

国際共同研究事業 共同研究報告書

令和 5 年 4 月 1 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[日本側代表者所属機関・部局]

東京医科歯科大学 高等研究院卓越研究部門

[職・氏名]

特別荣誉教授 中内 啓光

[課題番号]

JPJSJRP 20181706

1. プログラム名 英国との国際共同研究プログラム(JRP-LEAD with UKRI)

2. 研究課題名

(和文) 非ヒト霊長類ナイーブ型多能性幹細胞の樹立とその性状解析

(英文) Authentication of primate pluripotent stem cells for chimaera formation

3. 共同研究実施期間(全採択期間)

2019 年 2 月 14 日 ~ 2023 年 3 月 31 日 (4 年 2 ヶ月)

4. 相手国側代表者(所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

University of Exeter, MRC Professor & Director of the Living Systems Institute, Austin Smith

5. 委託費総額(研究経費+業務委託手数料等、返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額		28,842,000 円
内訳	1年度目執行経費	220,000 円
	2年度目執行経費	9,702,000 円
	3年度目執行経費	8,470,000 円
	4年度目執行経費	10,450,000 円
	5年度目執行経費	円
	6年度目執行経費	円

6. 共同研究実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

日本側参加者等	14 名
相手国側参加者等	6 名

7. 研究の概要・成果等

(1)研究概要(全期間を通じた研究の目的・実施状況)

本研究では非ヒト霊長類ナイブ型多能性幹細胞(PSC)を樹立し、多能性状態と発生ポテンシャルをヒトやげっ歯類ナイブ型 PSC と比較することで、多能性維持機構の進化的共通性および差異を解明することを目的とした。類人猿であるチンパンジーにおいては研究期間内にナイブ型 PSC を樹立することに成功し、その遺伝子発現プロファイル・発生ポテンシャルはヒトナイブ型 PSC やヒト胚着床前エピブラストと相同であった。一方で維持培養にはヒトナイブ型 PSC には必須ではない新規因子の添加が必要であった。マーマセツナイブ型 PSC については TE 分化能が確認され、性状解析を進めている段階である。カニクイザルについてはナイブ型 PSC 維持条件を最適化する必要がある。チンパンジーに加え、マーマセツ・カニクイザルナイブ型 PSC を比較対象に加えることにより、包括的に霊長類ナイブ型多能性状態を理解することが可能になる。

(2)学術的価値(本研究により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

マウスやラットといったげっ歯類ナイブ型 PSC とヒトナイブ型 PSC の間で決定的に異なるのは、ヒトナイブ型 PSC は将来個体を形成するエピブラスト(Epiblast, Epi)に加えて胚体外組織である栄養外胚葉(trophectoderm, TE)や原始内胚葉(primitive endoderm, PrE)にも分化できるが、げっ歯類ナイブ型 PSC は外来性因子なしには胚体外組織に分化できないことである。本研究によって、チンパンジーナイブ型 PSC の遺伝子発現プロファイルがヒトナイブ型 PSC やヒト着床前エピブラストに近似している、TE 分化能を有する、Epi・TE・PrE によって構成された胚盤胞様体(blastoid)を形成できる、といったヒトとの高い相同性が明らかになった。霊長類の中では相対的にヒトと進化的距離がある新世界ザルであるマーマセツのナイブ型 PSC においても TE 分化が確認されたことから、ナイブ型 PSC および着床前エピブラスト細胞にある程度の可塑性があり TE/PrE にも分化できることは霊長類に共通する性質であることが示唆された。

チンパンジーナイブ型 PSC の樹立・維持培養には、ヒトナイブ型 PSC の維持条件に追加の因子が必要であることが判明した。カニクイザルにおいては一部の細胞はナイブ化するものの安定的な維持に課題があり、培養条件の最適化あるいは新規因子の添加が必要だと予想される。

また、ヒト blastoid に個体発生能があるかは大きな関心を集めている命題であるが、ヒト blastoid を長期発生させることには生命倫理上の問題がある。本事業にて作出されたチンパンジーblastoid はヒト blastoid に近似していたことから、チンパンジーblastoid を長期発生させることでヒト blastoid の個体発生能も推察できるであろう。

(3)相手国との交流(本研究による国際共同研究の活性化や、両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果)

研究期間中に新型コロナウイルスのパンデミックがあったが、研究期間中に国内で 2 回、英国で 1 回、研究進捗報告を中心としたミーティングおよびシンポジウムを開催し、本事業参加者以外の研究者とも交流を深めることができた。また、日英の研究参加者間で月 1 回のペースでミーティングを実施した。英国側研究代表者である Prof. Smith は多能性幹細胞研究の第一人者であり、本国の若手研究参加者が彼らの研究の進め方を学ぶ機会を得られたことは大きな収穫である。

(4)社会的貢献(社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の広い意味での社会的貢献はどのようにあったか)

チンパンジーナイブ型 PSC から blastoid を形成できたことにより、生命倫理上の問題からヒト blastoid では実施できない、着床以降の発生を検証できることを意味する。これは不妊のメカニズム解明、絶滅危惧種の繁殖、

ナীব型PSCから分化誘導した細胞やオルガノイドを通した生理学的特性の把握や病態解明が進むことによる希少動物の社会福祉改善に貢献できると考える。

我々の研究チームはヒト→動物キメラ体内でヒト移植用臓器/細胞を作る研究に取り組んできたが、ヒト→非ヒト霊長類キメラはヒト→ブタやヒト→マウスの組み合わせよりも全身性の協調的キメラ個体形成の面で望ましい。しかし、チンパンジーは絶滅危惧種であり、チンパンジー胚をホストにすることは難しい。カニクイザルやマーモセットは実験動物として使用できるが、胚提供個体とレシピエント個体を用意する必要があり、繰り返し実験を行うには多大なコストとスペースが必要である。ヒト細胞とのキメラ作成の対象を霊長類胚から blastoid に変更することで、研究の実施可能性が高まる。このように、非ヒト霊長類ナীব型PSCの樹立およびblastoidからの個体発生は、動物愛護の観点から求められる3R(Replacement, Reduction, Refinement)を進めつつ、多くの研究者に霊長類を用いた研究機会を提供できる。

(5)若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取組、成果)

本事業には30-40代の今後PIとして独立する世代の研究者が多く参加しており、計3回の合同シンポジウムやmonthly meetingにおいて幹細胞分野のトップレベル研究者から助言を受けながら研究を進める機会が得られた。また、日英を問わず研究参加者同士が交流を深める機会が得られた。本事業の成果をまとめた論文も現在共同で執筆中である。

(6)将来発展可能性(本事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

本事業は学術的意義に基づいて企画されたが、事業期間中に英国代表者であるProf. Smtihらによってヒトナীব型PSCからblastoidが作出できること、blastoidの構造・各細胞の遺伝子発現プロファイルが胚盤胞(blastocyst)に酷似していることが明らかになった。更に、マウスの再構成胚が個体発生できる可能性が示されたことから、ヒトblastoid発生への生命倫理上の懸念からも、非ヒト霊長類ナীব型PSCおよびblastoidの研究の重要度が非常に高まった。

(7)その他(上記(2)~(6)以外に得られた成果があれば記載してください)

特になし

8. 今後の展望(今後の国際共同研究・協力体制の維持・発展に向けた展望について、具体性・実現可能性等を踏まえて、継続的に展開していくための計画を記載してください)

今後チンパンジー以外の非ヒト霊長類ナীব型PSCについても研究成果をまとめていく予定である。英国側共同研究者には長年蓄積されてきた幹細胞研究の知見があり、日本側研究参加者らには英国研究機関では実施困難な非ヒト霊長類動物を用いた研究環境が整っている。今後も双方のアドバンテージを活かし、非ヒト霊長類blastoidの生体内発生についても共同研究を続ける予定である。

9. 最終年度実施状況

- ・ 最終年度実施計画書の「当該年度実施計画の概要」の内容と対応させつつ、最終年度のみの実施状況を簡潔に記載してください。再委託又は共同実施を行った場合は、それぞれの実施状況がわかるように記載してください。
- ・ 当該年度又は前年度(複数年契約を締結し繰越を行った場合)の各費目における増減が研究経費総額の 50% (この額が 300 万円を超えない場合は 300 万円)に相当する額を超えた場合は、その理由と費目の内訳を変更しても計画の遂行に支障がないと考えた理由を記載してください。

本来本事業は令和 3 年度で終了予定であったが、新型コロナウイルス流行に伴う措置により英国および東京医科歯科大学拠点の研究費繰越し申請が認められ、研究期間が 1 年間延長された。

令和 4 年度はチンパンジーナীব型 **PSC** の培養条件の最適化を行い、ヒトナীব型 **PSC** 培養条件に更に 2 つの因子を追加することで、遺伝的背景の異なる複数の個体に由来する細胞においても、再現性良く安定的に樹立・維持培養が可能になることを見出した。本培養条件で培養したチンパンジーナীব型 **PSC** が **TE** 分化能を有すること、エpiプラスト・**TE**・**PrE** を有する **blastoid** を形成できること(図1)、長期培養後も核型が安定していること、**RNAseq** によって遺伝子発現プロファイルがヒトナীব型 **PSC** およびヒト胚着床前エpiプラストに近似していること、を確認した(図2右)。また、霊長類の中ではヒトと進化的距離がある新世界ザルであるマーモセットナীব型 **PSC** においても **TE** 分化能があることを確認した。これにより、原則的に **TE/PrE** 分化能を有さないげっ歯類ナীব型 **PSC** (および着床前エpiプラスト)と異なり、霊長類ではナীব型 **PSC** および着床前エpiプラストにおいて各細胞系譜への運命決定が比較的緩やかで可塑性があることが示唆された。

2023 年 1 月 17-19 日の日程で **University of Exeter** にてシンポジウムと **wrap-up meeting** を開催し、本事業終了後の共同研究の進め方について検討を行った(5 名で参加し、旅費・宿泊費は先方負担であった。参加者の日当のみ委託費より支出した)。

図 1. チンパンジーナীব型 iPSC の樹立と blastoid 形成

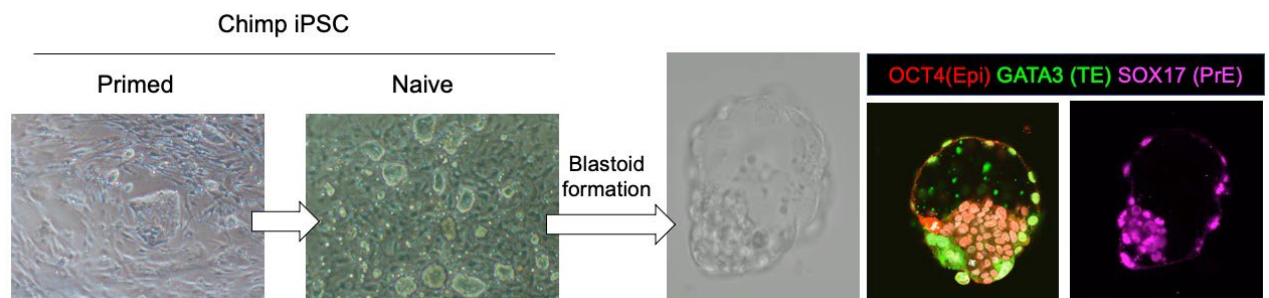
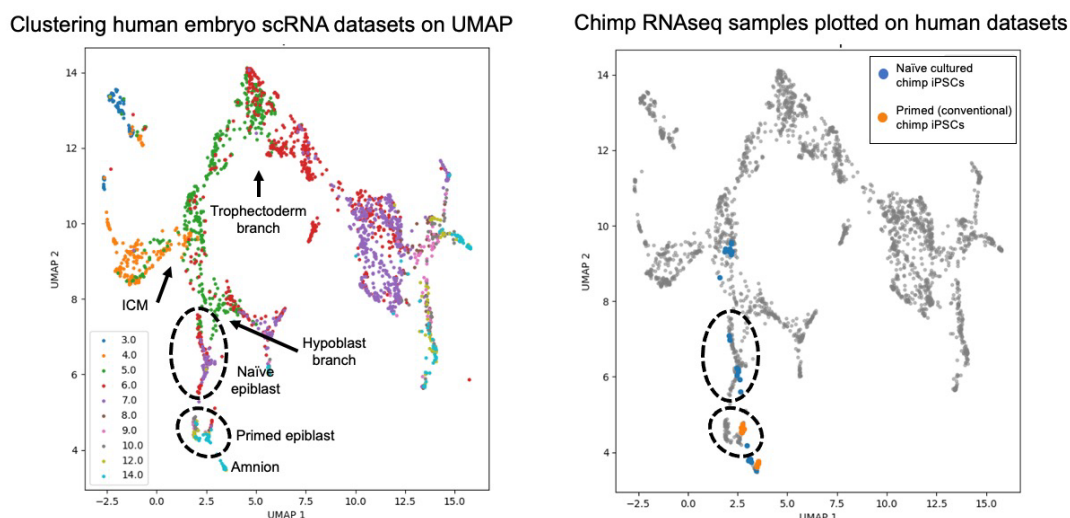


図 2. チンパンジープライム型・ナীব型 iPSC とヒト胚の遺伝子発現比較



11. 研究発表(最終年度において、本共同研究の一環として本事業による支援を受けたことを明示して発表したもの(発表予定のものを含む)について記載してください)

【雑誌論文】 計(0)件 うち査読付論文 計(0)件

通番	共著の有無 ^{*1}	著者名、論文標題等 ^{*2}
1		
2		

【学会発表】計(2)件 うち招待講演 計(0)件

通番	共著の有無 ^{*1}	発表者名、発表標題等 ^{*2}
1		Hideki Masaki “XenobARRIER in human-mouse interspecies chimeras” 第37回日本発生生物学会年会 2022年6月1日
2		Hideki Masaki, Hiromitsu Nakauchi “XENOBARRIER IN HUMAN-MOUSE INTERSPECIES CHIMERA FORMATION” Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research, 2022年6月15日 San Francisco, USA
3		

【図 書】 計(0)件

通番	共著の有無 ^{*1}	著者名、著書名等 ^{*2}
1		

*1 相手国側参加者との共著(共同発表)がある場合は○と記入。

*2 当該発表等を同定するに十分な情報を記載すること。例えば学術論文の場合は、著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年(西暦)、最初と最後の頁、掲載論文の DOI、学会発表の場合は発表者名、発表標題、学会等名、発表年(西暦)、発表地(国名、国外開催の学会の場合のみ)、図書の場合は著者名、著書名、出版社名、発行年(西暦)、総ページ数、ISBN、など(順番は入れ替わってもよい)。相手国側参加者との共著となる場合は、著者名が複数であっても省略せず、その氏名を記入し下線を付すこと。

*3 足りない場合は適宜行を追加すること。

12. 本事業による産業財産権の出願・取得状況(最終年度に出願又は取得したもの)

【出 願】 計(0)件

通番	産業財産権の名称、発明者、権利者、産業財産権の種類、番号、出願年月日、国内・外国の別
1	

【取 得】 計(0)件

通番	産業財産権の名称、発明者、権利者、産業財産権の種類、番号、取得年月日、国内・外国の別
2	

* 必要に応じて、欄を追加してください。