

クレジット:

UTokyo Online Education 東京大学朝日講座 2016 中内啓光

ライセンス:

利用者は、本講義資料を、教育的な目的に限ってページ単位で利用することができます。特に記載のない限り、本講義資料はページ単位でクリエイティブ・コモンズ 表示-非営利-改変禁止 ライセンスの下に提供されています。

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

本講義資料内には、東京大学が第三者より許諾を得て利用している画像等や、各種ライセンスによって提供されている画像等が含まれています。個々の画像等を本講義資料から切り離して利用することはできません。個々の画像等の利用については、それぞれの権利者の定めるところに従ってください。

iPS細胞技術が可能にする新しい医療 「ヒトの臓器を動物で作る」

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
スタンフォード大学
幹細胞生物学・再生医療研究所

中内啓光 （なかうち ひろみつ）

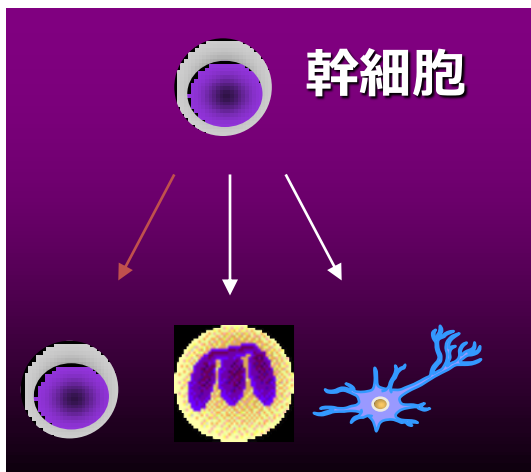
- 麻布学園高校卒業
- 横浜市立大学医学部入学
医学部6年生のときに1年間ハーバード大学医学部留学
- 医学部卒業後横浜市大病院内科研修
- 東京大学大学院医学系研究科で免疫学を専攻
- 大学院修了後研究員としてスタンフォード大学医学部留学
- 帰国後、順天堂大学医学部、理化学研究所を経て
- 平成5年より筑波大学基礎医学系免疫学教授
- 平成14年より東京大学医科学研究所教授
- 平成25年よりStanford大学教授を兼務

基礎科学の知識や方法論を臨床医学と結びつけることにより、新しい病気や治療法の発見など、先端医療の確立に貢献することが目標！

Stem Cells / 幹細胞

「**多分化能**」 いろいろな細胞に分化する能力

「**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

Stem Cells / 幹細胞

全能性幹細胞:

個体を構成する全ての細胞に分化可能
受精卵(胚)

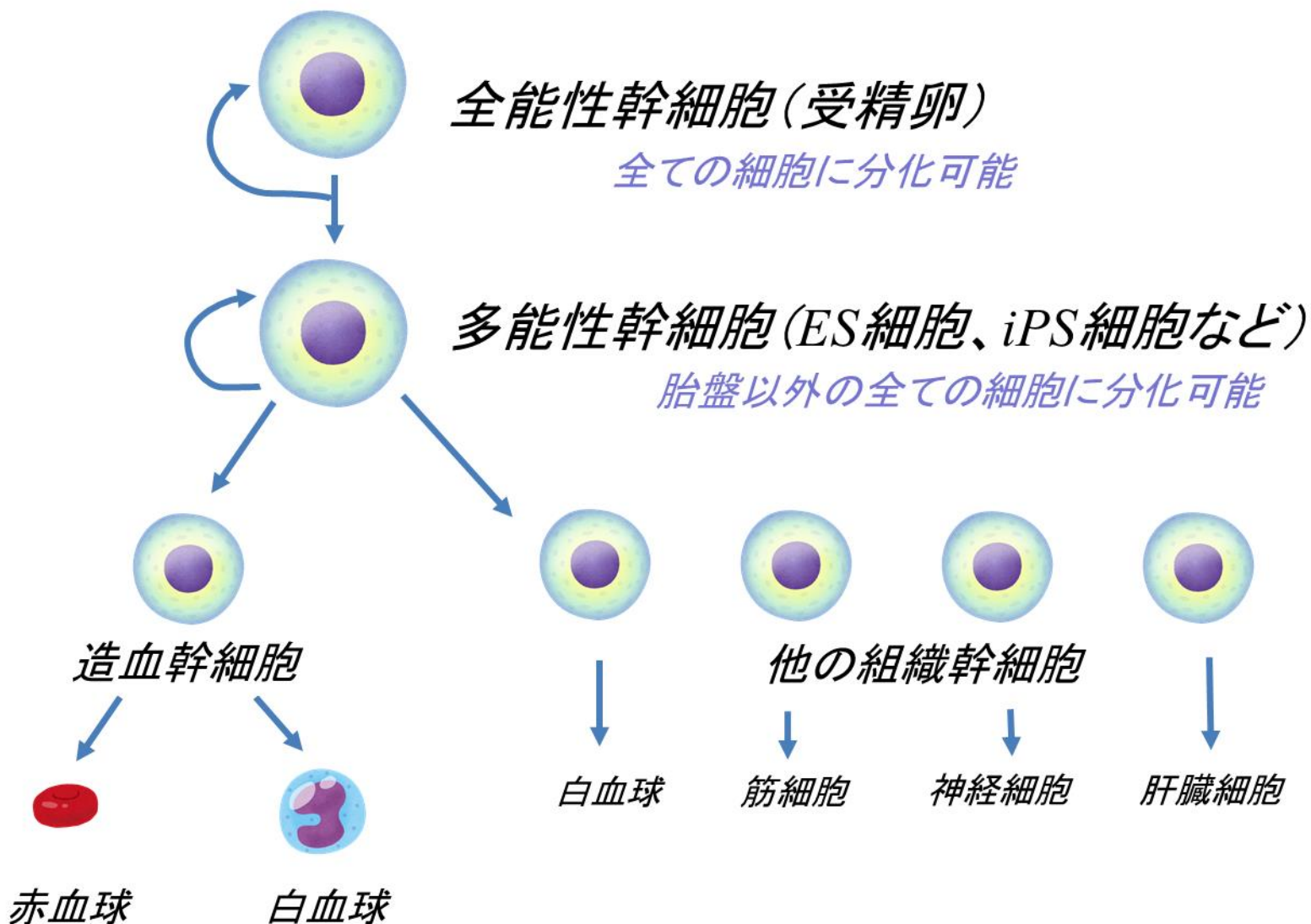
多能性幹細胞:

胎盤以外の全ての細胞に分化可能
ES (胚性幹) 細胞、*iPS*細胞

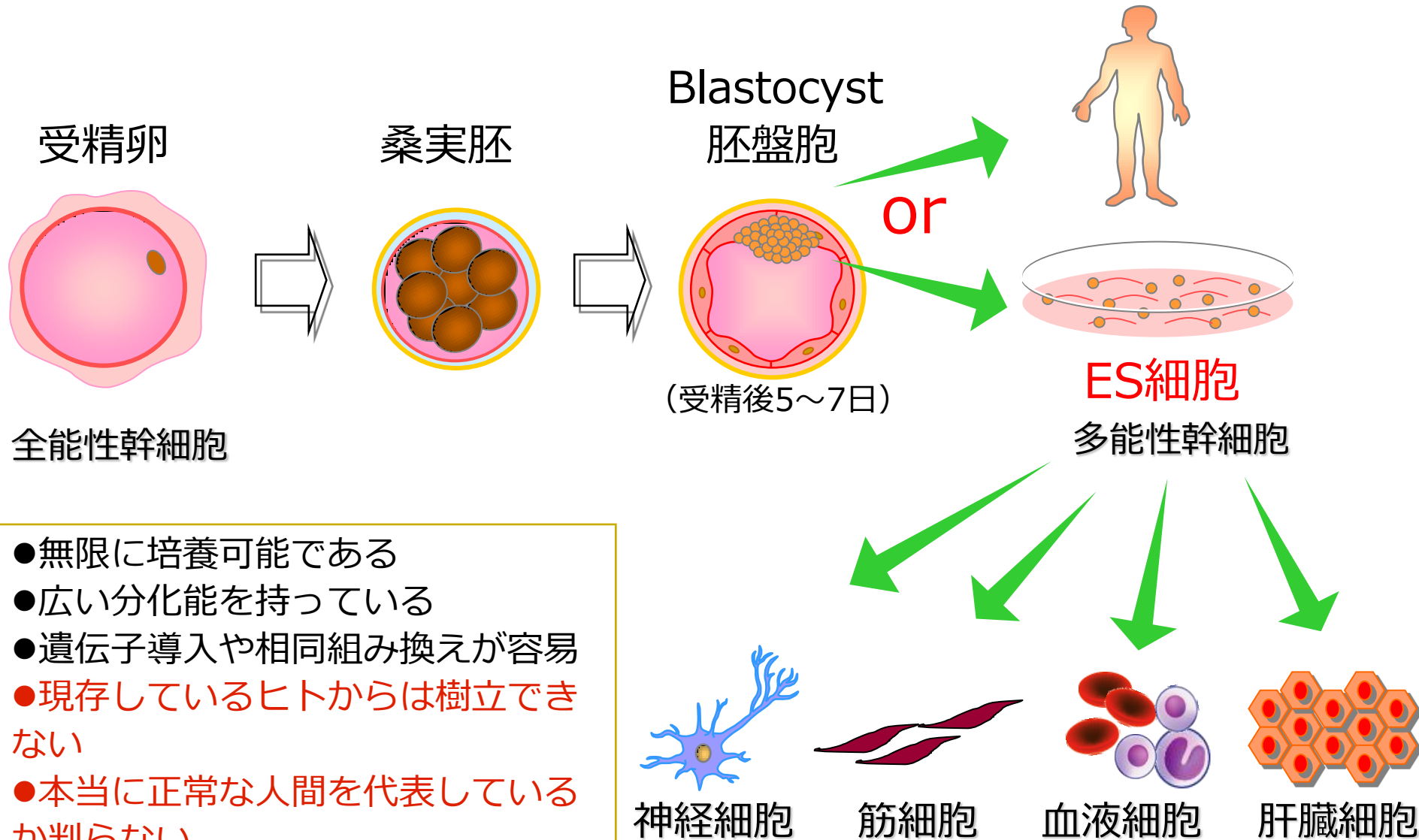
組織幹細胞、成体幹細胞:

特定の組織・臓器に局限した分化能を持つ
造血幹細胞、神経幹細胞など

種々の幹細胞とその階層性



ES (胚性幹) 細胞



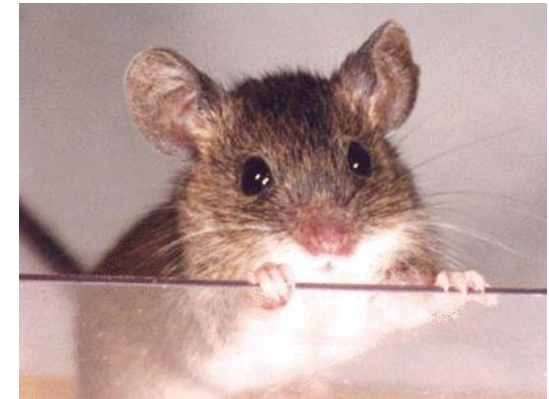
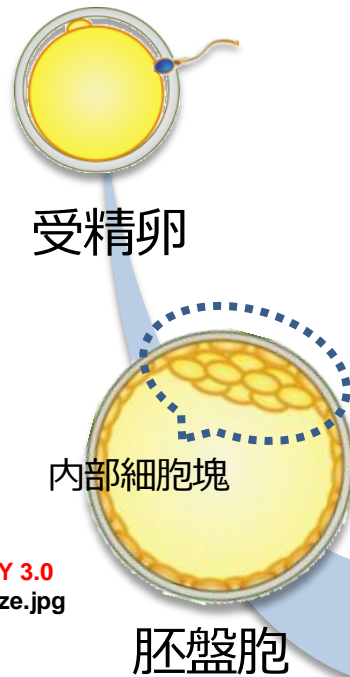
マウスES細胞の樹立



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

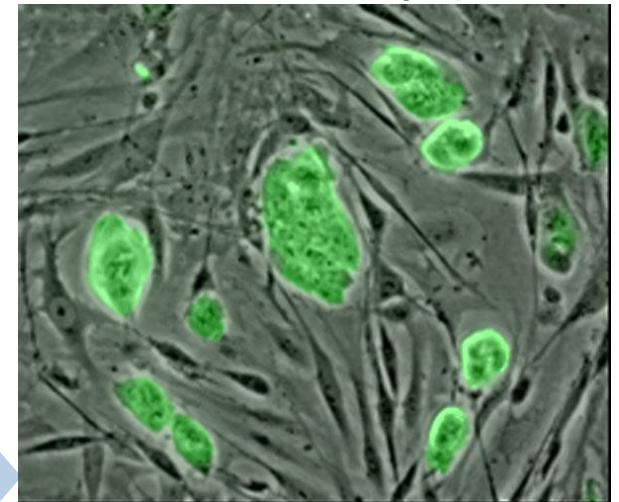


Image Credit: Niels Geijsen, Massachusetts General Hospital/National Science Foundation

ヒトES (胚性幹) 細胞

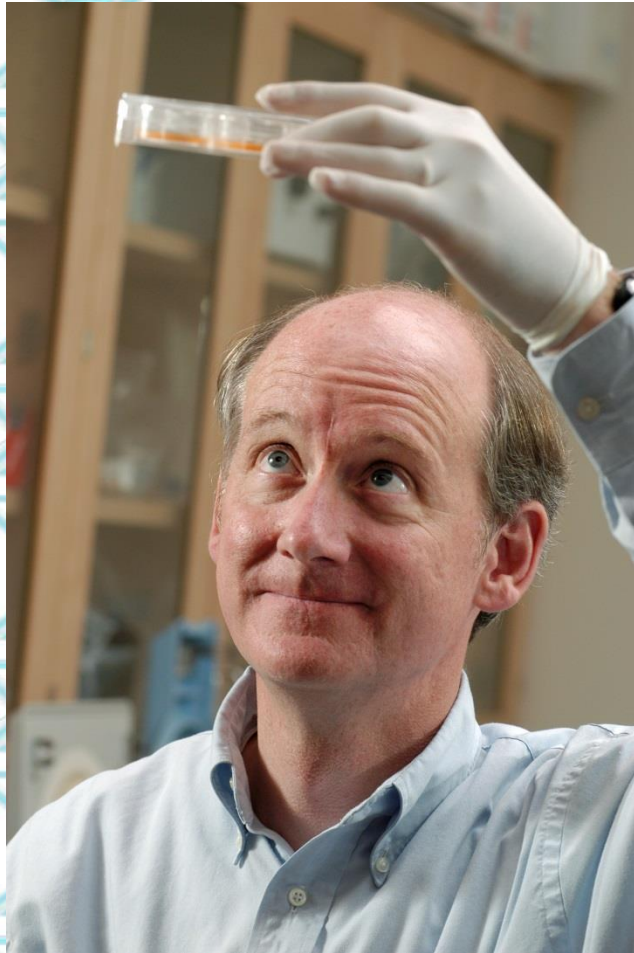


Photo credit: Jeff Miller / University of Wisconsin-Madison

James Thomson

1998年
ヒトES細胞の樹立に成功



受精卵



内部細胞塊

胚盤胞

ヒトES細胞

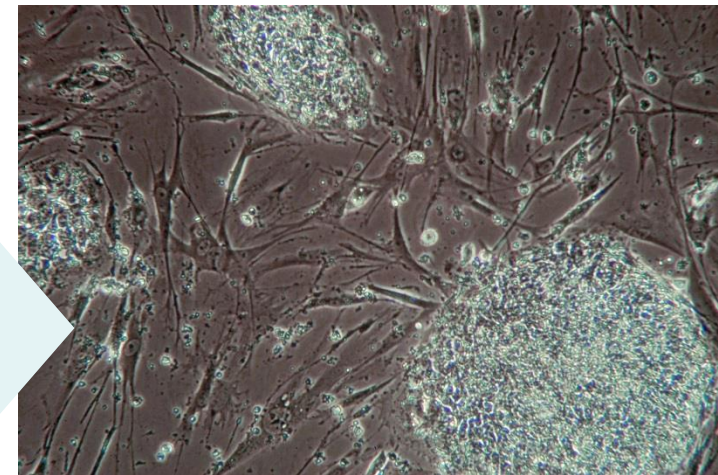
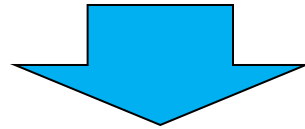


Photo credit: Jeff Miller / University of Wisconsin-Madison

ES細胞を用いた治療の問題点

ES細胞は受精して一週間以内の胚から作った細胞。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。



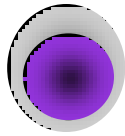
免疫拒絶の無い安全な細胞移植を実現するには患者自身の多能性幹細胞を作る必要がある。

クローン胚の技術を利用した
患者自身の多能性幹細胞の樹立

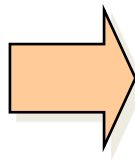
細胞分化の非可逆性

細胞の分化の過程は一方方向性でもとには戻らない？

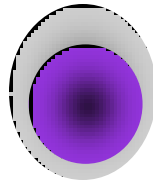
多能性幹細胞



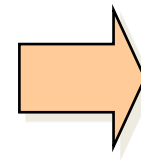
Multi-potency



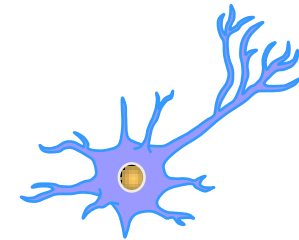
前駆細胞



Oligo-potency

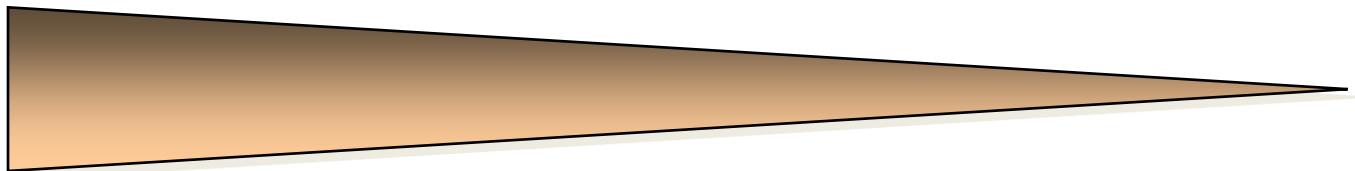


分化細胞(体細胞)



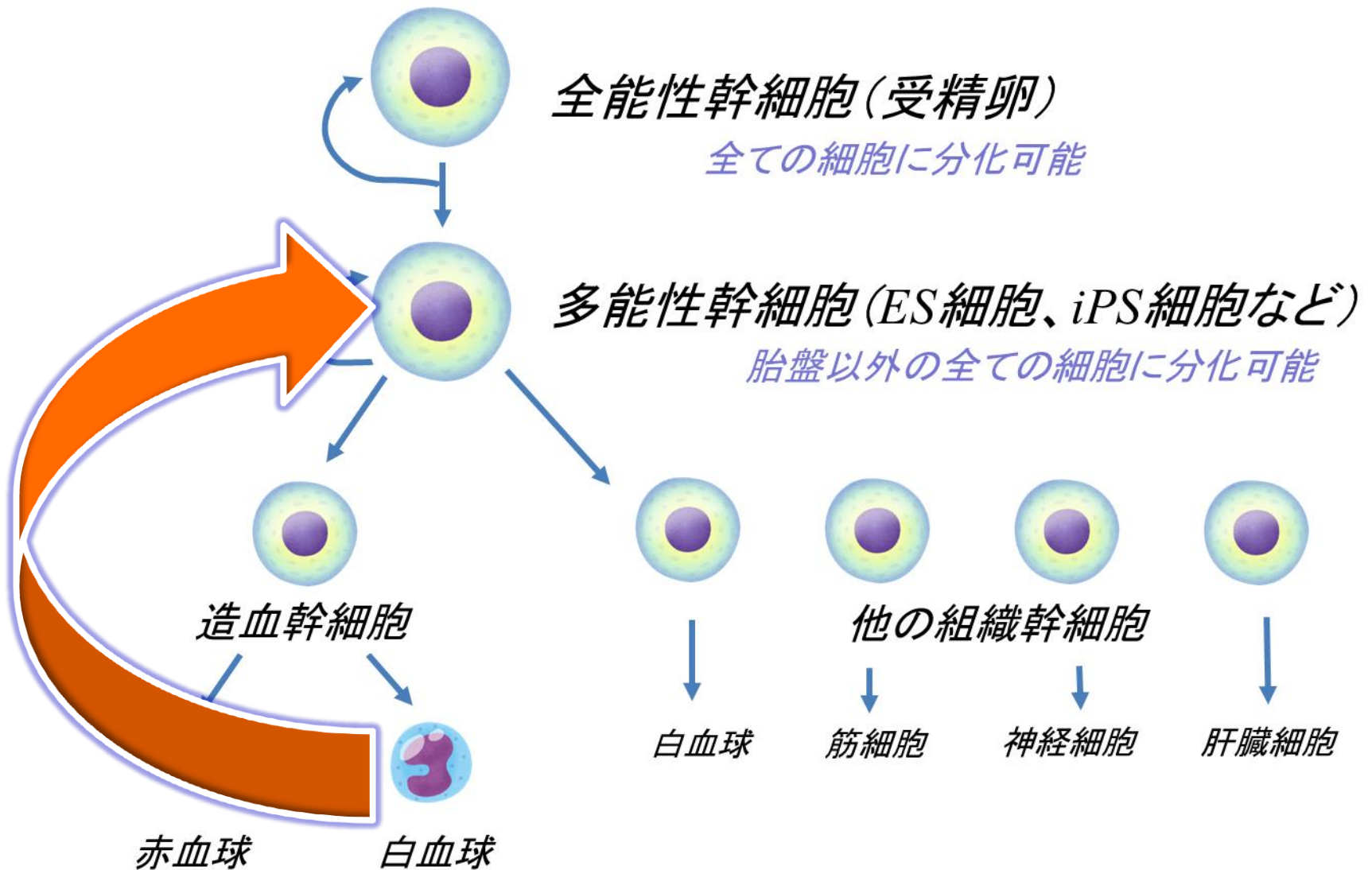
Uni-potency

多分化能



細胞が若返るのは不可能というのが常識

体細胞を若返らせて幹細胞を作る



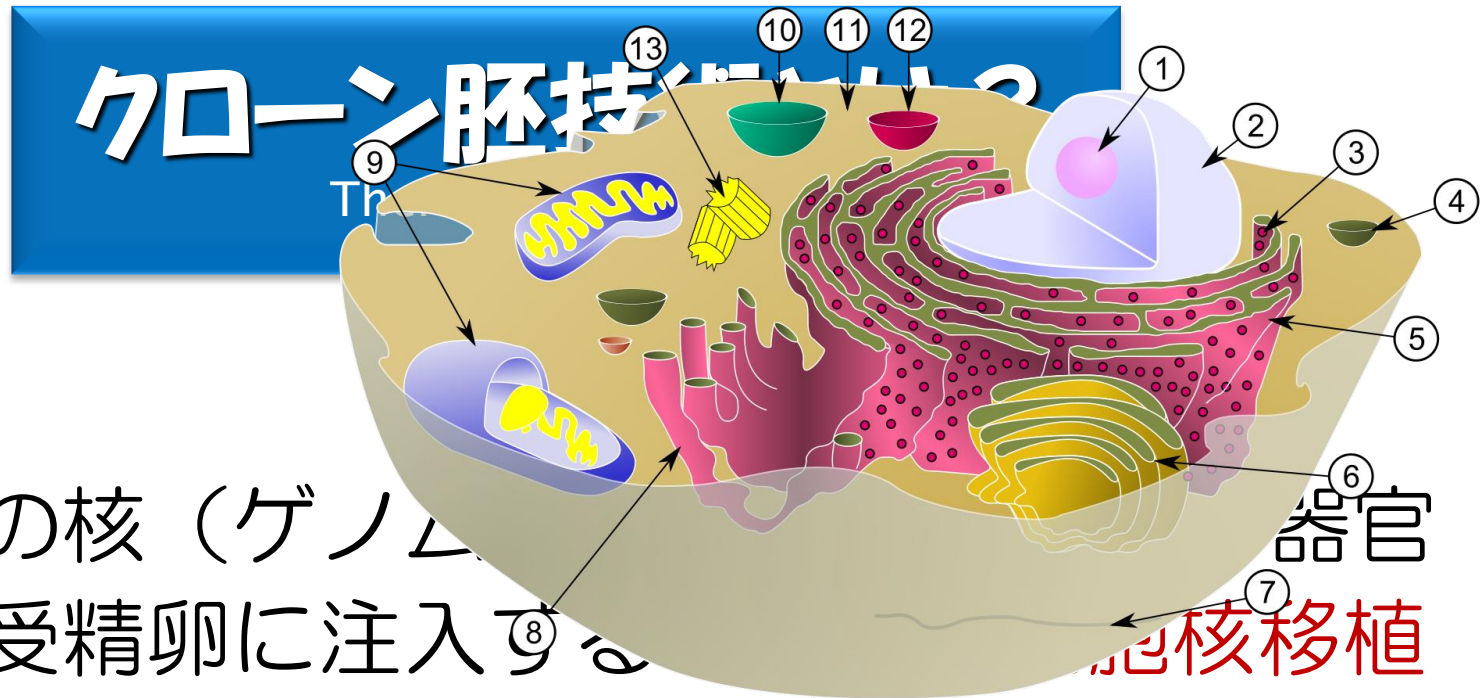
クローン胚技術とは？

Therapeutic Cloning

体細胞の核（ゲノムDNAを含む細胞内小器官）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）

体細胞核移植を利用した
細胞（ゲノム）の若返り技術



体細胞の核（ゲノム）を未受精卵に注入することにより、核の状態に戻すこと（初期化）が可能である。
（体細胞から受精卵への若返り）

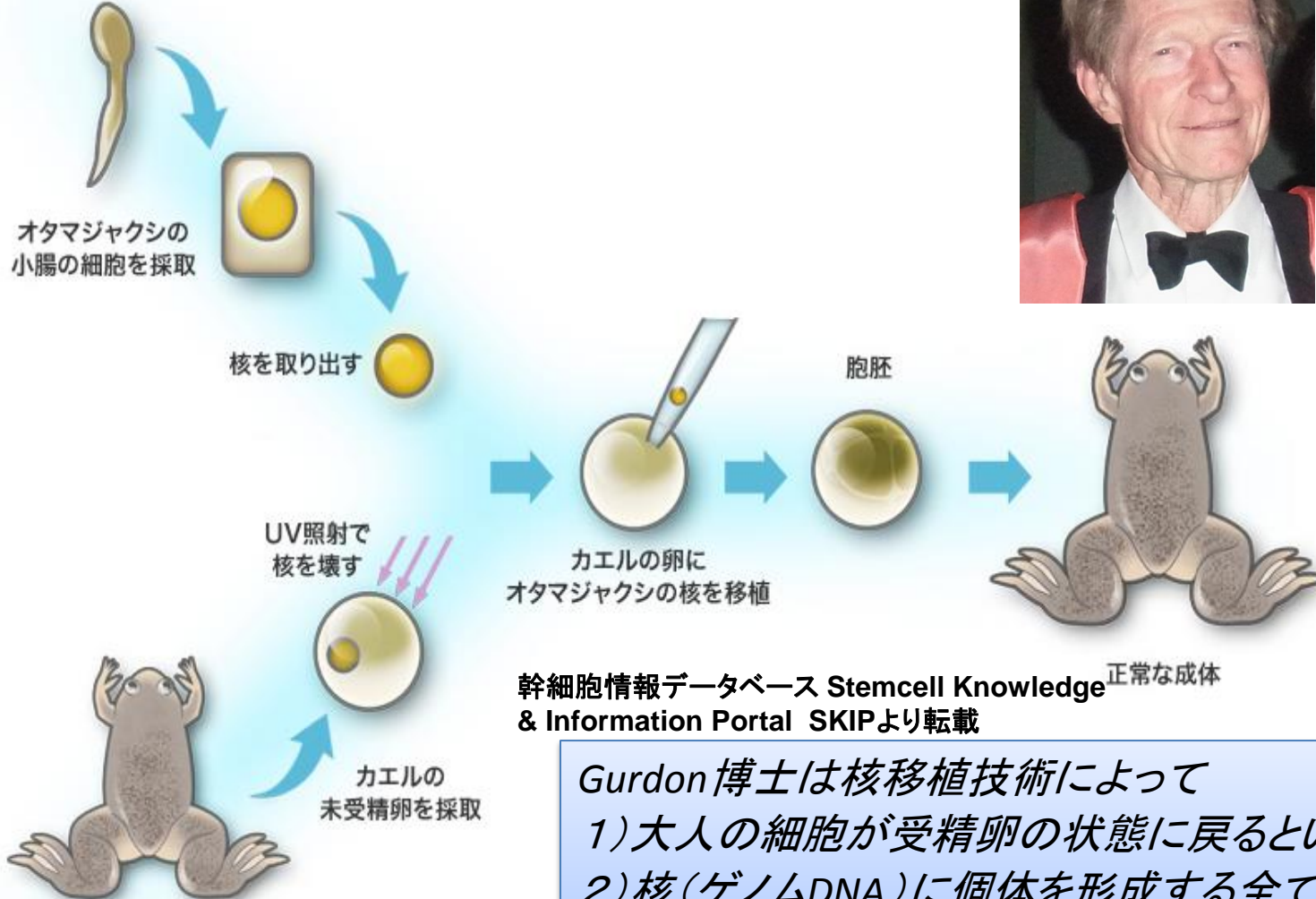
Image from wikipedia commons
https://ja.wikipedia.org/wiki/%E7%B4%B0%E8%83%9E#/media/File:Biological_cell.svg
 CC BY-SA 3.0

体細胞核移植を利用した
細胞（ゲノム）の若返り技術

Gurdon 博士の核移植実験

2012 年ノーベル医学生理学賞

ここから始まる細胞の若返り研究！



John Gurdon

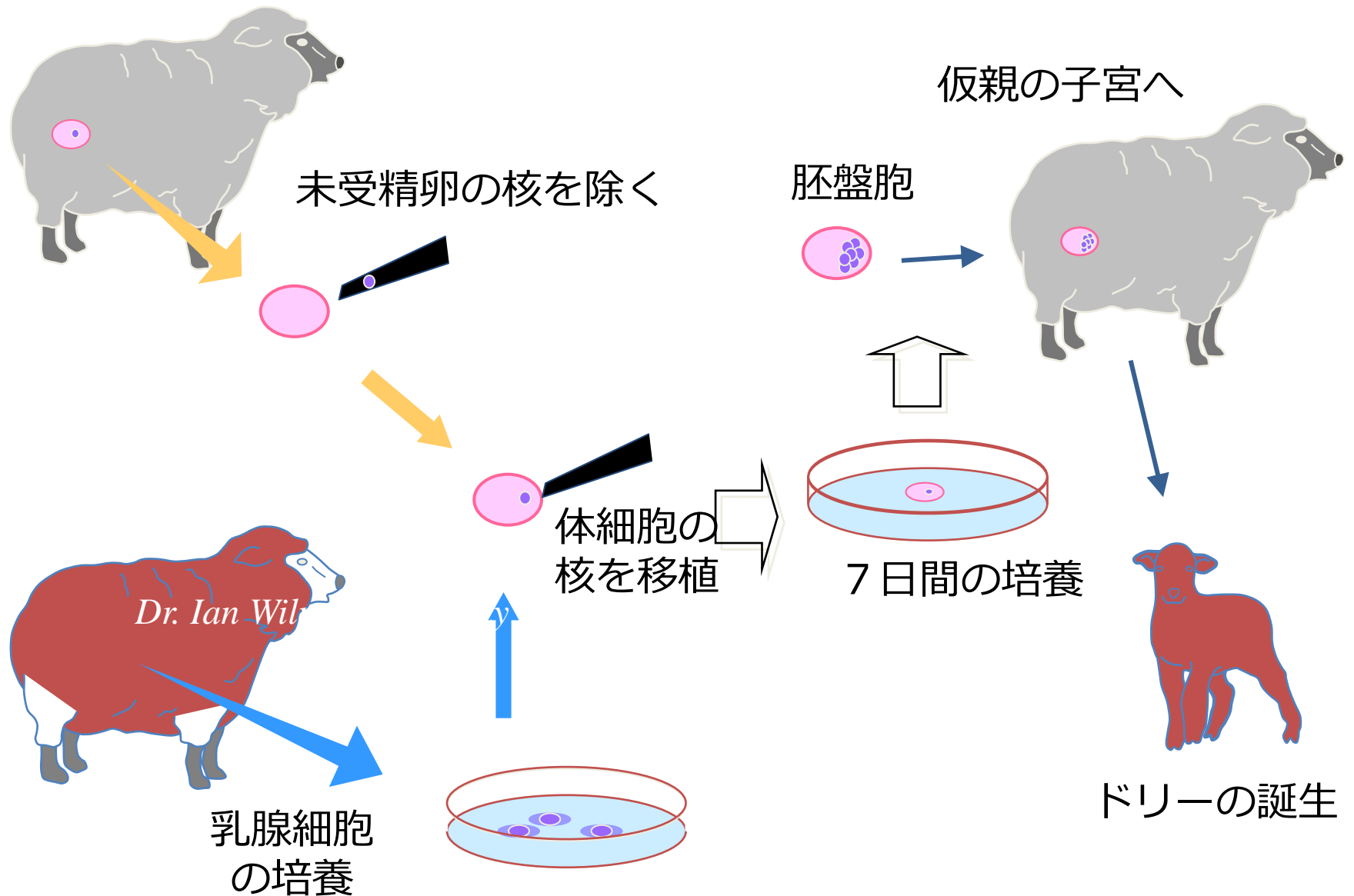
Image from
wikimedia commons
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:John_Gurdon_Cambri_dge_2012.JPG
CC BY-SA 3.0

幹細胞情報データベース Stemcell Knowledge
& Information Portal SKIPより転載

Gurdon 博士は核移植技術によって

- 1) 大人の細胞が受精卵の状態に戻るということを証明
- 2) 核(ゲノムDNA)に個体を形成する全ての情報が含まれていることを証明

カエルだけでなく哺乳動物でもクローンを作れる！

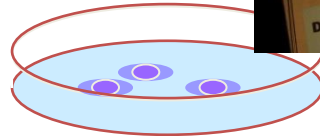


力エールだけでなく哺乳動物でもクローンを作れる！

著作権等の都合により、ここに挿入されていた画像を削除しました

Dr. Ian Wilmut and Dolly

乳腺細胞
の培養

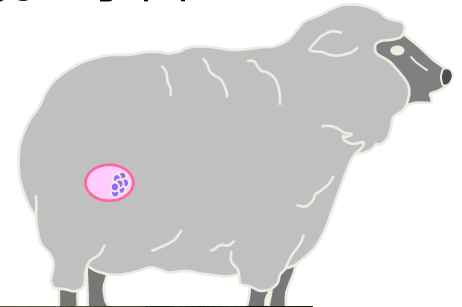


を除く

胚盤胞

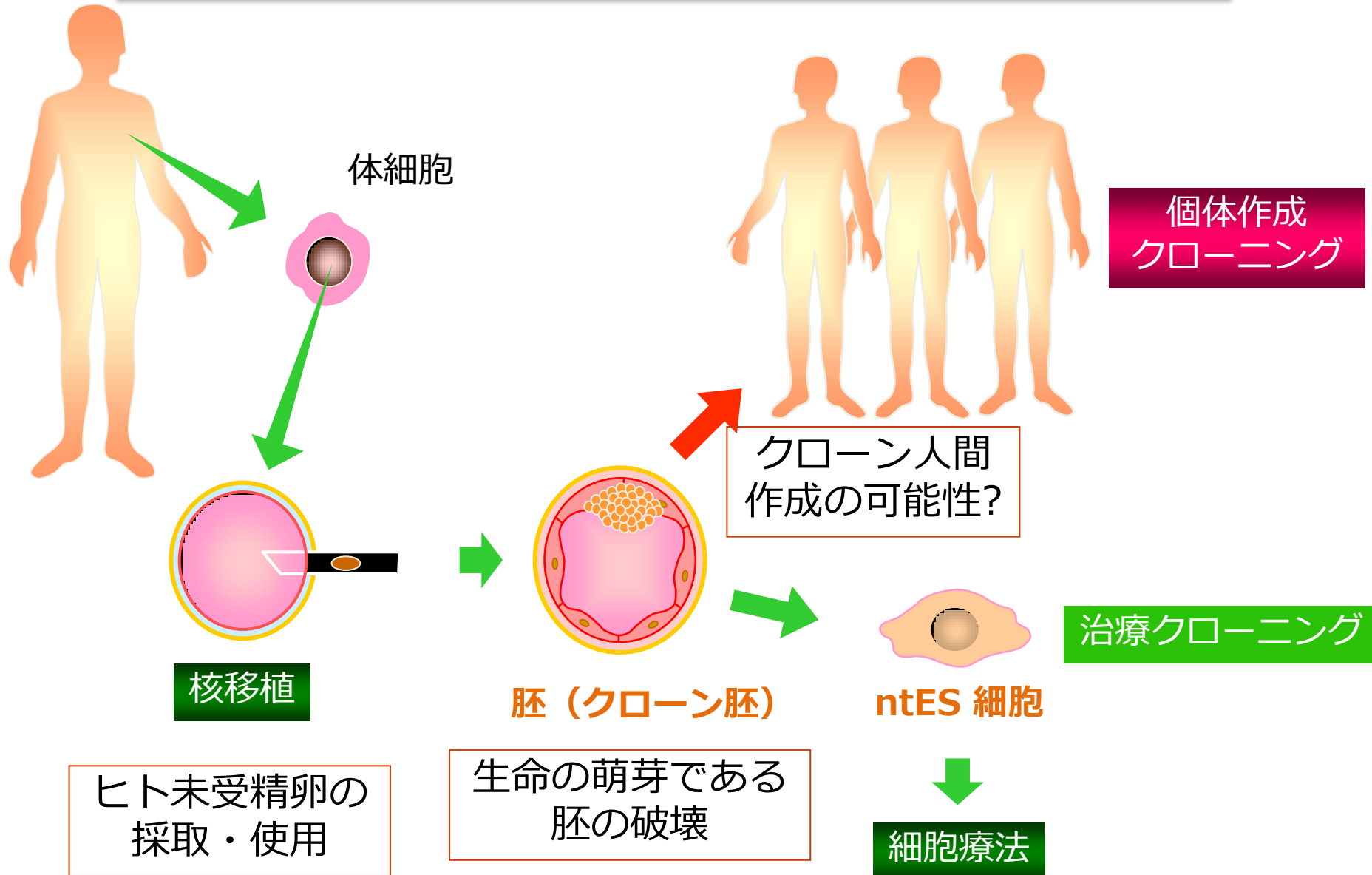


仮親の子宮へ

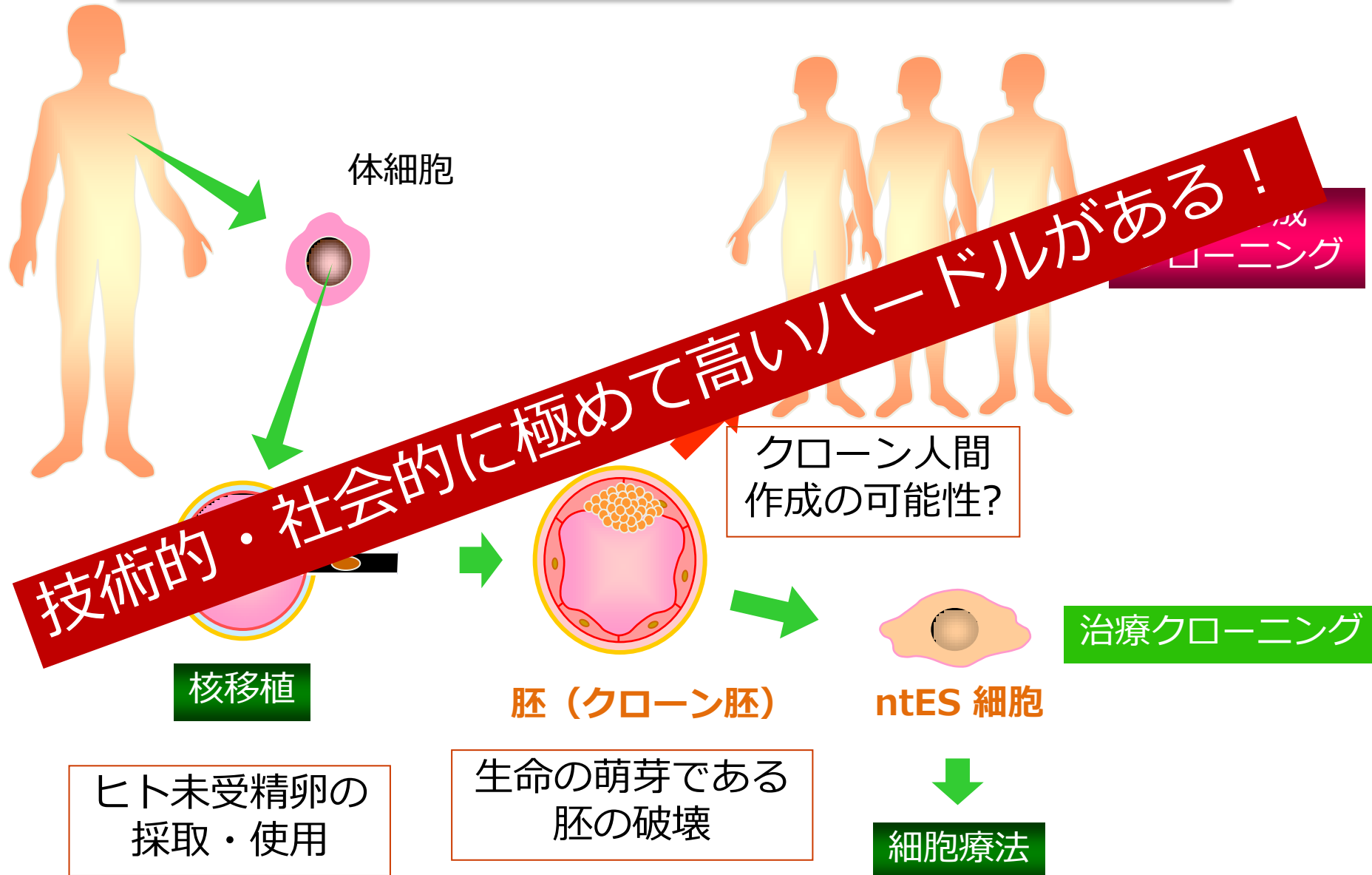


の誕生

核移植ES細胞作成の原理と問題点

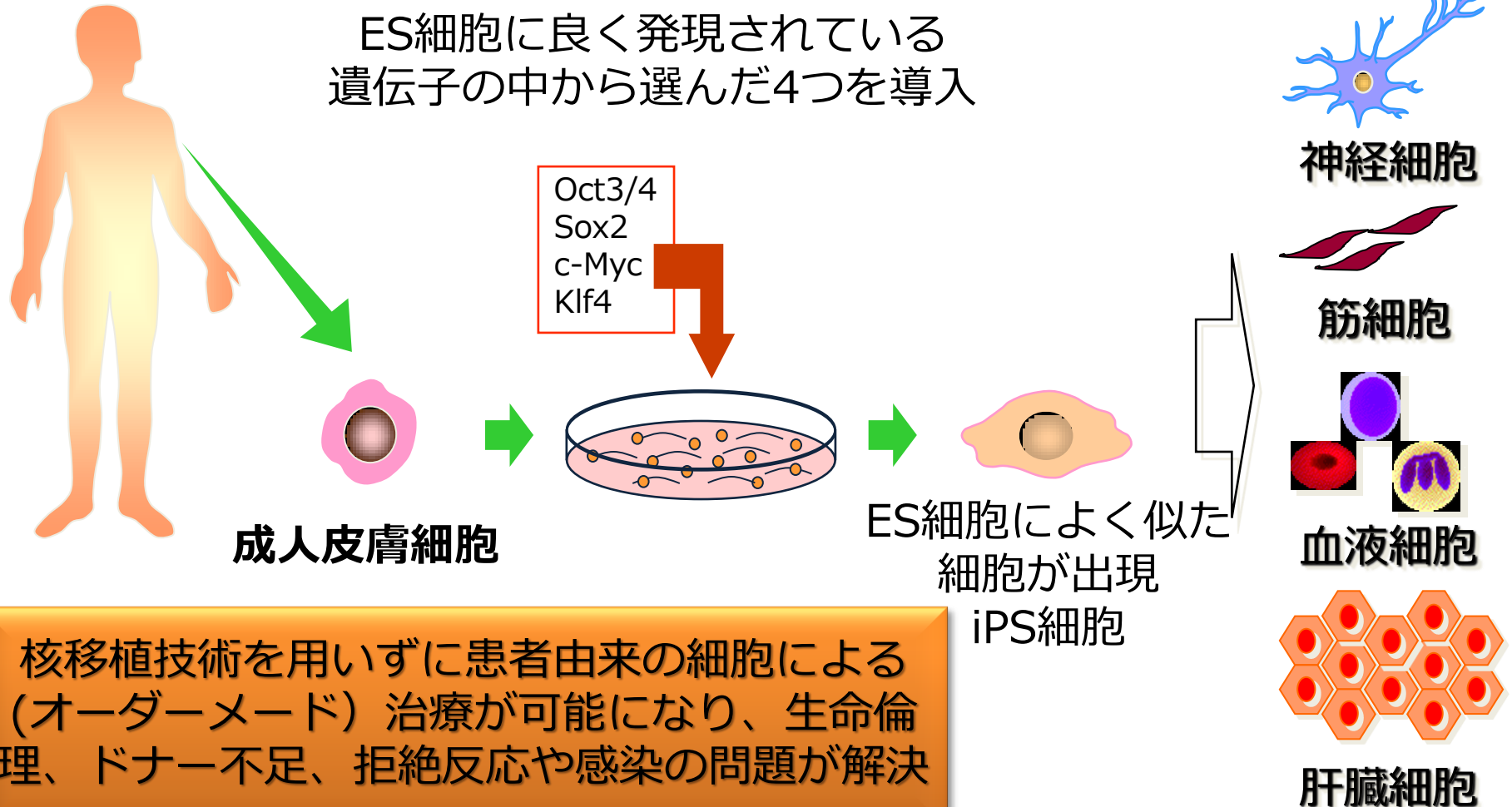


核移植ES細胞作成の原理と問題点



人工多能性幹細胞 (iPS細胞) とは？

ES細胞に良く発現されている
遺伝子の中から選んだ4つを導入



核移植技術を用いずに患者由来の細胞による
(オーダーメイド) 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

Cell

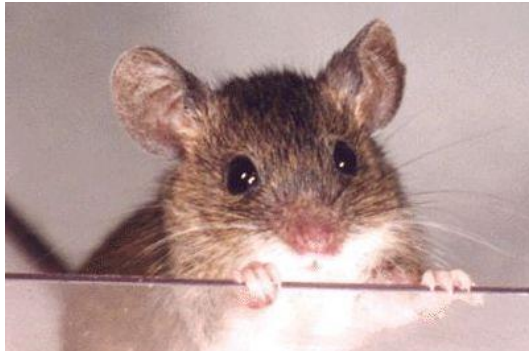
Kazutoshi Takahashi¹ and Shinya Yamanaka^{1,2,*}

¹Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

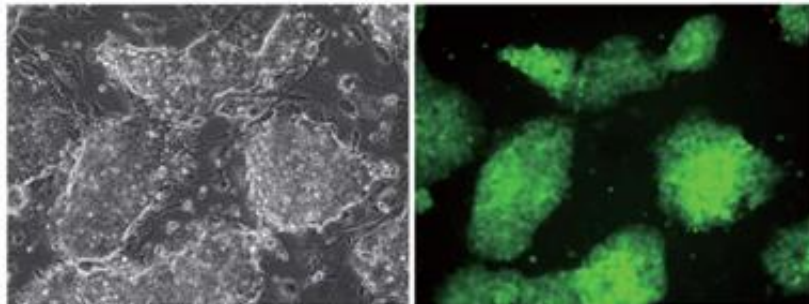
²CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan

*Contact: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp

DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024



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

Cell

Kazutoshi Takahashi,¹ Koji Tanabe,¹ Mari Ohnuki,¹ Megumi Narita,^{1,2} Tomoko Ichisaka,^{1,2} Kiichiro Tomoda,³
and Shinya Yamanaka^{1,2,3,4,*}

¹Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

²CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan

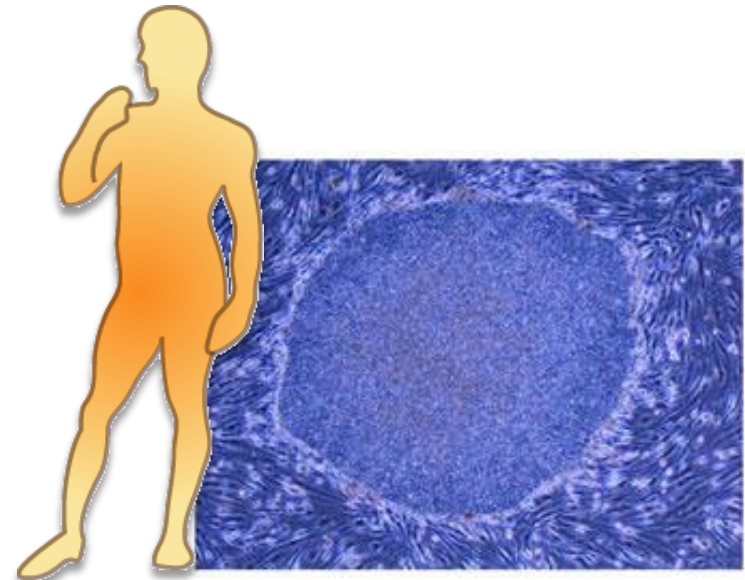
³Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco, CA 94158, USA

⁴Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

*Correspondence: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp

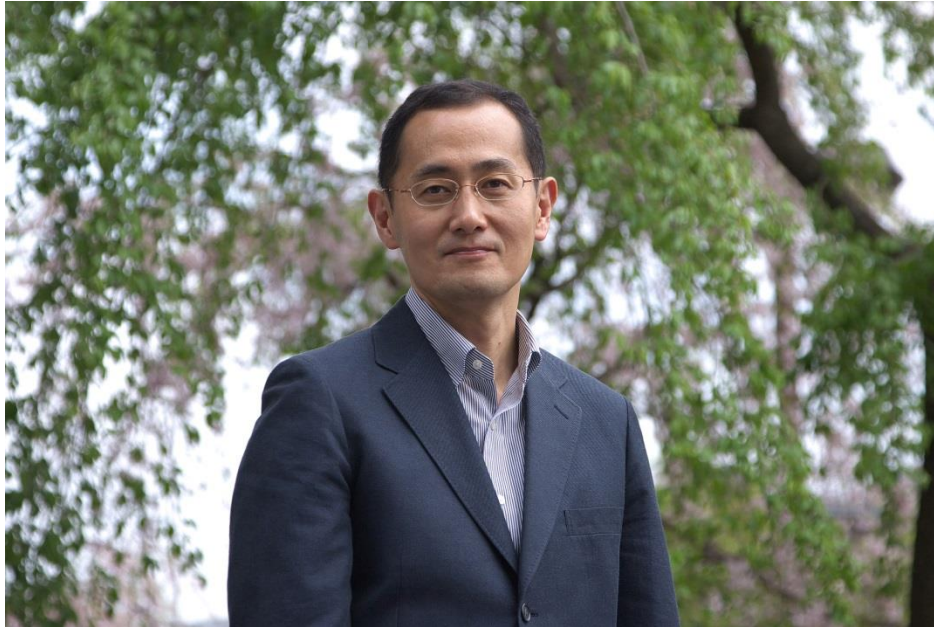
DOI 10.1016/j.cell.2007.11.019

同じ4つ
の遺伝子



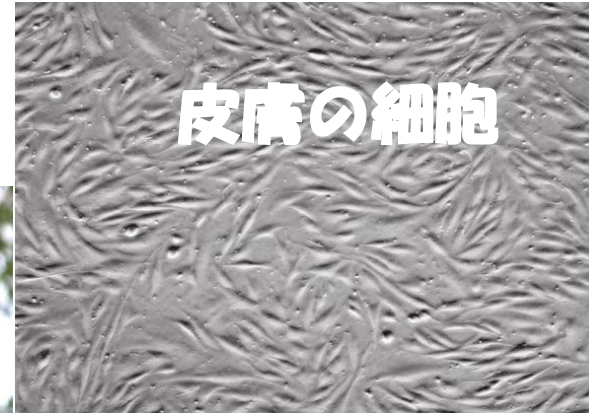
京都大学iPS細胞研究所

体細胞を多能性幹細胞に変換

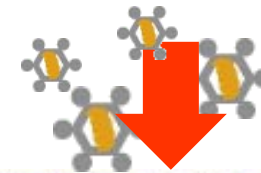


京都大学iPS細胞研究所

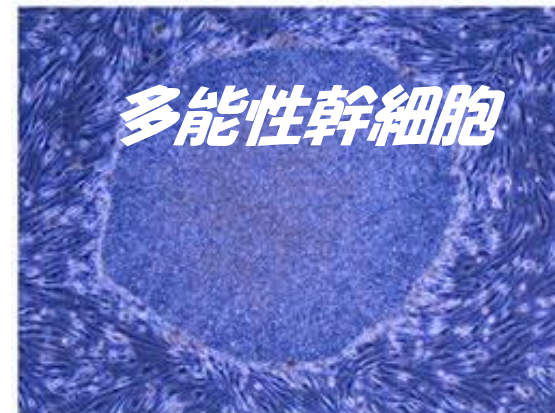
Shinya Yamanaka
(2012年 ノーベル医学生理学賞)



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

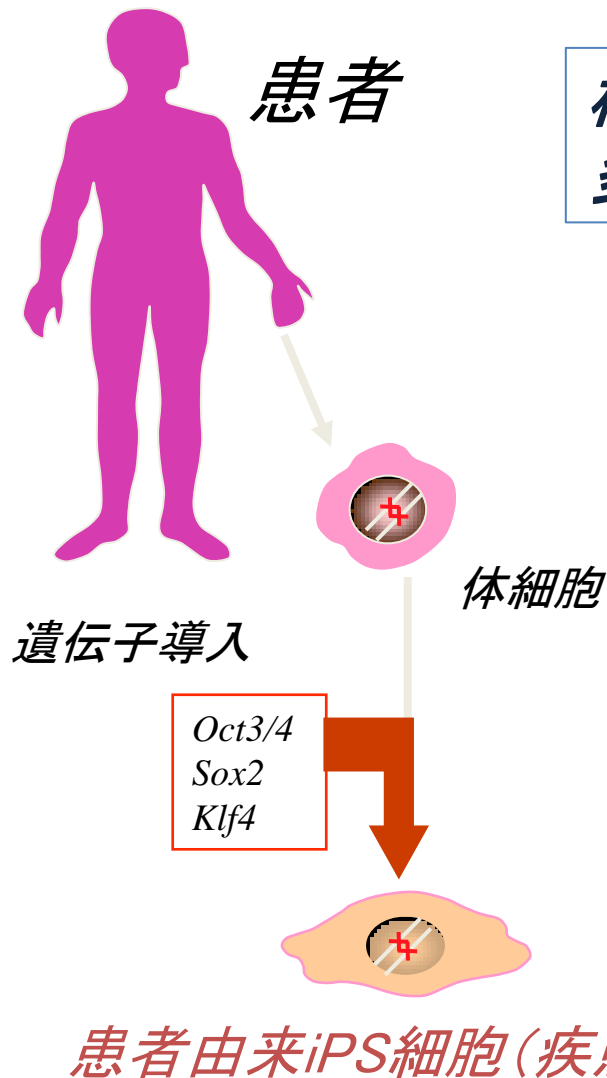


+ 4つの遺伝子



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



核移植をしなくても患者由来の
多能性幹細胞を簡単に作成できる

病態の解明

治療法の開発

薬剤スクリーニング

遺伝子・細胞治療

毒性試験

iPS細胞から臓器を作る

次世代の再生医療を目指して

臓器不全症の治療と移植医療

臓器不全症と移植医療に関わる問題点

1. 絶対的なドナー不足
2. 免疫拒絶
3. 倫理的な問題（脳死患者からの臓器提供など）
4. 高額な医療費

国民総医療費 3 2 兆円のうち人工透析のみで 1 兆 4 千億円を使用。3 3 万人の患者は毎年 1 万人ずつ増加している。待ち時間は平均 1 4 年。運良く移植を受けても免疫抑制剤の使用が生涯必要。

人工心臓の利用増加によりドナー心臓待ちの患者も増加。人工臓器が無い臓器の不全症患者ではドナー臓器を得ることができずに亡くなる方は多数。

移植臓器の不足がもたらす問題

臓器を販売するブラックマーケットも存在

2010年だけでも1万個以上の臓器が売買されたと推定されている（臓器移植の10%に相当）

著作権等の都合により、ここに挿入されていた画像を削除しました

“Sale on all body parts.” の看板

著作権等の都合により、ここに挿入されていた画像を削除しました

インドの臓器売買の画像

患者自身の幹細胞から臓器を作る

臓器不全症の治療と移植医療に関わる問題点

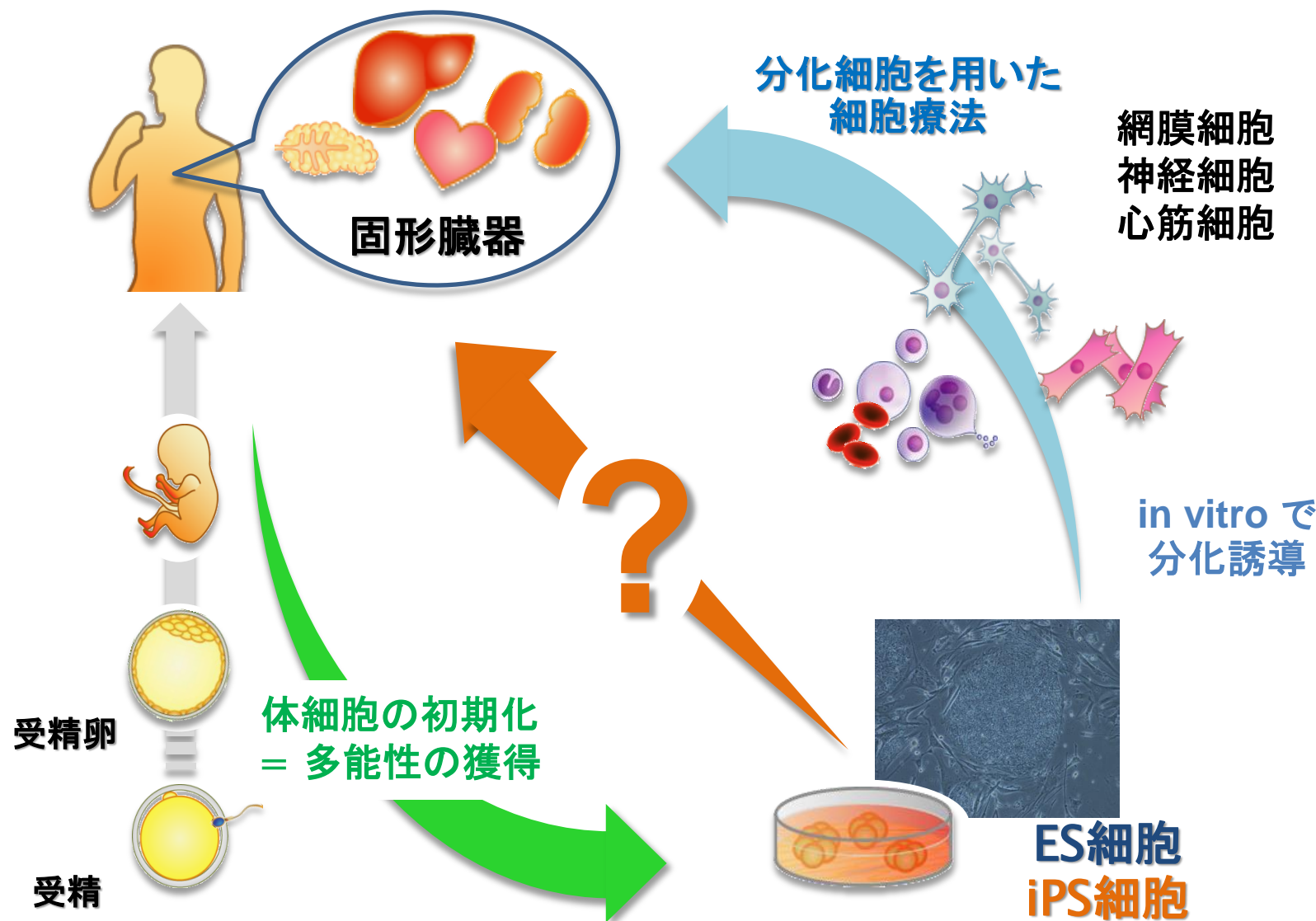
1. 絶対的なドナー不足
2. 免疫拒絶
3. 倫理的な問題
4. 高額な医療費



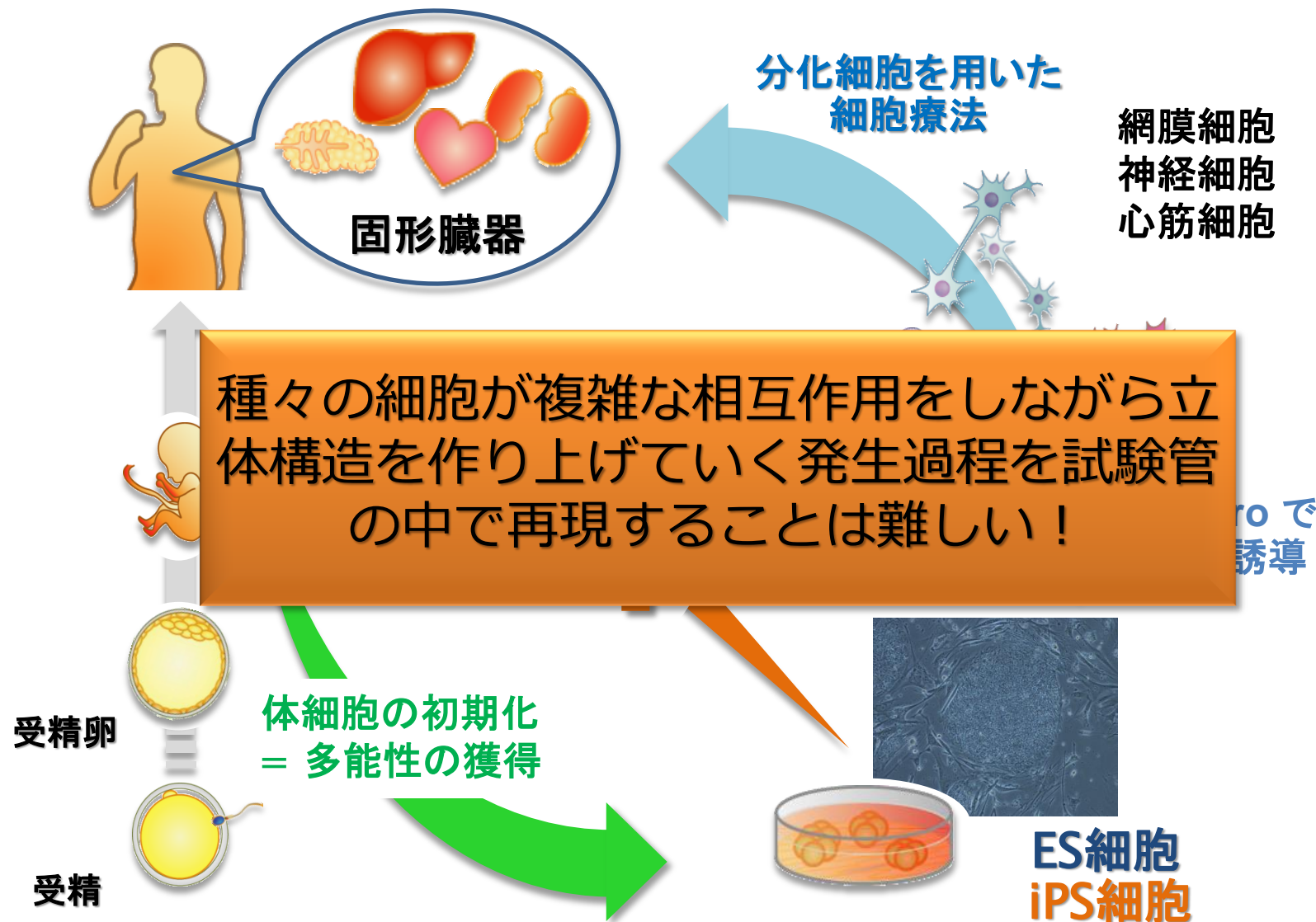
**自分自身の幹細胞から臓器を作ることができれば
全ての問題を解決することができる！**

ドナー臓器の圧倒的不足を解消することは再生医療の最重要課題の一つ

現在の再生医療が目指しているのは細胞治療



現在の再生医療が目指しているのは細胞治療



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



合成獣

もともとは神話に出てくる
想像上の産物

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた
画像を削除しました

ドラゴンクエスト
メタリックモンスターズギャラリー
メタルキメラ／スターキメラの画像



Image from wikimedia
commons
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chimera_d%27arezzo,_fi,_04.JPG#/media/File:Chimera_d%27arezzo,_fi,_04.JPG
CC BY-SA 3.0

キメラ動物とは

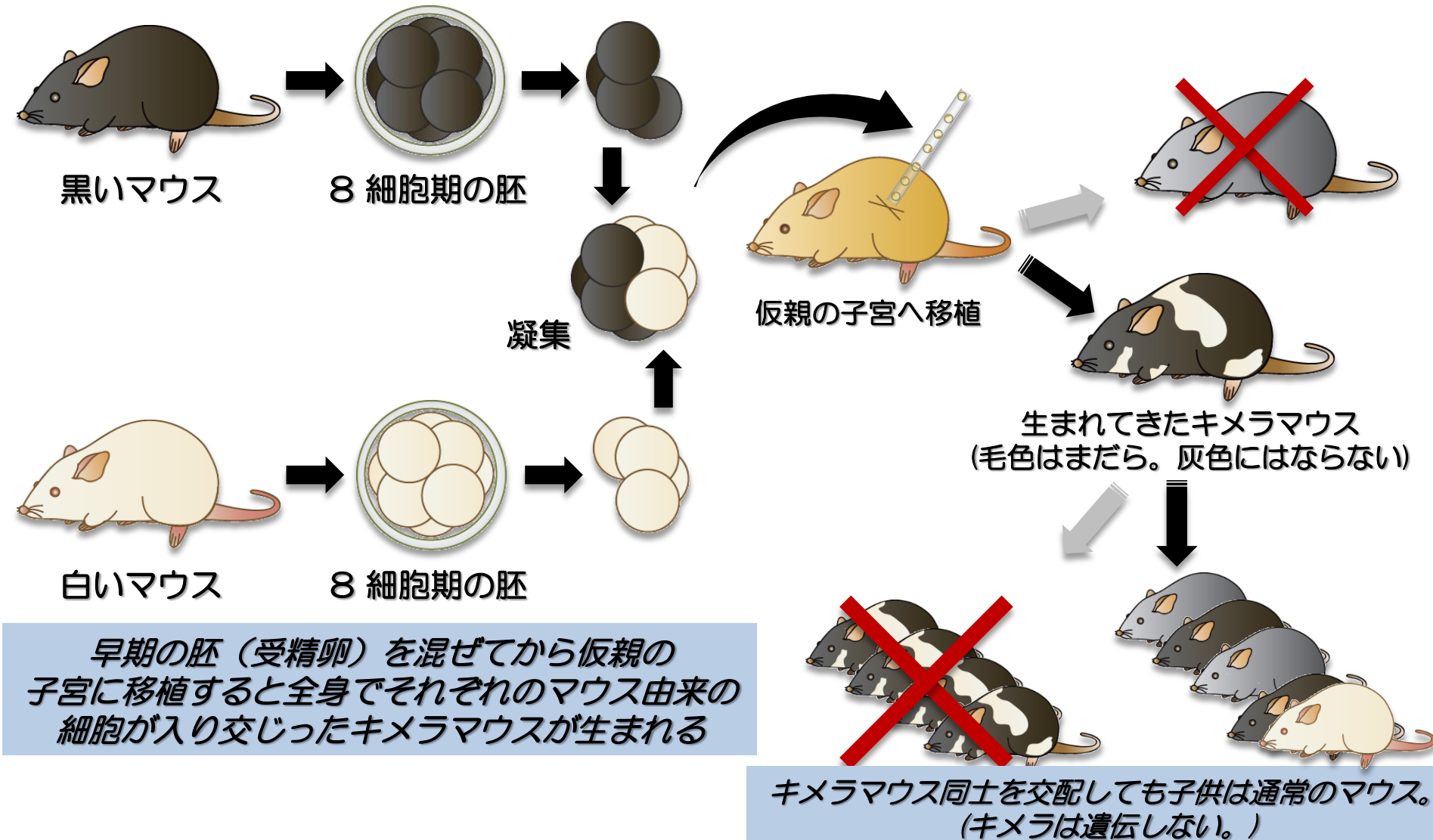
交配では精子と卵子が受精することによりそれぞれが持つ遺伝子が交ざりあう。

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。また研究分野でもマウス、ラット等の動物に各種ヒト細胞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。二卵性双生児のペアの8%は血液キメラ。

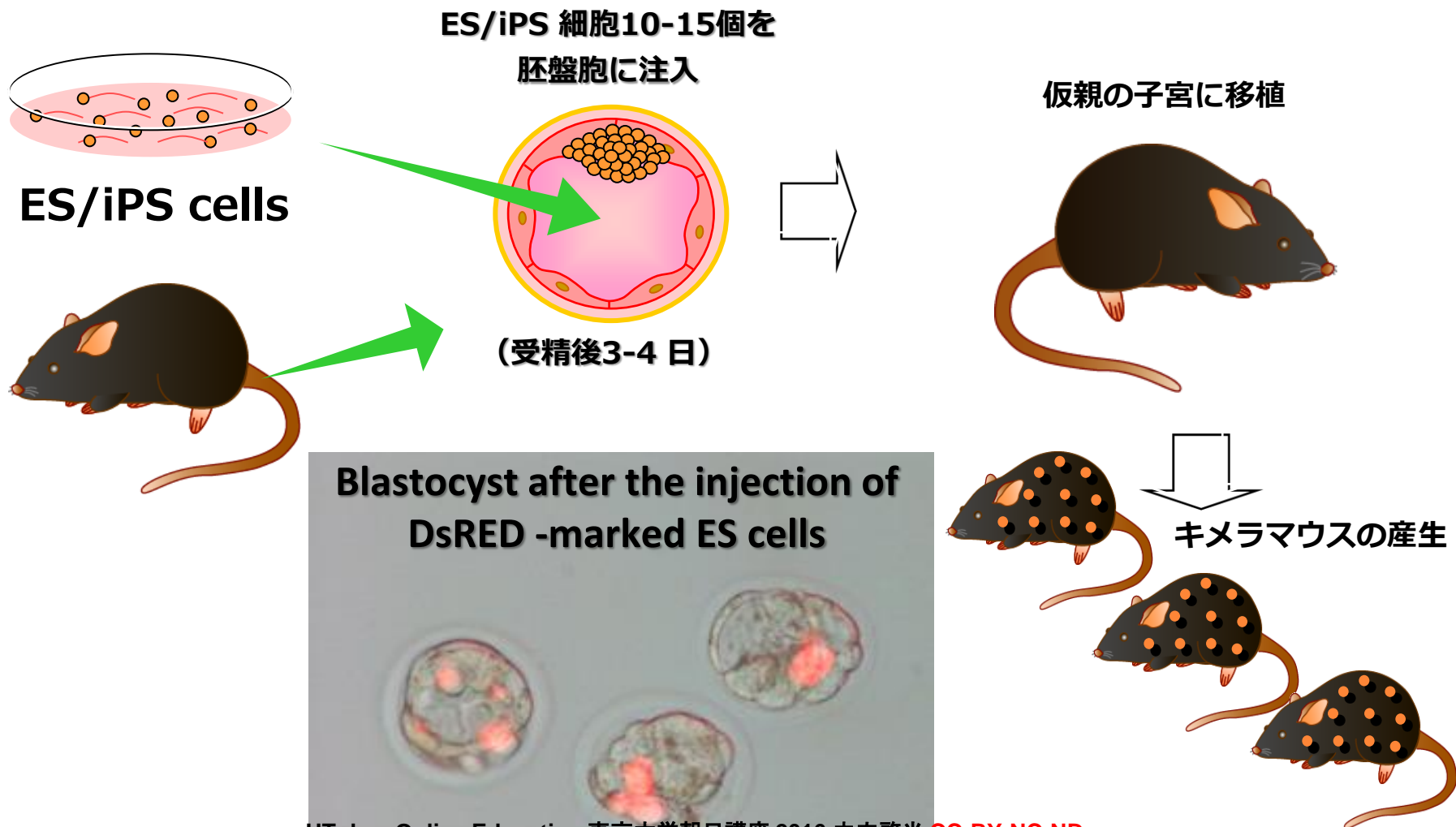
全身性キメラ： 発生の極めて早期にゲノムが異なる胚細胞が混じると体全体に両方の細胞が入り混じった個体が生まれてくる。

キメラマウスの作製



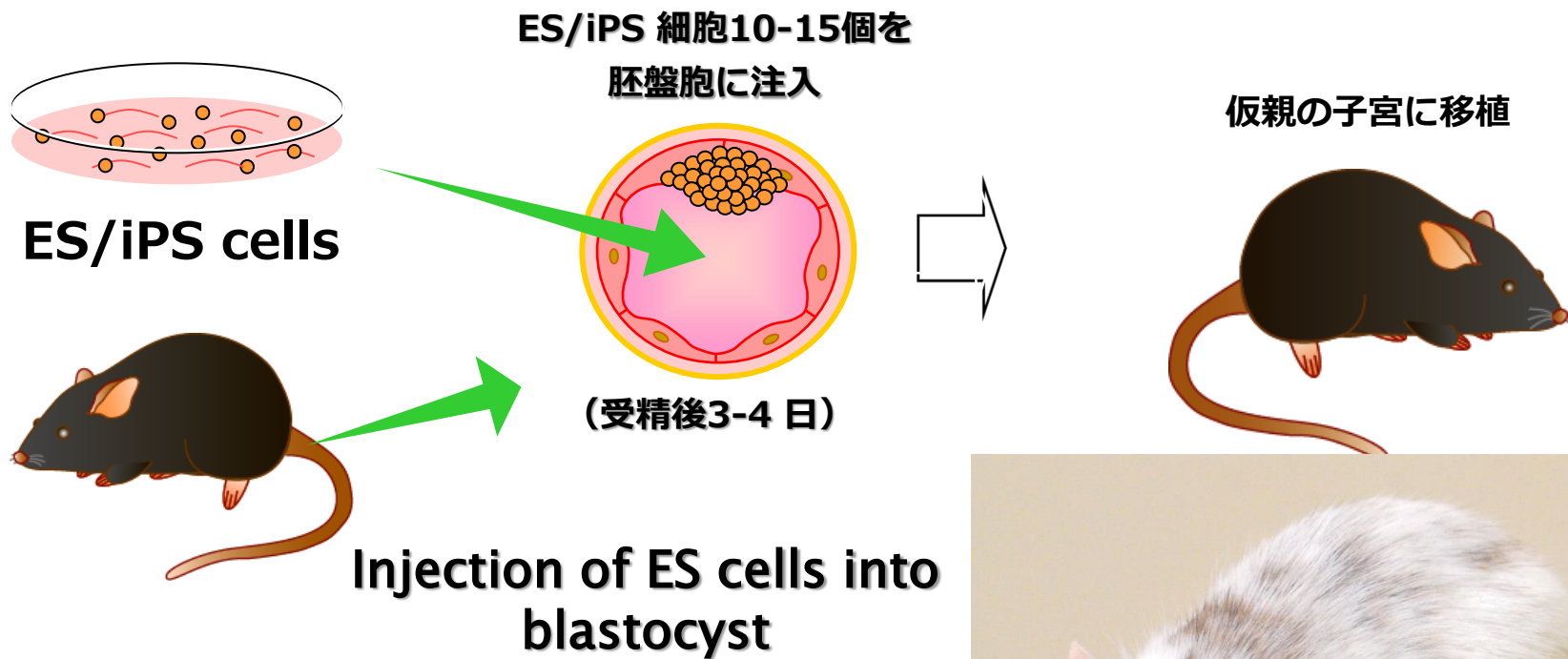
ES細胞やiPS細胞を利用してのキメラ作製

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



ES細胞やiPS細胞を利用したのキメラ作製

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



臓器ニッチの概念と胚盤胞補完によるiPS細胞からの臓器作出

臓器ニッチを用意

腎臓を欠損する遺伝子
改変マウス

Sall1 KO マウス

胎仔

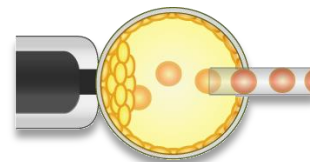
胚

受精



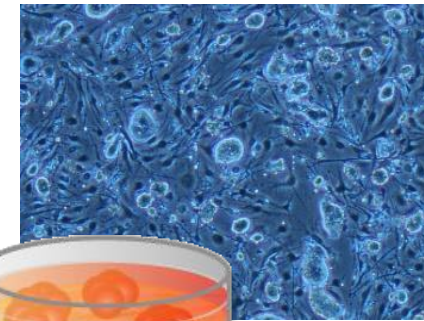
Sall1 KOマウス個体内でドナー
iPS細胞由来臓器が
再生されるのではないか？

発生過程での補完



正常多能性幹細胞を
胚盤胞へ注入

遺伝子改変により腎臓が発生できない
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)

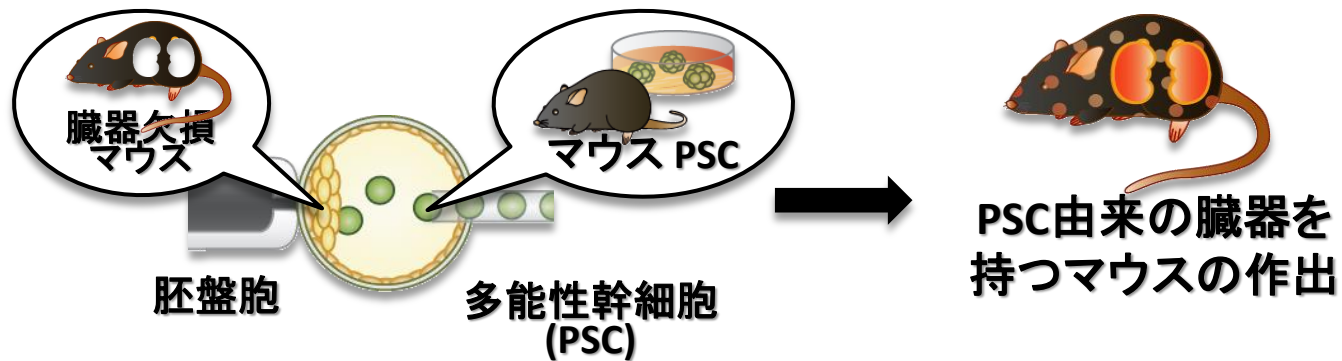


多能性幹細胞
(ESCs, iPSCs)

実現に向けてのステップ -1

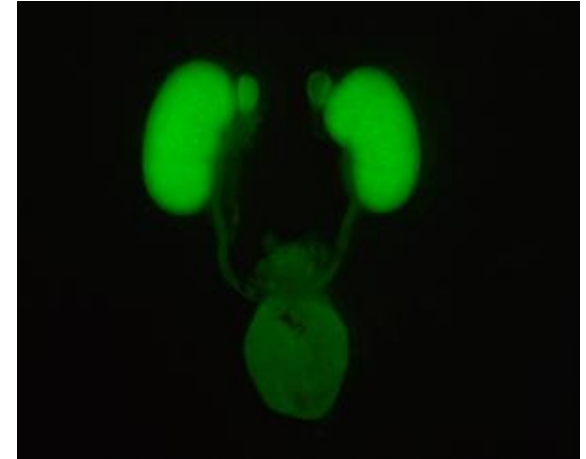
マウスモデルでのProof-of-Conceptの証明

“臓器ニッチ”と“発生補完”という概念



Sall1^{-/-} mouse

GFP-marked iPS (GT3.2) → Sall1^{-/-}



胚盤胞補完法によって作製された臓器

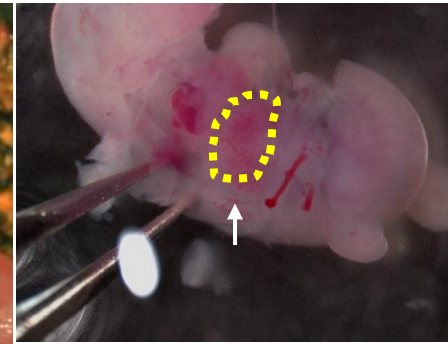
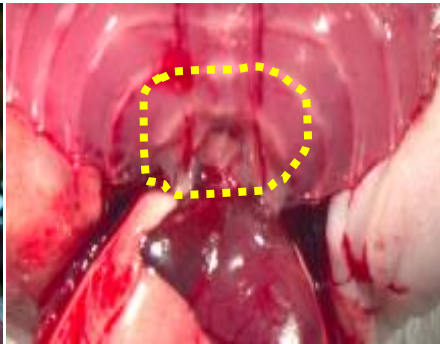
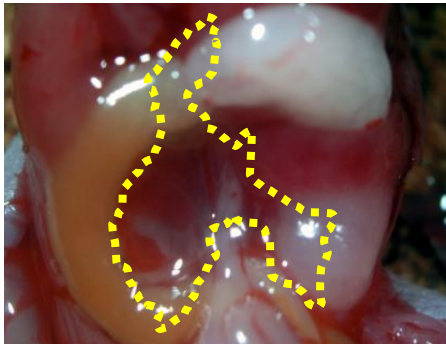
膵臓
Pdx1 KO

胸腺
Nude mouse

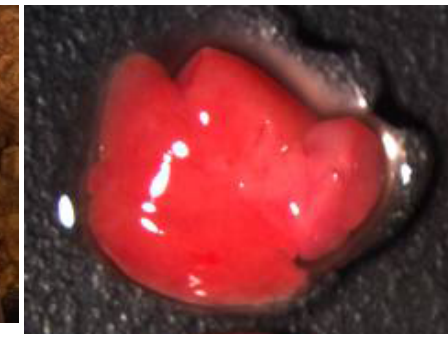
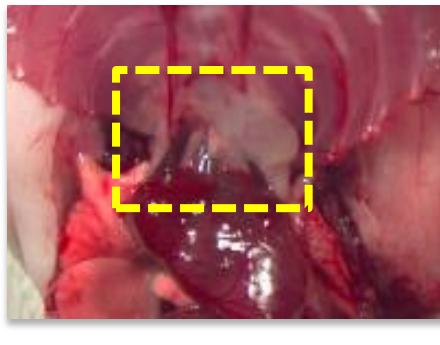
腎臓
Sall1 KO

肝臓
Sek1 KO

KO マウス



補完されたマウス



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



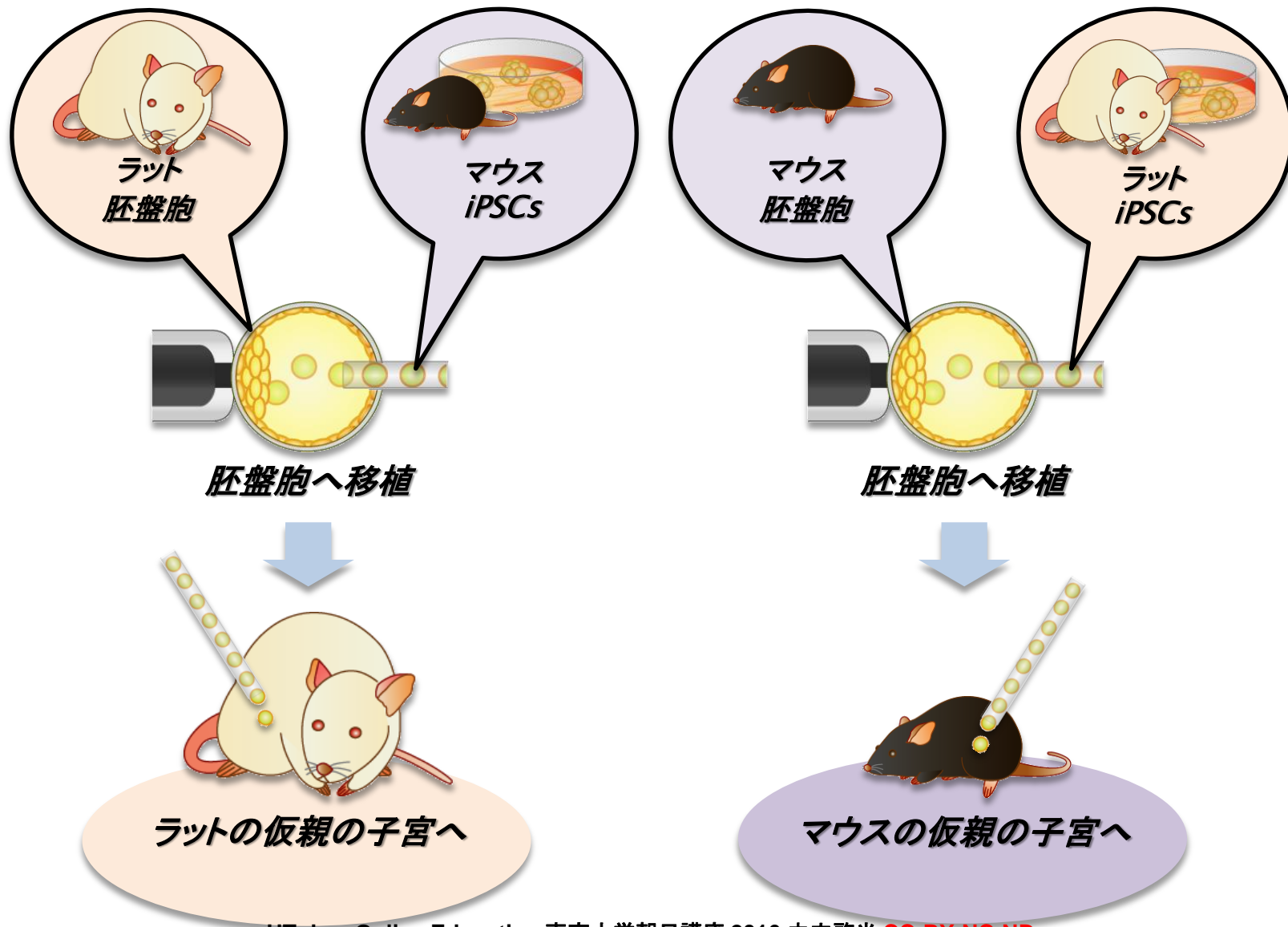
Photo by Janet Stephens, from the Web site of the National Cancer Institute <http://www.cancer.gov>

ラット

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

Rat iPS cells: Hamanaka, et al. PlosONE 2011

STEP 2: マウス-ラット異種間キメラ作製

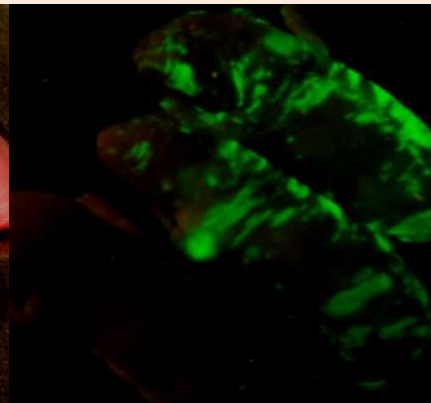


マウス-ラット異種間キメラは出生後成体まで発育可能

新生児期

成体

ラット胚盤胞
+ マウス iPS
細胞



マウス胚盤胞
+ ラット iPS
細胞



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

約90%がマウスの細胞、10%はラットの細胞

約80%がラットの細胞、20%はマウスの細胞

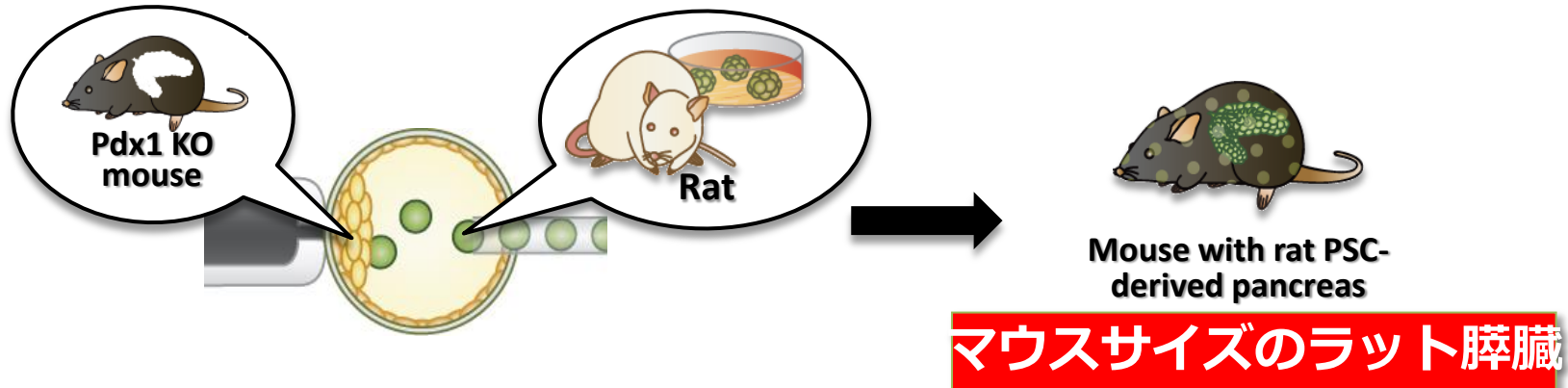


The size of chimeras seemed to conform with that in the species from which the blastocyst originated.

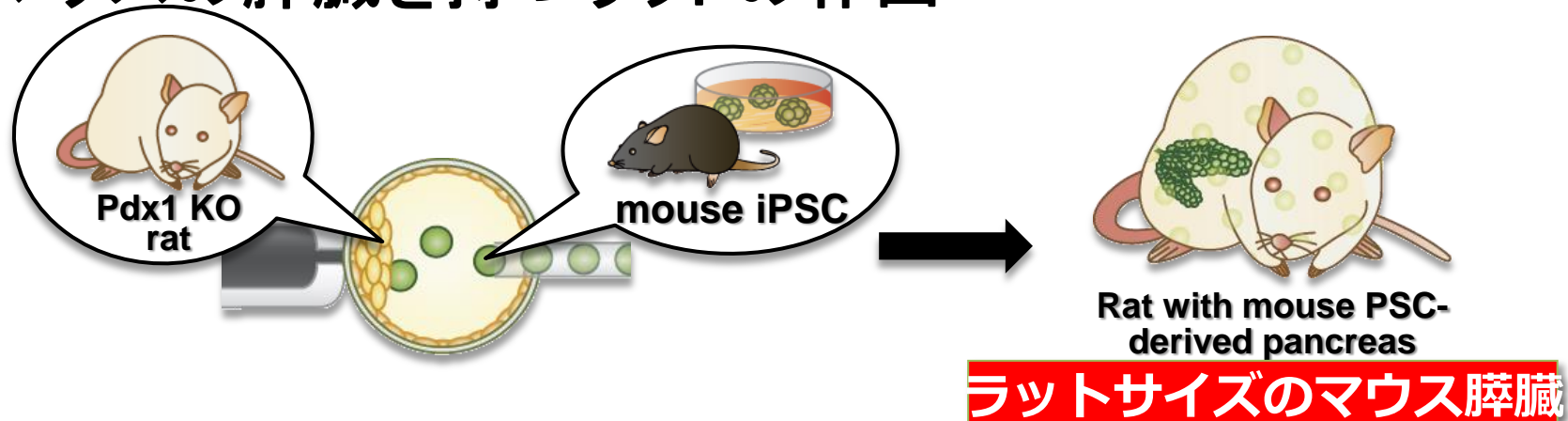
実現に向けてのステップ -3

異種間での胚盤胞補完

・ ラットの膵臓を持つマウスの作出

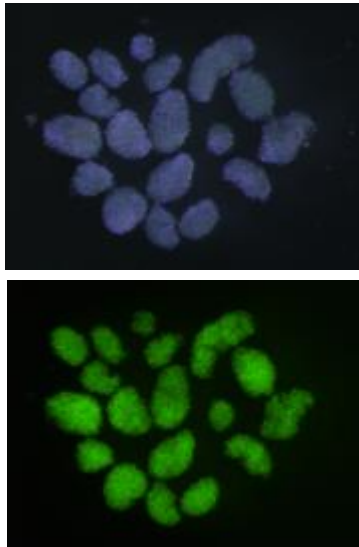


・ マウスの膵臓を持つラットの作出



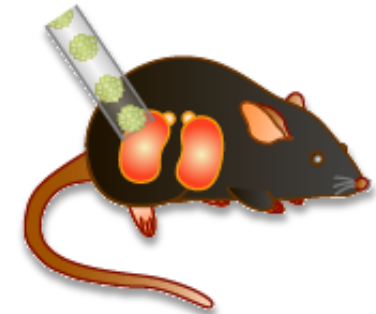
異種動物体内で作られた膵島は免疫抑制なしで長期生着

Yamaguchi, Kato, Sato, in preparation

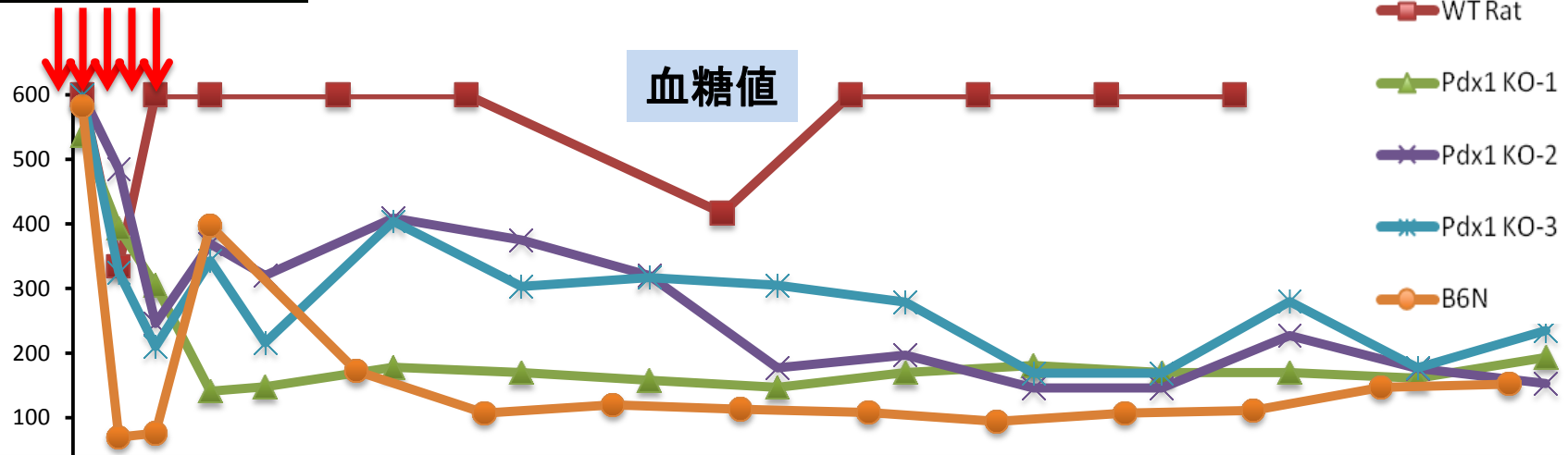


ラット個体内でマウスiPS細胞より作られたマウスの膵島を糖尿病マウスに移植して治療する
(100 islets / mouse)

免疫抑制は移植後最初の5日間のみ



STZ-induced diabetic mouse



本プロジェクトのPOCを実験的に証明した成果

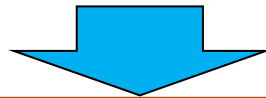
ネズミやラットで示された結果が大動物でも再現できるのか？

1. 大動物において臓器欠損動物を作成し、量産することは可能か？

→ 臓器を欠損した動物は生存できないはず。そのような動物を量産することが可能なのか？

2. 大動物において臓器欠損動物を作成しても、マウスやラットで確認された臓器作出の原理があてはまるのだろうか？

→ ネズミのような小さな動物で示された結果はブタやヒトのような大きな生物にはあてはまらないのでは？



大動物における臓器再生のチャレンジ

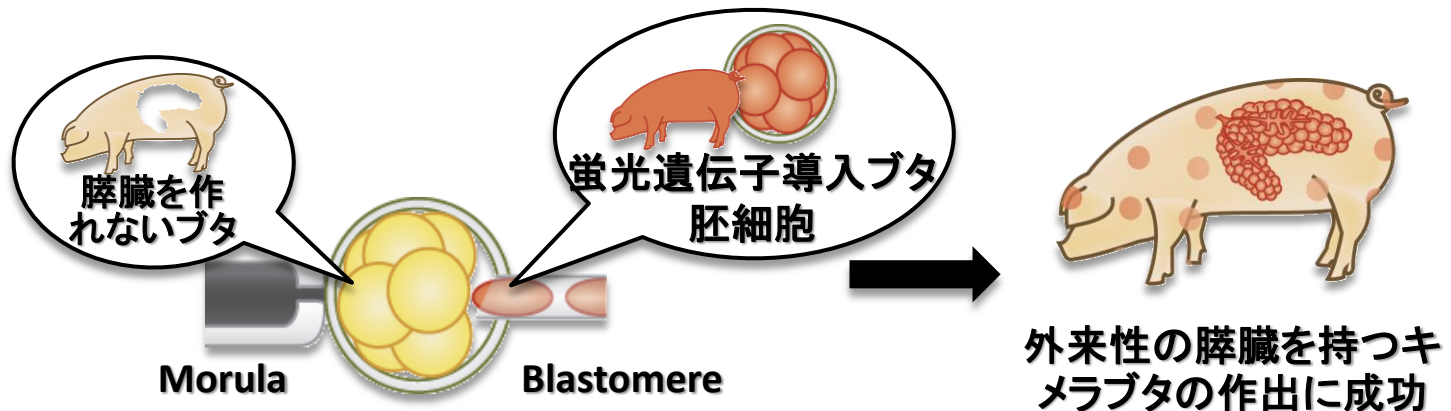
実現に向けてのステップ -4

大型動物における胚盤胞補完法による臓器作出

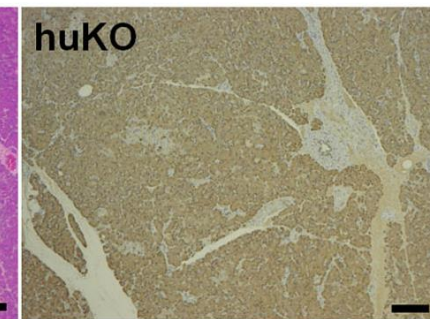
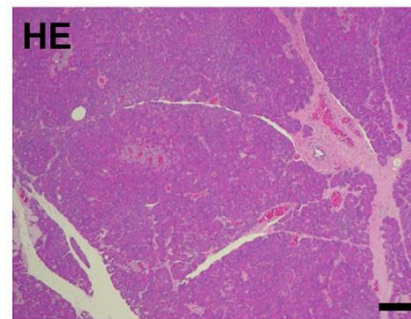
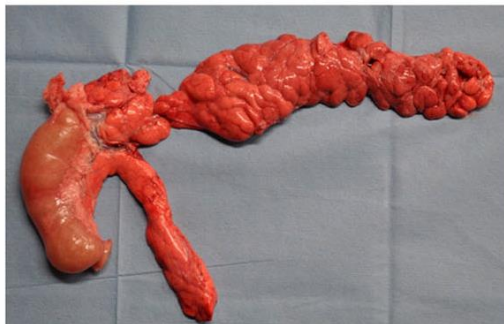
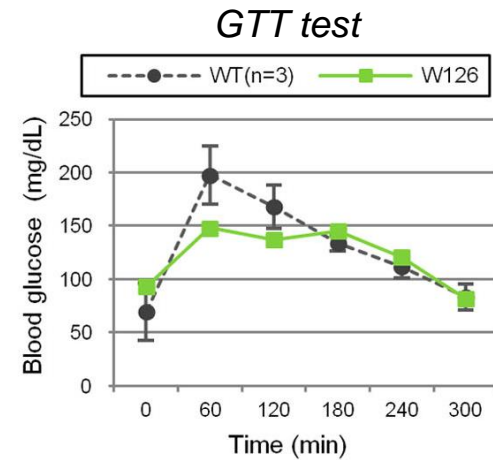
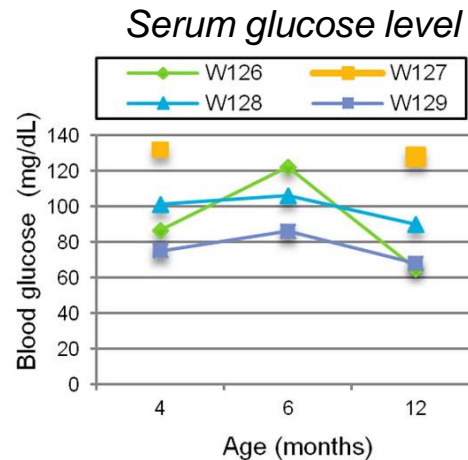
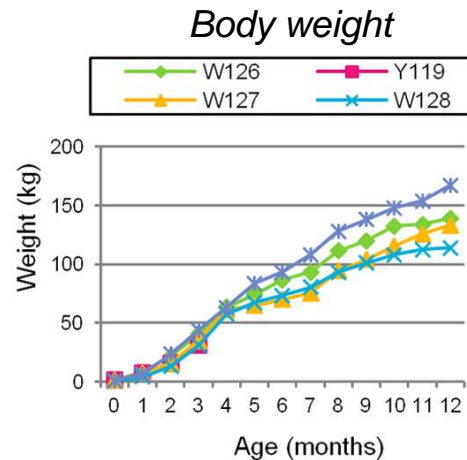
- 膵臓を発生することができない遺伝子改変ブタを作製



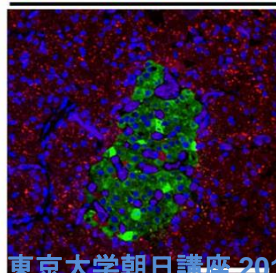
- ブタにおいても胚盤胞補完の原理が作動することを確認



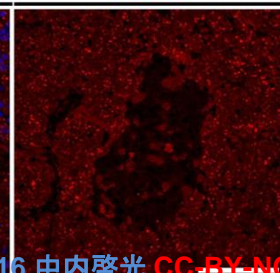
ブタにおいても胚盤胞補完の原理が成立した



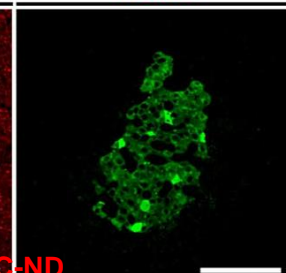
DAPI / huKO / Insulin



huKO



Insulin



12 mo-old chimera

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

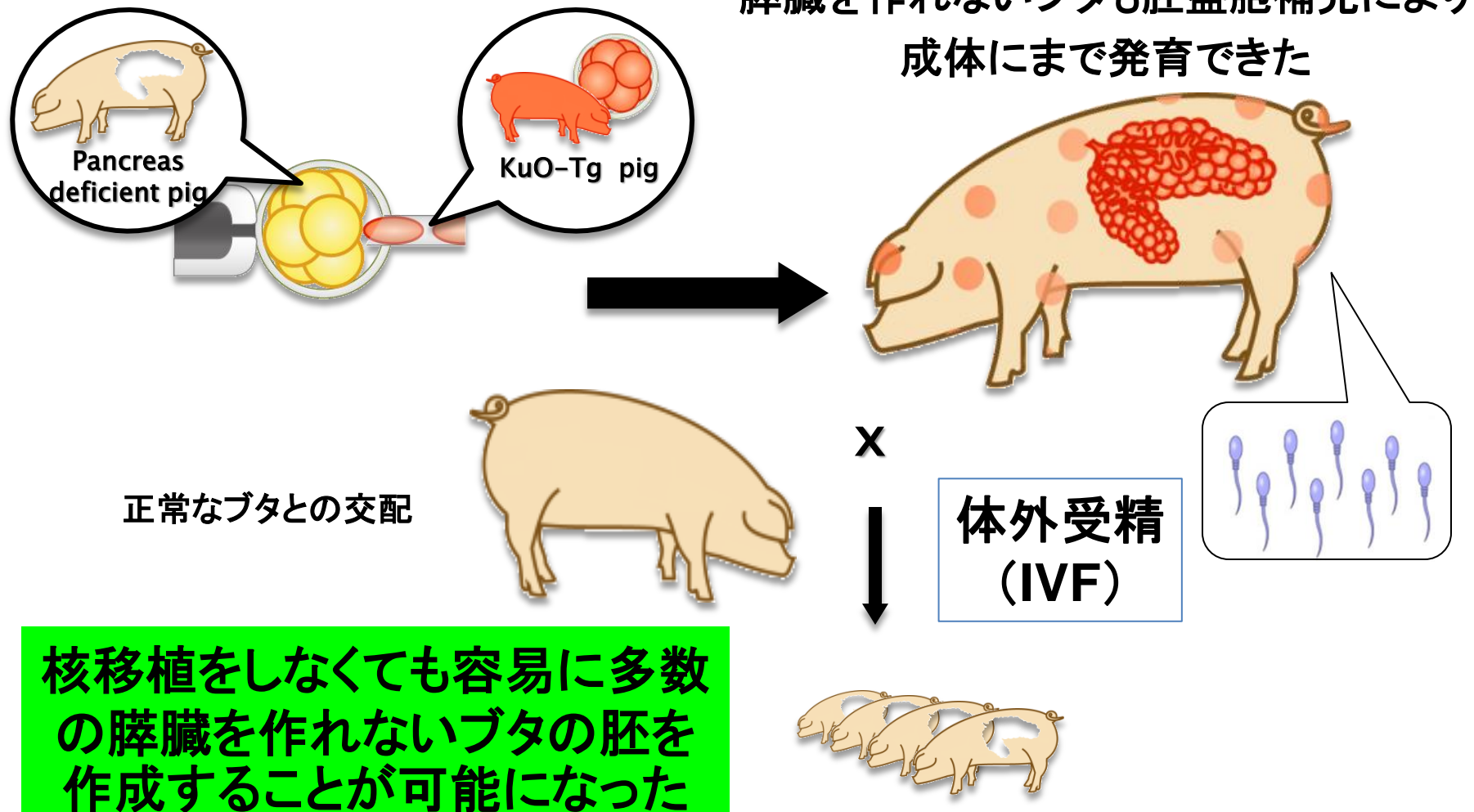
Image from: Matsunari, Nakauchi **et.al.** (2013) Blastocyst
complementation generates exogenic pancreas in vivo in
apancreatic cloned pigs, Proceedings of the National Academy of
Sciences of the **United States of America**, vol.110(no.12):
4557–4562 p.4561 Fig.4B. Copyright 2013 by the authors.



***Pdx1-Hes1* ⇔ 有色ブタ キメラ (7.5ヶ月齢)**

UTokyo Online Education 東京大学朝日講座 2016 中内啓光 **CC-BY-NC-ND**

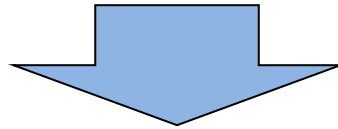
膵臓を作ることが出来ないブタの胚を容易に 作ることができるようになった！



膵臓欠損ブタを利用して胚細胞由来の膵臓の作出に成功。キメラブタは成体に！

すい臓欠損ブタは通常生後直ぐに死亡するが、胚盤胞補完法で作出された外来性のすい臓によって成体まで生育し、交配も可能である。

このブタから得られた精子を用いることによりすい臓が無いブタ胎仔(胚)を大量に得ることが容易となった。

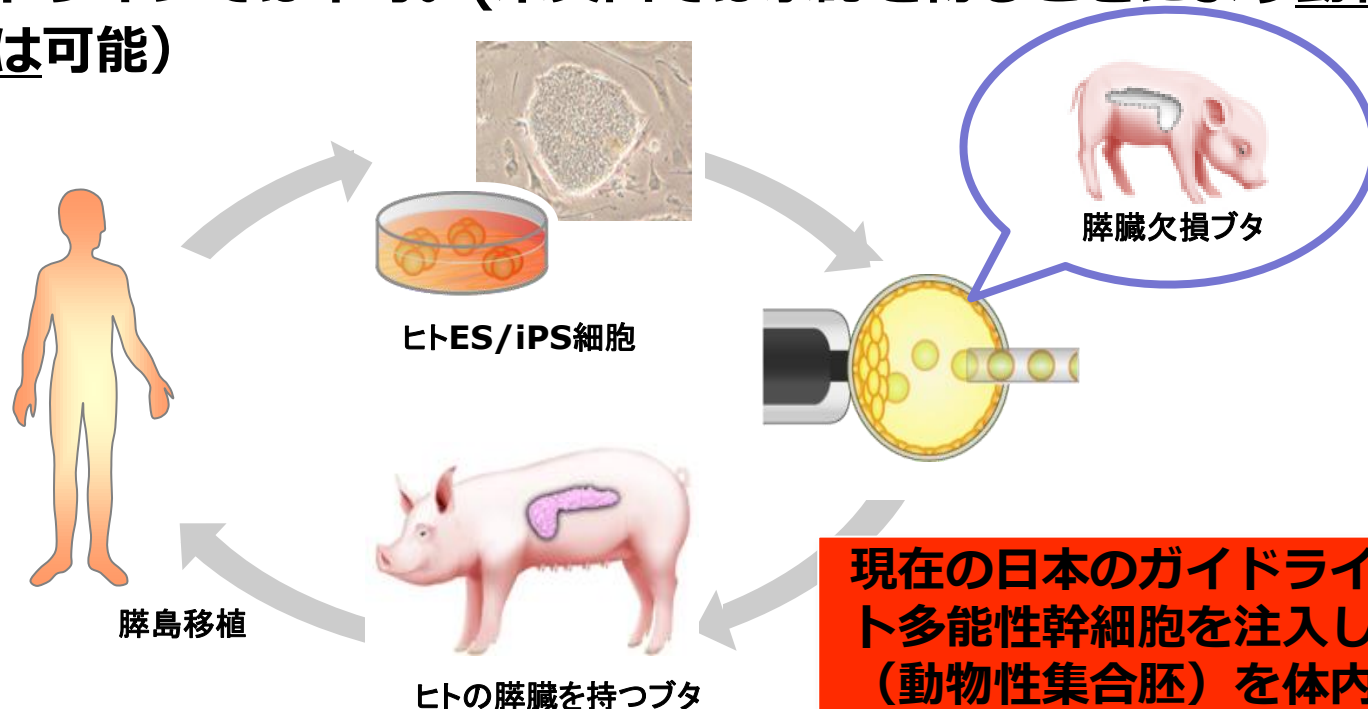


当初予想された困難な課題を乗り越えてブタ胎仔体内でヒトのすい臓を作出する準備ができた。
成功すれば移植ドナーを待っている重症糖尿病患者に膵島を供給する道が開かれる。

現在の課題

科学的な問題：人間とブタの遺伝的（進化的）距離はマウスとラットより離れているため、キメラができにくいと予想される。

倫理的な問題：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）



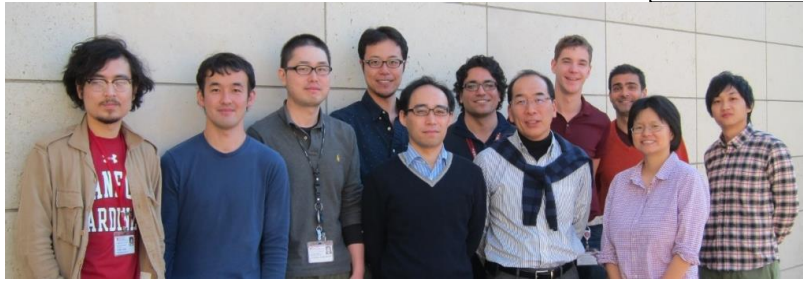
現在の日本のガイドラインではヒト多能性幹細胞を注入した動物胚（動物性集合胚）を体内に戻すことは禁じられている。

動物を使って移植臓器を作る医療は成り立つか？

- 実現すれば多くの難病患者を救うことができるだろう。
- 一方で、このような研究は社会的、倫理的な問題も含んでいる。 どのような問題が考えられるか？
- こういった研究を行うことの是非。
- このような医療は社会的なコンセンサスを得ることができるか？

Contributors

Nakauchi Labs



Stanford Univ



The Univ of Tokyo

Collaborators

Ross lab; UC Davis

Nagashima Lab; Meiji Univ.

Funders

AMED 日本医療開発研究機構

JST 科学技術振興機構

California Institute for Regenerative
Medicine

Stanford University

グループワークテーマ

動物を使って移植臓器を作る医療は成り立つか？