

異種キメラ動物を用いた臓器の作製とその応用に関する研究

(24-31)

主任研究者 由利 俊祐 国立長寿医療研究センター 実験動物管理室 (室長)

研究要旨

現在、薬物や対処療法だけでは治療できない重篤な心筋症、慢性腎不全、劇症肝炎などの疾病も、臓器移植により治癒するようになっている。しかしながら、臓器のドナー不足は極めて深刻な状況である。このような背景からも、体のすべての部分になりうる能力を持つ多能性幹細胞(ES細胞、iPS細胞)を用いた再生医療研究が発展してきている。その中でも、臓器を欠損する受精卵に、異種の多能性幹細胞をインジェクションした異種キメラ動物体内で、ドナーとなる多能性幹細胞由来の臓器を作製する研究が注目されてきている。本研究では、上記の発生工学的技術を駆使して、動物体内で多能性幹細胞由来の異種の細胞・組織・臓器を作製し、それらが正常な機能を獲得しているかどうかを調べる計画としている。さらに、作製した臓器欠損モデルや細胞欠損モデルを用いて、老化スピードの異なる細胞へと置換を行い、特定臓器や細胞の老化が、個体の老化へとどのような影響を及ぼすかを調べ、老化研究を発展させていく。

主任研究者

由利 俊祐 国立長寿医療研究センター 実験動物管理室 (室長)

A. 研究目的

臓器移植は、臓器不全の抜本的な解決法として最先端医療に位置付けられている。しかし、臓器のドナーは絶対的に不足しており、ドナー不足を解決する必要性が増している。この問題を解決するために、多能性幹細胞由来の臓器を異種の動物体内に作ることができる「胚盤胞補完法」と呼ばれる手法が注目されている。胚盤胞補完法は、臓器欠損モデル動物の胚盤胞(受精卵)に、異種である多能性幹細胞をインジェクションし、異種間キメラ動物の体内で多能性幹細胞由来の臓器を作る方法である。最終的には、この手法を用いて、臓器欠損大型動物の受精卵へヒト多能性幹細胞をインジェクションすることで、機能を持つヒト臓器を作り出すことが期待されている。

本研究では、

- 1) 特に移植可能で必要性の高い臓器（腎臓、心臓など）に焦点をあて、それらの臓器を異種多能性幹細胞を用いた胚盤胞補完法により作製していくこと。
- 2) 作製した臓器欠損マウスの胚盤胞へ、老化スピードが変化したマウス多能性幹細胞をインジェクションし、臓器や細胞の老化スピードを変化させ、臓器や細胞の老化の変化が、個体の老化や寿命へ及ぼす影響を解析することを目的に研究を進める。

B. 研究方法

1) 様々な臓器欠損モデルの作製と異種細胞による臓器補完

本研究課題では、主に、心臓、腎臓など様々な臓器に対して、臓器欠損モデルを作製し、評価を行い、機能をもつ異種臓器を作製する計画としている。これまでに、申請者は、臓器の発生に重要な遺伝子を欠損した ES 細胞を作製し、胚盤胞補完法とは逆に、野生型の胚盤胞へ、その ES 細胞を注入する『逆・胚盤胞補完法』という方法を考案している。この方法では、全てのキメラ動物が臓器欠損細胞と正常細胞を有するため、実験の効率をあげることができる。本研究では、この方法を用い、心臓、腎臓欠損モデルを作製し、評価し、それぞれのモデルに対し、異種多能性幹細胞のインジェクションを行い、完全に異種へと置換された臓器を作製し、その臓器の機能を解析する。

2) 胚盤胞補完法技術の老化研究への応用

上記のように作製した臓器欠損動物や新たに作製する細胞欠損モデルへ、老化スピードが変化する変異を持つ多能性幹細胞を注入し、キメラ動物を作製する。そして、特定の臓器や細胞の老化スピードが特異的に変化したキメラ動物の老化の進行度を継続的に観察し、どの臓器や細胞が、個体の老化や寿命、そのほかの臓器、組織の老化の進行度と関連するかを包括的に解析する。

(倫理面への配慮)

マウスやラットを用いる実験にあたって、「動物の愛護及び管理に関する法律」に準じ、3Rs の観点からも、苦痛の緩和などの適切な処置、使用動物数の削減、動物を用いない代替法を意識した実験を心がける。また、動物実験ならびに遺伝子組み換え実験については、それぞれ動物実験倫理委員会および遺伝子組換え実験安全委員会で承認された方法で行う。

C. 研究結果

1) 様々な臓器欠損モデルの作製と異種細胞による臓器補完

複数の腎形成不全モデルマウス (*Sall1* 遺伝子欠損、*Ret* 遺伝子欠損、*Osr1* 遺伝子欠損) を比較解析した。その結果、*Osr1* 遺伝子欠損胚では、腎臓形成に必須な「ネフロン前駆細胞」と「尿管芽」の両方が欠損していることを明らかにした。さらに、ラット ES 細胞を *Osr1* 欠損マウス胚へ注入したところ、ラット細胞が腎臓発生領域へ高率に寄与し、ラット細胞を主体とする腎臓構造が形成された。現在、この結果を、論文へ投稿し、リバイス実験を行っている (Yuri et al., *Stem Cell Reports*, in revision)。

2) 胚盤胞補完法技術の老化研究への応用

細胞内現象の異常により実際に個体の寿命が変化することが知られている老化要因である 1.ゲノム安定性、2.DNA 変異の蓄積、3.ミトコンドリアの異常、4.核膜の異常(早老症)に関わる遺伝子に着目し、4つの老化要因遺伝子をそれぞれ欠損する ES 細胞の樹立を行った。各クローン ES 細胞株を樹立後、PCR により、遺伝子の欠損を確認し、計 6 種類の遺伝子欠損 ES 細胞の樹立に成功した。

作製した遺伝子の変異した ES 細胞を野生型のマウスの受精卵へインジェクションし、老化状態が異なる細胞が個体全体に混在するキメラ動物作製した。そして、作製したキメラマウスの生存率を追跡し、実際に遺伝子変異を持つ細胞が混在することで、個体の老化スピードが変化するかを調べた。ES 細胞由来細胞の寄与率が 90%以上の個体の解析を行った結果、遺伝子 A 欠損 (KO) ES 細胞を含む個体では、野生型 ES 細胞を含むキメラ個体に対して、明らかに体が小さかった。また、後ろ足が不自由で、歩行の自由も失われており、5 分間の解析の間に動いている時間の割合が 22.93%、9.4%と、野生型のキメラ個体の動いている時間の割合 54.97%、63.87%と比較して明らかに動きが低下している表現型が見られた。さらに、遺伝子 A KO ES 細胞を含む個体は、体重の減少とともに 175 日目と 176 日目に死亡し、明らかな寿命の短縮が確認された。

実際に、遺伝子 A KO ES 細胞を含む個体が老化状態であったかを、腎臓、肝臓、心臓、肺からサンプルを回収し、老化マーカーによる RT-PCR 解析を行った。その結果、*p21*, *Gadd45a*, *Mmp9*などの老化マーカーの発現が、有意に遺伝子 A KO ES 細胞を含む個体で上昇していることが示された。

遺伝子 A-KO ES 細胞の寄与率が 29.39%、38.11%、46.31%の個体に関しては、現在 200 日を超えて飼育している個体もいるが、寿命を迎える兆候はない。それぞれの個体は、やや体重が少ない傾向が見られるが、野生型 ES 細胞の寄与率が同程度含まれる個体と同様に体重も増加傾向にある。これらの結果から、遺伝子 A-KO ES 細胞が一定以上個体内に含まれた場合のみ、寿命へと影響を及ぼすことが明らかとなった。

D. 考察と結論

1) 様々な臓器欠損モデルの作製と異種細胞による臓器補完

Osr1 遺伝子欠損胚では、腎臓内の「血管」や「間質」の細胞が欠損しないため、完全にはラット細胞で腎臓を置換することができなかったことから、現在、「血管」や「間質」をターゲットとした腎臓欠損モデルの作成を継続して行う必要がある。

2) 胚盤胞補完法技術の老化研究への応用

本研究では、特定の老化要因が変異した **ES** 細胞を用いてキメラ動物を作製し、個体内における老化状態の不均一性が個体老化へ及ぼす影響を解析した。その結果、老化要因遺伝子 **A** を欠損した **ES** 細胞が高率に寄与するキメラ個体において、体重減少、運動量低下、ならびに寿命短縮といった顕著な老化様表現型が認められた。一方で、同一遺伝子欠損 **ES** 細胞であっても、寄与率が一定以下の個体では寿命短縮が観察されなかった。これらの結果は、特定の老化要因の変化が個体老化に影響を及ぼすためには、臓器・細胞レベルでの老化細胞の存在量依存的な閾値が存在する可能性を示唆している。

従来の老化研究では、全身性の遺伝子改変動物を用いた解析が主流であり、単一因子の変化が複数臓器に同時に影響を及ぼすため、どの臓器や細胞が老化の起点となるかを明確にすることは困難であった。本研究で用いたキメラ動物モデルでは、同一個体内に老化ポテンシャルの異なる細胞が共存するため、特定の細胞集団の異常が個体全体へどのように波及するかを解析できる点に大きな特徴がある。これらのことから、本研究結果は、細胞内老化要因が臓器レベルの機能低下を介して個体老化へと連関する実証的モデルを提示するものである。

また、本研究では老化マーカーとして *p21*、*Gadd45a*、*Mmp9* などの遺伝子発現解析を行い、遺伝子 **A-KO** 細胞を含む個体では、老化細胞が増加している傾向が示された。今後は、キメラ個体を用いて、単一細胞レベルでの遺伝子発現解析や空間的解析手法を導入することで、老化状態の局在性や臓器間連関の実態をより詳細に解明できると考えられる。

本研究では単一の老化要因遺伝子欠損 **ES** 細胞を主に解析したが、老化は複数の因子が相互に影響し合う多因子性の現象であることから複数の老化要因を同時に変異させた **ES** 細胞を用いたキメラ動物解析を行うことで、老化因子間の独立性や協調性、さらには臓器間ネットワークの階層構造を明らかにできる可能性がある。

本研究により、キメラ動物モデルを用いることで、特定の老化要因が臓器・細胞レベルから個体老化へと波及する過程を解析できる新たな実験基盤を提示することが可能となった。本研究で得られた知見は、今後、老化研究における臓器間連関機構の理解を深化させるとともに、将来的な老化制御戦略や再生医療研究への応用にも寄与するものと期待される。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Murata Y, Yuri S, Ikawa M, Isotani A. Maturation Status of Rat Lung Epithelial Cells in Interspecies Chimeras Generated by Blastocyst Complementation. Genes Cells. 2025 Sep;30(5):e70046. doi: 10.1111/gtc.70046. PMID: 40840556.

2) Almunia JA, Munesue Y, Ogiso N, Yuri S, Kawasaki H, Morikawa N, Noma S, Takano K, Watanabe A, Niida S, Nishikimi A. Hematologic and biochemical changes associated with age and strain in aged B6 mice breeding in the national center of geriatrics and gerontology. Exp Anim. 2026 Apr 22;75(2):172-193. doi: 10.1538/expanim.25-0071. Epub 2025 Nov 5. PMID: 41192850; PMCID: PMC13100696.

2. 学会発表

1) 由利俊祐, 有澤範恵, 磯谷綾子. A barrier to generating PSC-derived heart through interspecies blastocyst complementation. 第 58 回日本発生生物学会合同大会 2025/7/16

2) 由利俊祐, 磯谷綾子. Generation of rat-derived kidney through interspecies blastocyst complementation. 国際先導研究 熊本リトリート 2025/7/26

3) 由利俊祐, 磯谷綾子. 胚盤胞補完法によるラット多能性幹細胞由来の腎臓の作製. 第 48 回日本分子生物学会年会 2025/12/4

4) Julio A, Yoshiko M, Satoko N, Morihiro I, Haruka K, Nobuko M, Shunsuke Y, Noboru O. Post-Mortem Study on the Incidence of Pathologies in Three Strains of Aged Rats from the NCGG. 第 72 回日本実験動物学会総会. 2025/5/22

5) Julio A, Yoshiko M, Satoko N, Morihiro I, Haruka K, Nobuko M, Shunsuke Y, Noboru O. Post-Mortem Study on the Incidence of Pathologies in Three Strains of Aged Rats from the NCGG Aging Farm. 6NC リトリート 2025. 2025/6/7

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし