

# 国際共同研究事業 平成 3 1 年度実施報告書

令和 2 年 4 月 2 4 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者

所属機関・部局 東京大学・医科学研究所

(ふりがな) なかうち ひろみつ  
職・氏名 特任教授 中内 啓光

1. 事業名 国際共同研究事業 英国との国際共同研究プログラム(JRPs-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 (全採用期間)

平成 3 1 年 2 月 1 4 日 ~ 令和 4 年 2 月 1 3 日 ( 3 年 0 ヶ月)

4. 研究参加者 (代表者を含む)

(1) 日本側参加者 4 名

(2) 相手国側参加者 5 名

5. 主要な物品購入状況 (単価 (一品又は一組) 若しくは一式の価格が 50 万円以上のものを購入した場合は記載)

物品名	仕様 型・性能等	数量	単価(円)	金額(円)	設置研究機関名	備考

備考：本事業の委託費と他の経費とを合算使用する際は、合算使用した旨を備考欄に記載した上で、金額は本事業の委託費によるもののみ計上してください。

## 8. 研究実施状況

※ 申請書の内容及び当該年度実施計画書の「5. 本年度実施計画の概要」と対応させつつ、当該年度の研究の実施状況を簡潔に記入してください。年度途中で当初計画を変更した場合にはその内容及び理由も明記してください。

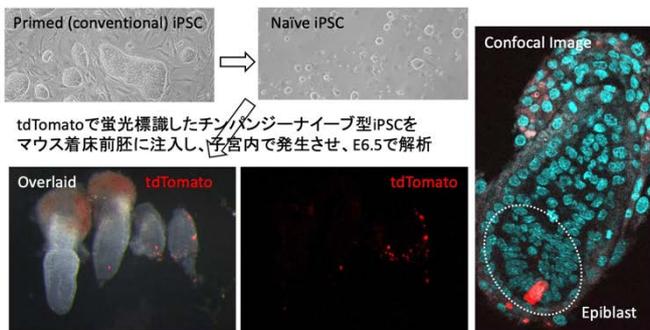
本プロジェクト全体としては、着床前胚との間にキメラ個体を形成できる、真に着床前段階にある（ナイーブ型）非ヒト霊長類多能性幹細胞を作製し、ヒトのナイーブ型多能性幹細胞とのトランスクリプトーム比較から、霊長類の各種間における多能性維持機構の共通性と差異を明らかにすることを目的としている。平成31年度は1) 非ヒト霊長類（マーモセット、カニクイザル、チンパンジー）のナイーブ型多能性幹細胞株の樹立および2) マーモセット胚を用いた培養下でのキメラ形成能評価系の確立を計画した。

### 1) 非ヒト霊長類ナイーブ型多能性幹細胞株の樹立

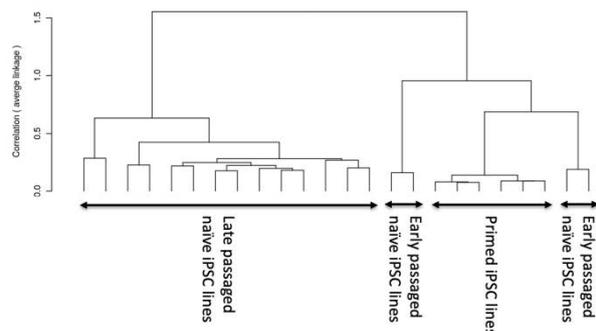
相手国側代表者である Austin Smith らがヒト細胞用に最適化したナイーブ型多能性幹細胞樹立法をチンパンジー、カニクイザル、マーモセット多能性幹細胞に適用したところ、一過性にはナイーブ様の性状を示すものの、長期間多能性を維持することはできなかった。そこで様々なシグナル分子を添加し、検討したところ、チンパンジー細胞において長期間ナイーブ状態を維持できる培養

図1

#### ・ チンパンジーナイーブ型iPS細胞の樹立およびキメラ形成実験



#### ・ RNAseq検体におけるhierarchical clustering解析



ナイーブ型培養条件下で一定期間培養することで、プライム型iPS細胞と大きく異なる形態・性質を示す多能性幹細胞株が得られる。

条件を複数見出した。この培養条件下で長期間維持された細胞は、形態的にも遺伝子発現プロファイル上も、ヒトやマウスのナイーブ型多能性幹細胞と同様の形態を示すことを確認した（図1）。RNAseq解析の結果、プライム型(従来型)からナイーブ型へと、培養期間に応じて遺伝子発現全体が変化していくことが確認できた。また、この細胞をマウス胚に移植し、異種間キメラ形成実験を行ったところ、将来的にマウス個体を形成する領域であるエピブラストに寄与できることが示された。キメラ形成の頻度および寄与する細胞数が少ないために、より発生の進んだ段階でのキメラ個体は得られていないものの、今後予定されているマーモセット、ブタといったより近縁な種の胚を宿主として異種間キメラ形成実験を行った場合のキメラ個体作出が期待される。

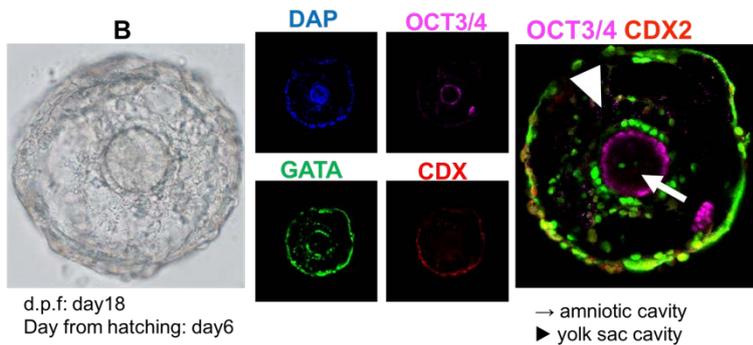
当該条件でカニクイザルのプライム型多能性幹細胞をナイーブ型に変換することはできなかったため、ヒトとチンパンジー間でナイーブ型多能性の維持に必要な条件が異なったように、カニクイザルに最適化した培養条件が必要であると考えられる。カニクイザルナイーブ型多能性幹細胞株の樹立は来年度以降の課題とする。

### 2) マーモセット胚を用いた in vitro キメラ形成能評価系開発

非霊長類ナイーブ型多能性幹細胞株が真に着床前段階にあることを示す最も簡便かつ正確な機能評価系は、着床前胚に移植して発生させた場合にキメラ個体が得られるか、キメラ形成実験にて評価することである。例えば、マウス ES 細胞/iPS 細胞は着床前エピブラストと同様の発生段階にあるため着床前胚に移植された場合にキメラ個体を形成できるのに対し、サルやヒトの従来型の ES 細胞/iPS 細胞は着床後段階にあるために、着床前胚に移植した場合にはキメラ個体が得られていな

い。ただし、マーモセット胚を用いる場合、レシピエント個体に移植できる胚が3-4個であることから、マウス(1個体あたり20個程度の胚を移植可能)のように様々な株を *in vivo* で評価することは、コスト的にも動物愛護の観点からも難しい。そのため、キメラ形成が期待できそうな細胞を培養下で一次スクリーニングし、有望な株のみを *in vivo* でのキメラ形成実験に進めることを計画している。近年ヒト着床前胚をカーネギーステージ5まで発生させられる培養条件が報告されたことから、この培養条件を用いてマーモセット胚を培養したところ、ヒト胚と同様に羊膜腔や卵黄嚢を形成し、カーネギーステージ5まで培養が可能であることを確認した(図2)。チンパンジーナイーブ型多能性幹細胞が樹立できたことから、次年度は当該細胞を移植し、培養下でのキメラ形成の可否を判定する。

**図2**  
**マーモセット胚による接着後体外培養法の確立**



ヒトで成功している培養条件で、マーモセット着床前胚を用いて *in vitro* で培養を行った結果、マーモセット胚でも成功し、ヒト胚同様、免疫染色より羊膜腔や卵黄嚢の形成を確認した。

9. 研究発表（平成 31 年度の研究成果）

【雑誌論文】 計（ 0 ）件      うち査読付論文 計（ ）件

通番	共著の有無*	論文名、著者名等**
1		
2		
3		

【学会発表】 計（11）件      うち招待講演 計（5）件

通番	共著の有無*	標題、発表者名等**
1		“THE PROGENIES OF HUMAN OR CHIMP PLURIPOTENT STEM CELLS DISTURB INTERSPECIES CHIMERA DEVELOPMENT” Hideki Masaki, Hiromitsu Nakauchi International Society for Stem Cell Research annual meeting, June 28th, 2019, Los Angeles, USA
2		“How to make human->animal chimeras?” 正木英樹 日本分子生物学会年会、2019年12月4日、福岡市
3		“Genetic engineering of marmoset for modeling disease.” Erika Sasaki EFOR 9th Annual Meeting of the EFOR Network. May 7 <sup>th</sup> , 2019, Paris, France(招待講演)
4		“Japanese animal research regulation.” Erika Sasaki EFOR 9th Annual Meeting of the EFOR Network. May 7 <sup>th</sup> , 2019, Paris, France(招待講演)
5		“Reproductive techniques for producing transgenic marmoset in CIEA.” Yoko Kurotaki EFOR 9th Annual Meeting of the EFOR Network. May 5 <sup>th</sup> , 2019, Paris, France (招待講演)
6		マーモセット胚の着床後における体外培養 岸本恵子、Huaiyu Hu、Thorsten Edwin Boroviak、佐々木えりか 第66回日本実験動物学会総会、2019年5月15日～17日、福岡市
7		“Self-organization of the in vitro attached non-human primate embryo.” Keiko Kishimoto, Huaiyu Hu, Erika Sasaki International Society for Stem Cell Research Annual Meeting 2019. Jun 26 <sup>th</sup> , 2019, Los Angeles Convention Center, CA, US.
8		病態モデルとしてのコモンマーモセット 佐々木えりか 第28回サル疾病ワークショップ、2019年7月5日、つくば市（招待講演）
9		“Editing the Non-Human Primate Genome.” Erika Sasaki 52nd Annual Conference, Society for the Study of the Reproduction. July 20 <sup>nd</sup> , 2019, San Jose CA, USA (招待講演)

10		“Self-organization of the transgenic non-human primate embryo.” Yoko Kurotaki, Erika Sasaki marmoset bioscience symposium 2019, Oct 17 <sup>th</sup> , Chicago, USA
11		マーモセット胚の疑似着床後胚の培養法確立 岸本恵子、Huaiyu Hu、佐々木えりか 第42回日本分子生物学会、2019年12月3日、福岡市

【図書】計 ( 1 ) 件

通番	共著の有無*	題名、著者名等**
1		実験医学別冊 完全版 ゲノム編集実験スタンダード、山本卓、佐久間哲史編集、III 応用編、5.モデル霊長類でのゲノム編集、佐々木えりか、佐藤賢哉、汲田和歌子著、羊土社、2019年12月15日発行

- \* 相手国研究代表者との共著（共同発表）がある場合は○、相手国研究代表者との共著であり謝辞等に事業名を明記している場合は◎と記入。
- \*\* 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、論文名、著者名、掲載誌名、巻号や頁等、発表年（西暦）、学会発表の場合は標題、発表者名、学会等名、発表年（西暦）、著書の場合はその書誌情報、など（順番は入れ替わってもよい）。
- \*\*\* 足りない場合は適宜行を追加すること。

1. この報告書は、最終年度を除く毎年度提出してください。
2. 本会の事業報告等に記載するための適当な図・写真等があれば、説明を付して添付してください。
3. この報告書は、本共同研究の成果として本会ウェブサイトに掲載します。また、この報告書を本会の事業報告として刊行する場合、内容に影響しない範囲で修正を行うことがあります。
4. 知的財産権等の事情で本報告書の一部の公開を希望しない場合は、対応についてあらかじめ本会担当者に相談してください。