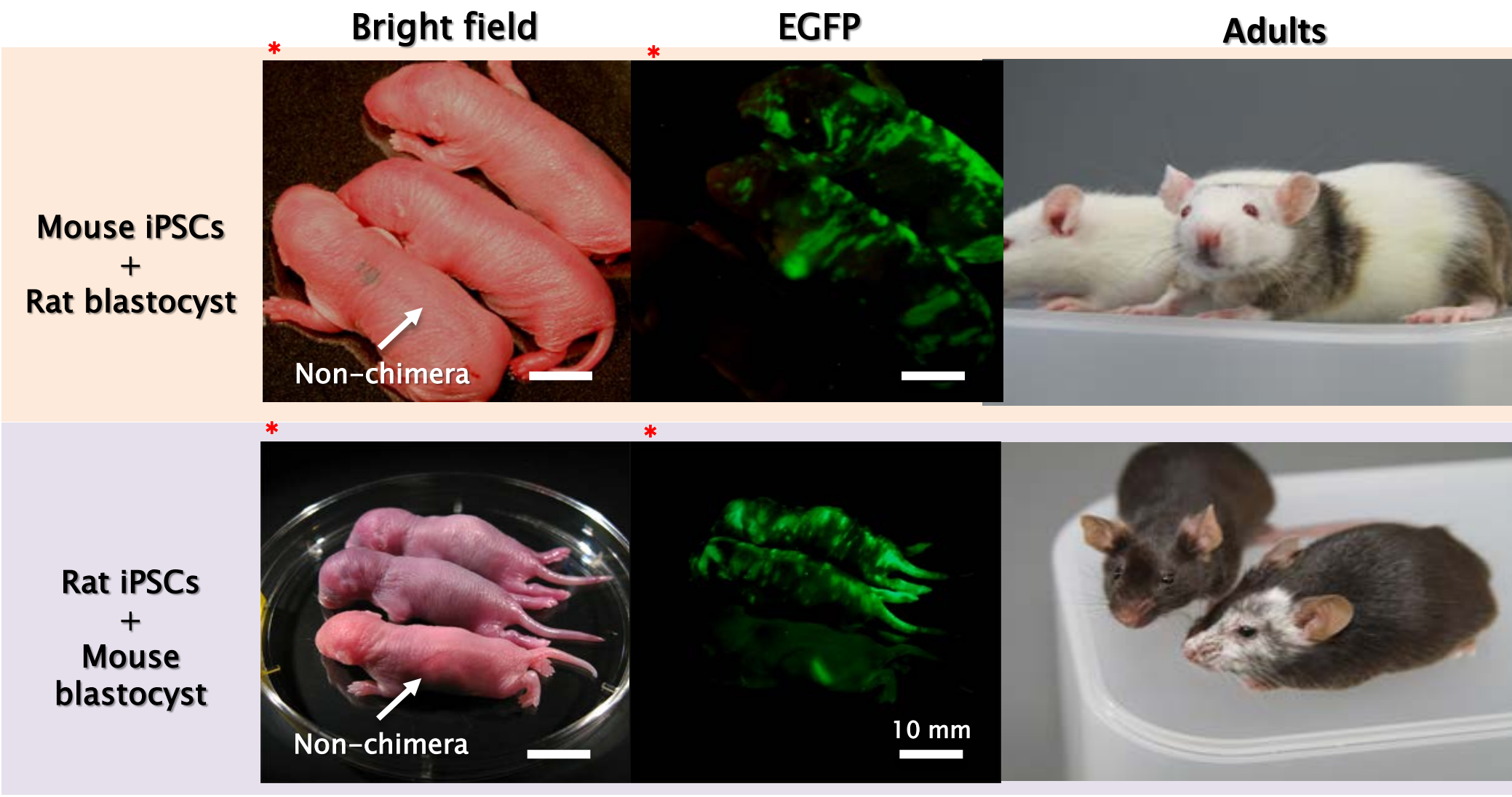
Rat ES cells: Hirabayashi et al. ***Mech Reprod Dev*** *2010*

Rat iPS cells: Hamanaka, et al. ***PlosONE*** *2011*

材料と方法：マウス-ラット異種間キメラ作製



マウス-ラット異種間キメラは出生後成体まで発育可能



Images [left column, center column] from: T. Kobayashi, H. Nakauchi et.al. (2010) Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells, Cell, vol.142 (no.5):787–799, p.793 Fig.5A. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867410008433
Copyright © 2010 Elsevier Inc. License: http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/

マウス–ラット異種間キメラの個体の大きさは用いた胚の種とほぼ同様である

ラット胚盤胞 + **マウス iPS 細胞**

マウス胚盤胞 + **ラット iPS 細胞**

The size of chimeras seemed to conform with that in the species from which the blastocyst originated.

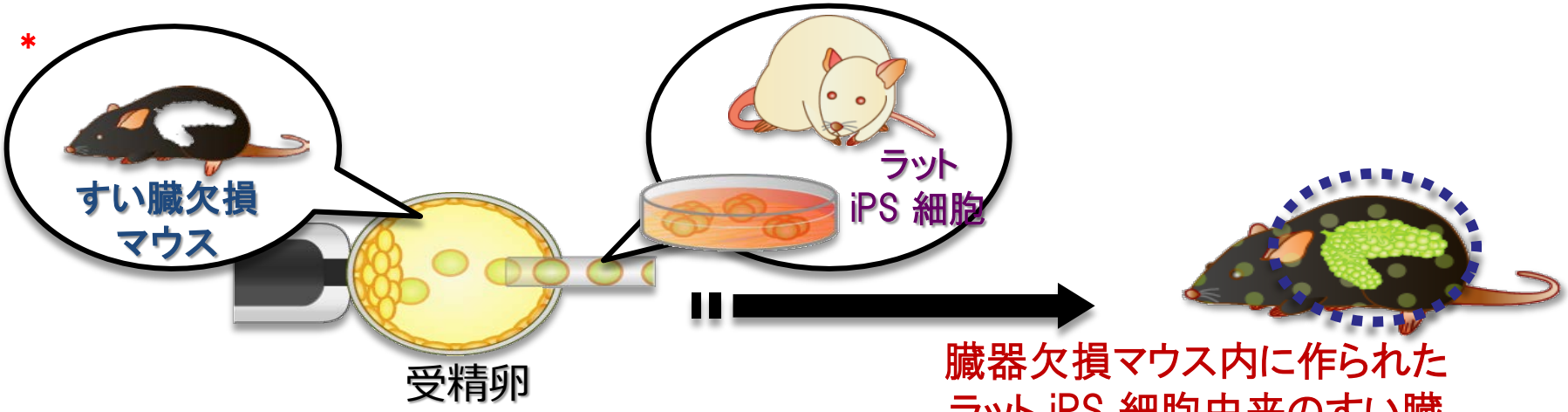
マウス–ラット異種間キメラの個体の大きさは用いた胚の種とほぼ同様である

The size of chimeras seemed to conform with that in the species from which the blastocyst originated.

マウス個体内にラットのすい臓を作ることに成功

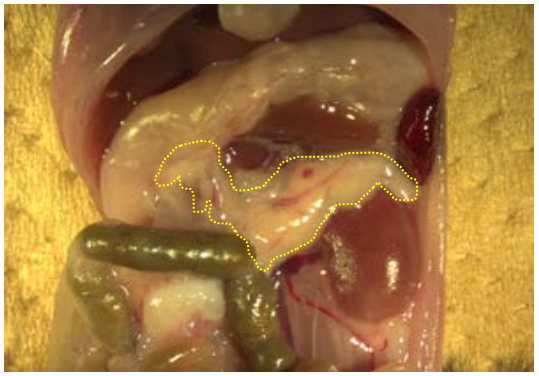
Kobayashi *et al.* *Cell* 2010

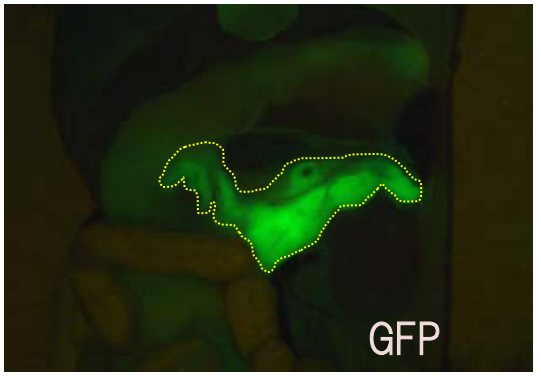
膵臓欠損マウスとラットiPS細胞を使って異種の壁に挑戦！



臓器欠損マウス内に作られた
ラット iPS 細胞由来のすい臓

すい臓の大きさはマウスサイズ！

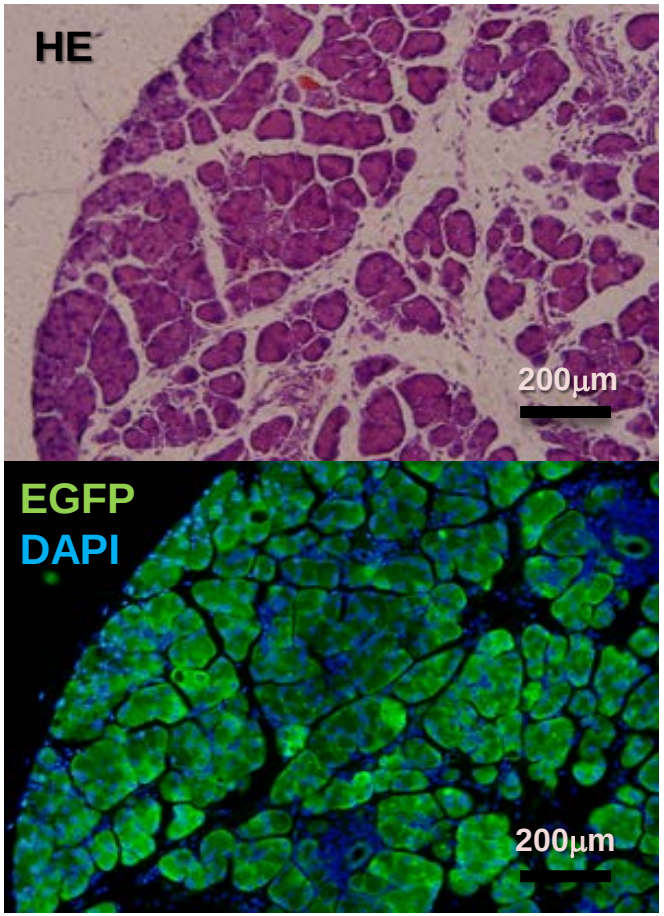




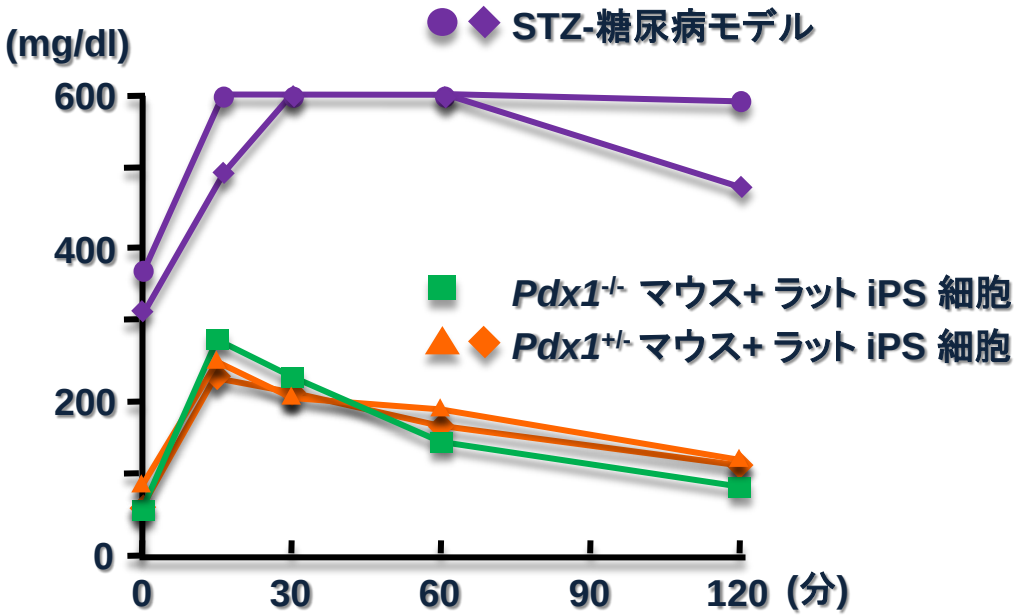
Images from: T. Kobayashi, H. Nakauchi et.al. (2010) Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells, Cell, vol.142 (no.5):787–799, [above] Graphic Abstract; [left below] p.795 Fig.7C; [right below] p.795 Fig.7E. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867410008433
Copyright © 2010 Elsevier Inc. License: http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/

Pdx1 KO マウスに作出されたラットの膵臓は組織学的および機能的に正常な膵臓であった

A. 膵臓の形態と EGFP 陽性細胞の分布



B. 糖負荷後の血糖値推移

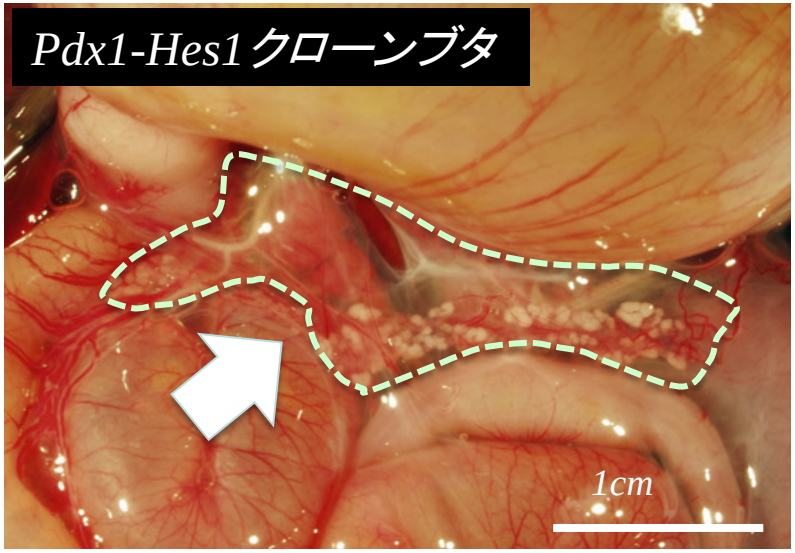


Images from: T. Kobayashi, H. Nakauchi et.al. (2010）Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells, Cell, vol.142 (no.5):787–799, . p.795 Fig.7F http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867410008433
Copyright © 2010 Elsevier Inc. License: http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/

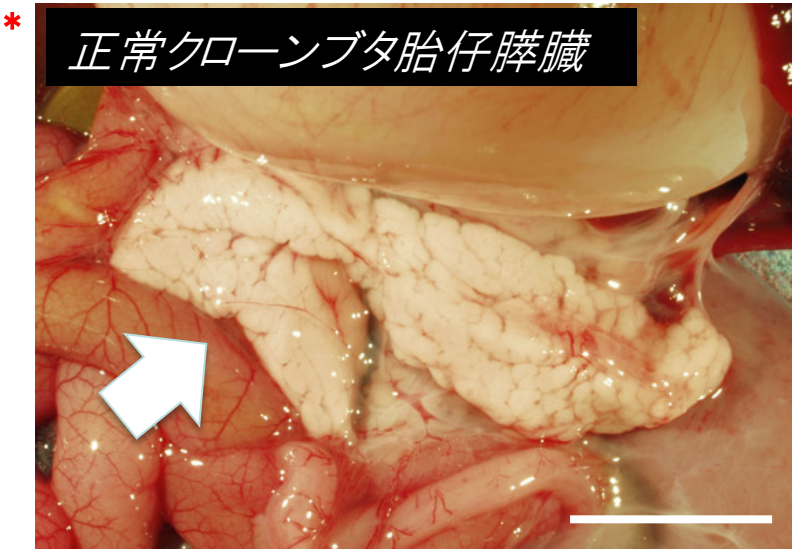
膵臓欠損ブタの作成に成功！

Matsunari *et al.* *PNAS* 2013

膵臓欠損ブタ



野生型ブタ

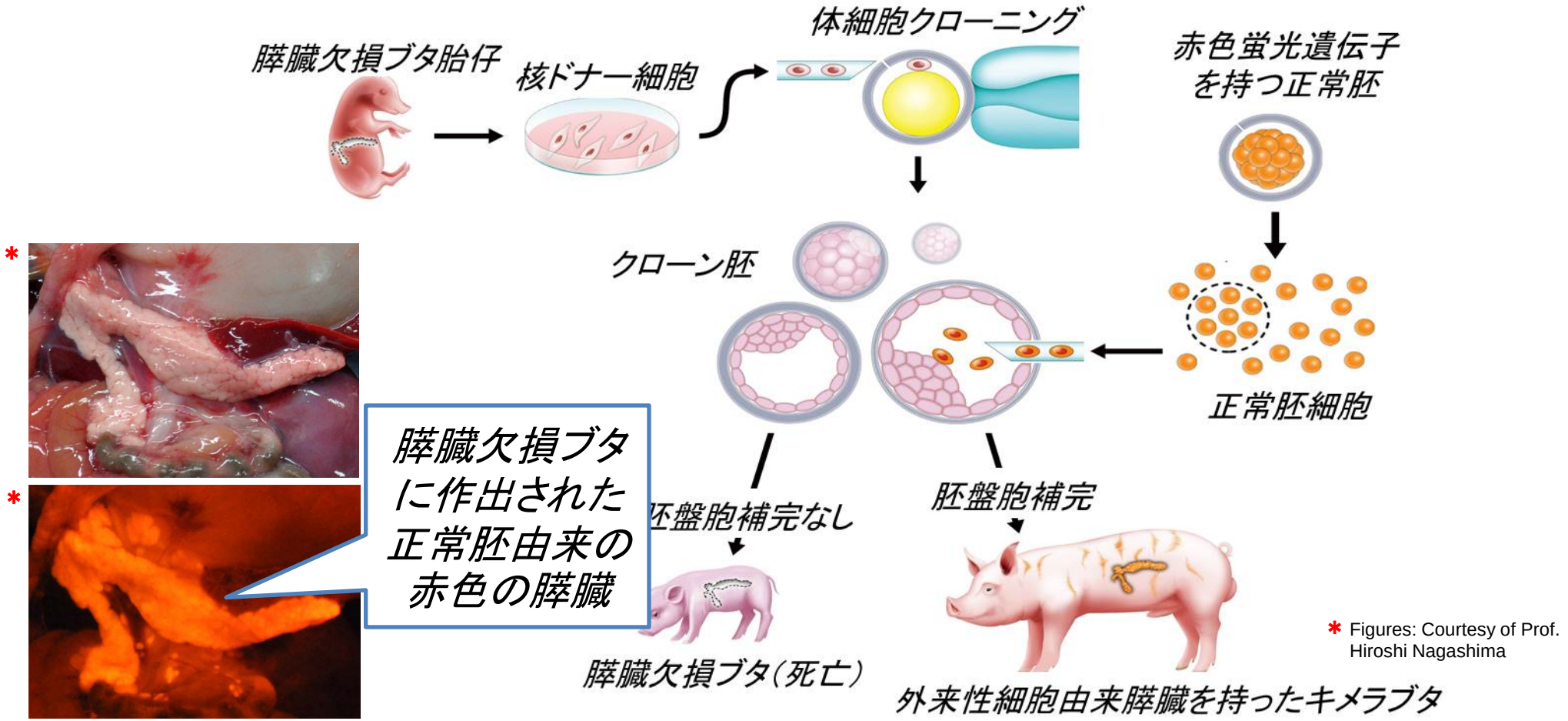


膵臓の発生を制御する機能を持つ遺伝子をブタの細胞に導入することにより膵臓の無いブタを作成することに成功した。

Reprinted from H. Matsunari, H. Nakauchi et.al. (2013) Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.110 (no.12): 4557–4562, p.4561 Fig.4C. Copyright 2013 the authors.
http://www.pnas.org/content/110/12/4557.full?sid=ef7065f9-da08-4771-9a98-aca7393d39db

膵臓欠損ブタを利用して健常ブタ細胞由来の膵臓の作出に成功！

ブタのES細胞やiPS細胞が未だできていないので、幹細胞として赤色蛍光遺伝子を持つブタの胚細胞を膵臓欠損ブタの胚に移植した。



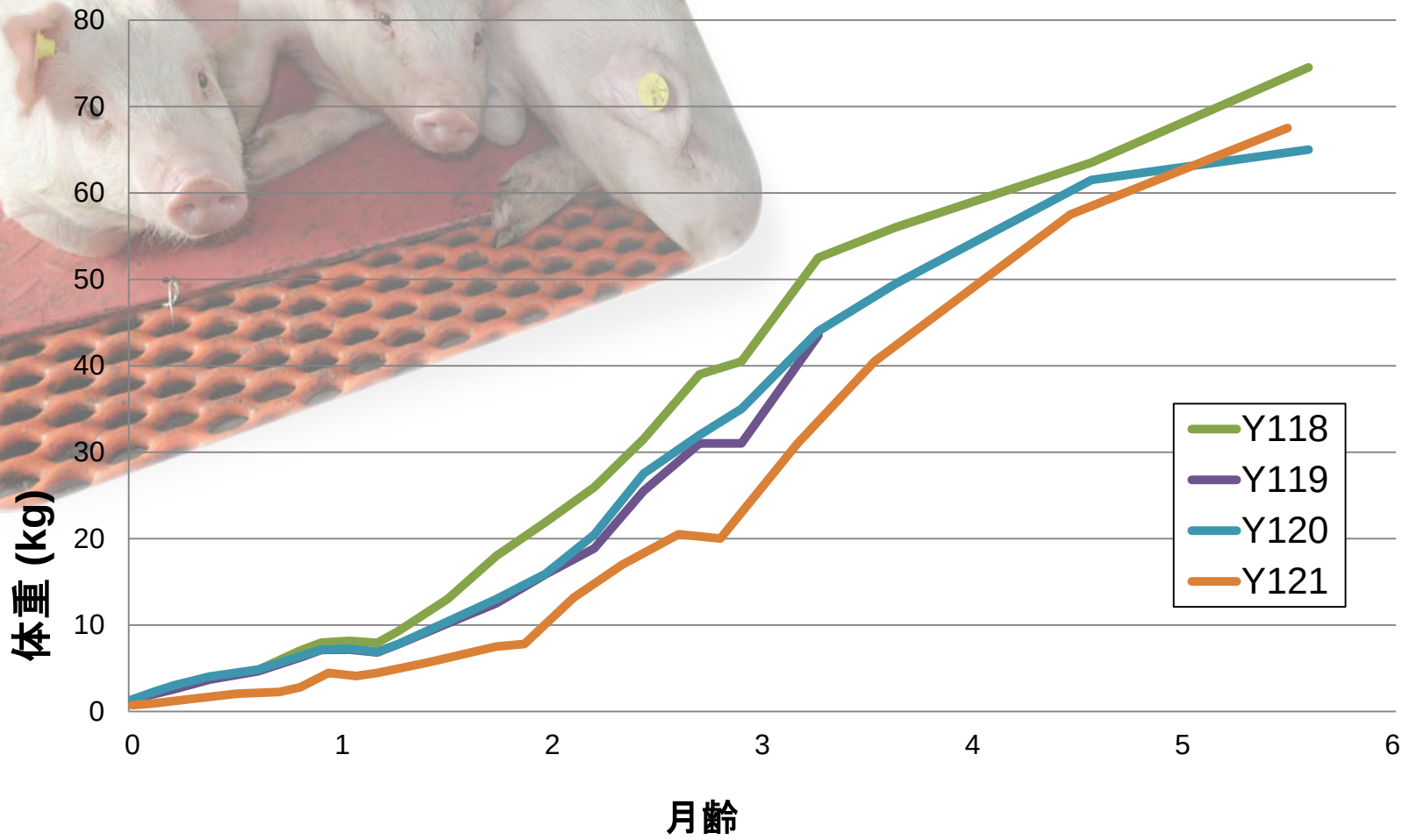
Photos (on the left) reprinted from H. Matsunari, H. Nakauchi et.al. (2013) Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.110 (no.12): 4557–4562, p.4560 Fig.3D. Copyright 2013 the authors. http://www.pnas.org/content/110/12/4557.full?sid=ef7065f9-da08-4771-9a98-aca7393d39db

Matsunari *et al.* *PNAS* 2013

胚盤胞補完により誕生したキメラブタの成長

Matsunari *et al.* *PNAS* 2013

* 画像提供：松成ひとみ氏



キメラ個体は生殖能力のある成熟雄に発育した

Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs

Hitomi Matsunari, Hiroshi Nagashima, Masahito Watanabe, Kazuhiro Umeyama, Kazuaki Nakano, Masaki Nagaya, Toshihiro Kobayashi, Tomoyuki Yamaguchi, Ryo Sumazaki, Leonard A. Herzenberg, and Hiromitsu Nakauchi

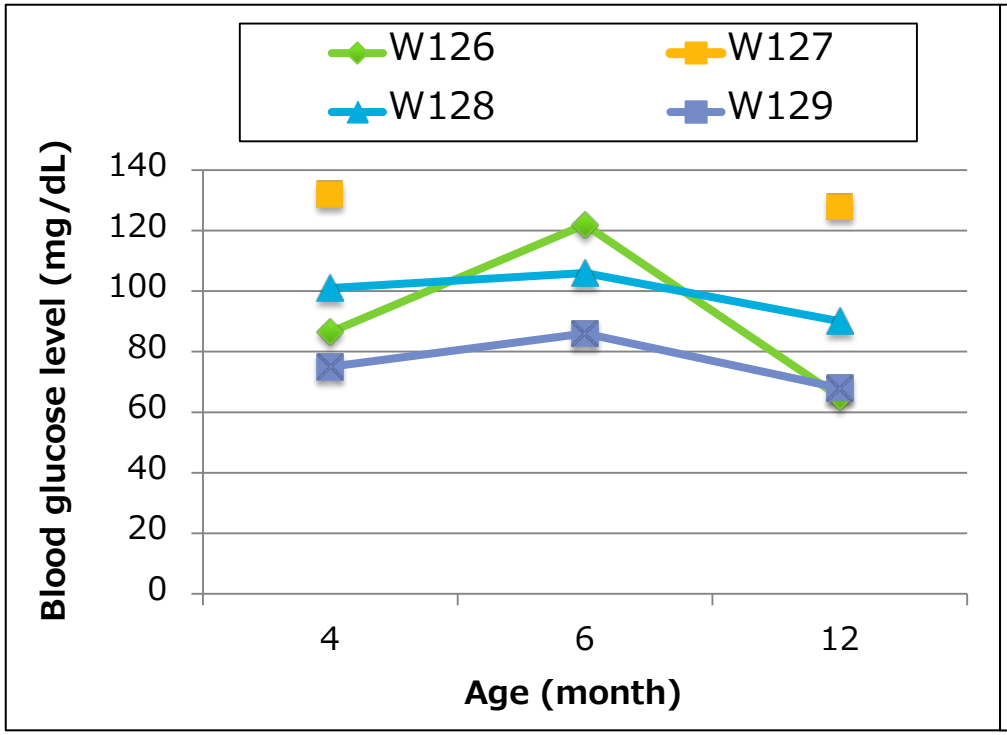
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol.110 (no.12, 2013): 4557–4562

* Image from: Matsunari, Nakauchi et.al. (2013) Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.110(no.12): 4557–4562 p.4561 Fig.4B. Copyright 2013 by the authors.

***Pdx1-Hes1*⇔有色ブタ キメラ（7.5ヶ月齢）**

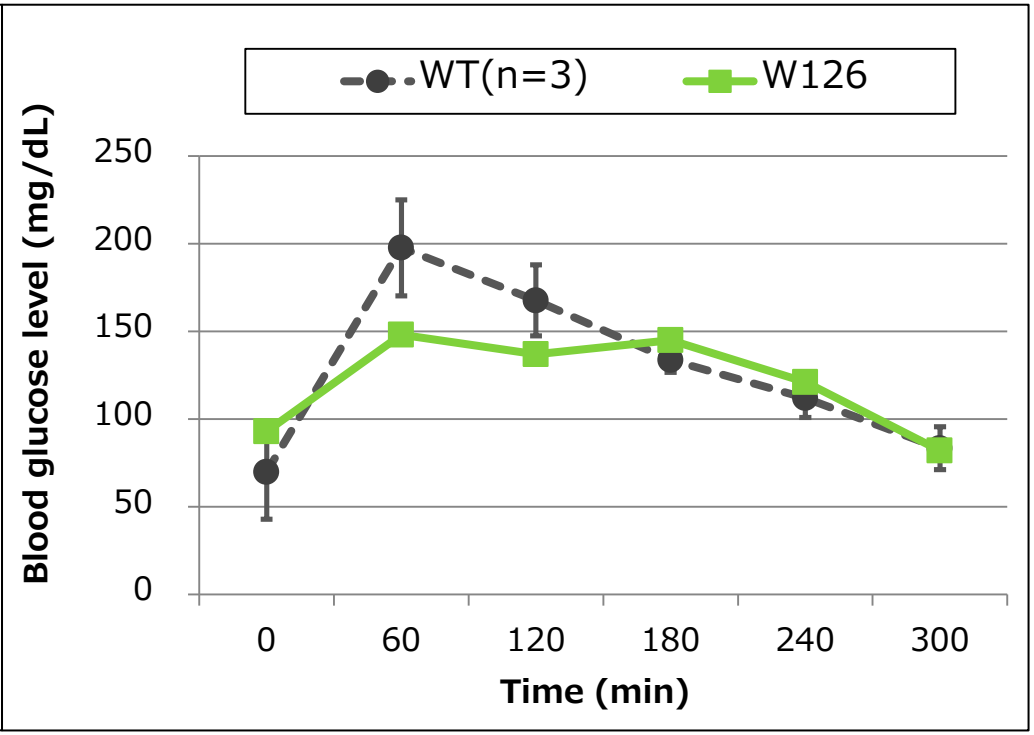
キメラブタの補完された膵臓の機能は正常

随時血糖値



成長過程の随時血糖値は正常

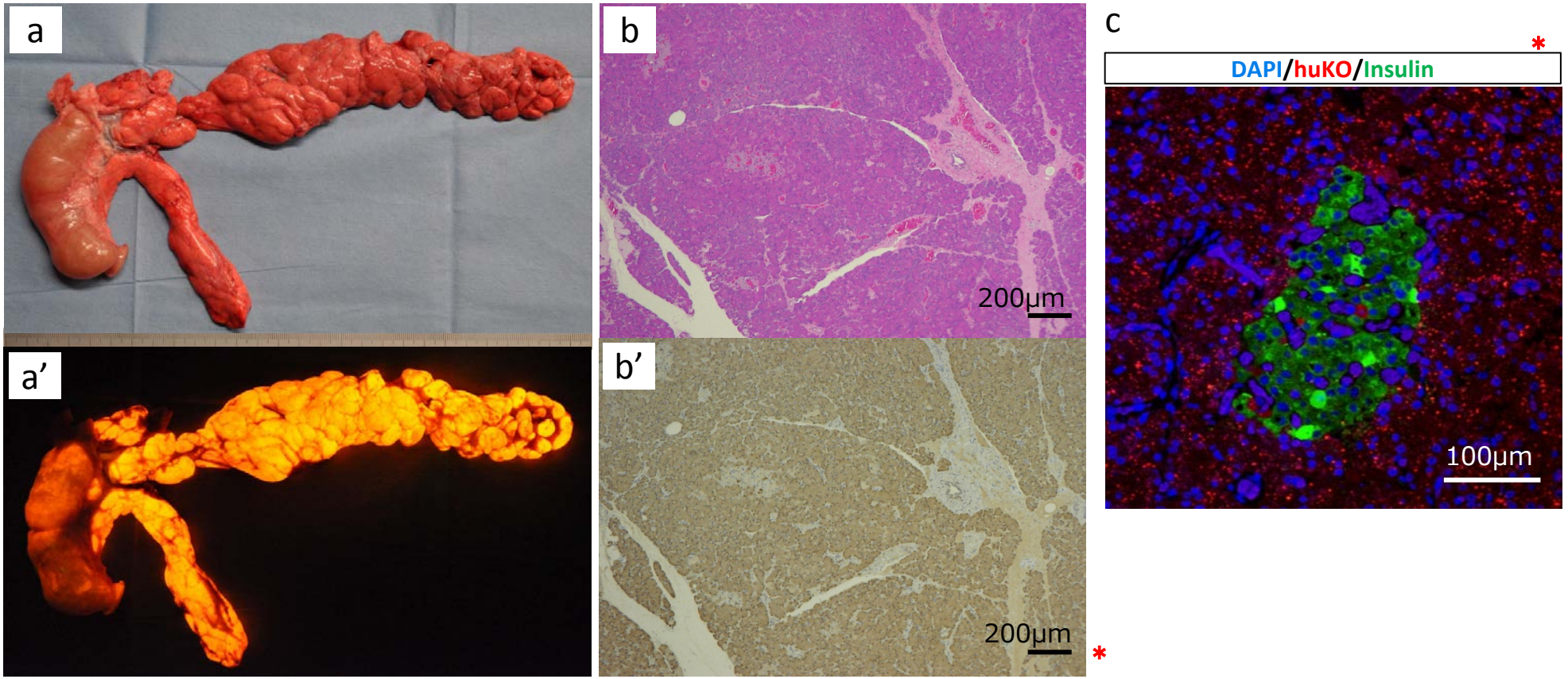
糖負荷試験



糖代謝能は正常

キメラ成熟個体にできた膵臓の解析

個体No. W128　12ヶ月齢



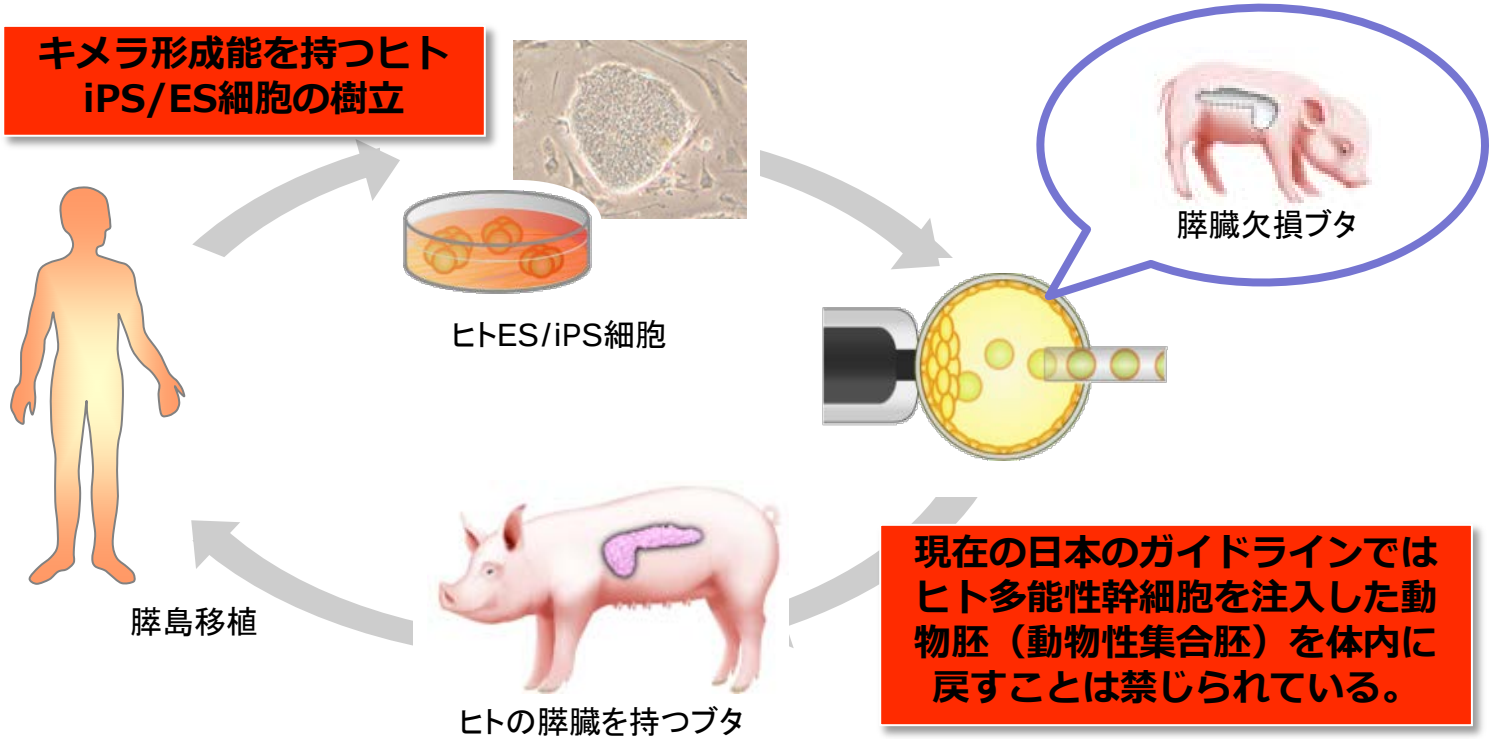
a, a’: 膵臓のマクロ像(a)及びそのhuKO発現像(a’).
b, b’: 膵臓のHE染色(b)並びに抗huKO抗体染色(b’).
c: インスリンとhuKOの蛍光二重染色.

Images reprinted from H. Matsunari, H. Nakauchi et.al. (2013) Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.110 (no.12): 4557–4562, [a, a’] p.4561 Fig.4G; [b, b’] ibid. Fig.4H; [c] ibid. Fig.4I. Copyright 2013 the authors.
http://www.pnas.org/content/110/12/4557.full?sid=ef7065f9-da08-4771-9a98-aca7393d39db

異種動物の個体内でヒトの臓器を作る可能性が見えてきた

現在の課題

1. キメラ形性能を持つヒトiPS細胞の樹立
2. 動物性集合胚のヒトまたは動物の胎内への移植は、現在のガイドラインでは不可。(米英国では承認を得ることにより動物体内への移植は可能。中国・韓国等、多くの国では規制無し)



Contributors (臓器再生)

JST ERATO　中内幹細胞制御プロジェクト

東京大学 医科学研究所
幹細胞治療研究センター
幹細胞治療分野

小林俊寛研究員

山口 智之 研究員

濱仲 早苗 研究員

山崎 聡 研究員

山崎 祐治 氏

佐藤 秀征 氏

渡部 素生 技術参事

明治大学農学部
命科学科発生工学研究室

長嶋比呂志 教授

松成ひとみ研究員

自然科学研究機構、生理学研究所

平林真澄 准教授

加藤めぐみ　研究員

熊本大学 発生医学研究センター
細胞識別分野

西中村 隆一 教授

JA全農
飼料畜産中央研究所

普川一雄　所長

千代　豊　主任研究員

筑波大学大学院 人間総合科学研究科
疾患制御医学専攻 小児内科学分野

須磨崎 亮 教授

福島県立医科大学 臓器再生外科

伊勢 一哉 助教

筑波大学大学院 人間総合科学研究科
病態制御医学専攻　腎臓病態医学分野

臼井 丈一 講師