

ERATO 中内幹細胞制御プロジェクト最終評価結果報告書

【研究総括】 中内 啓光（東京大学医科学研究所 教授）

【評価委員】（敬称略・五十音順）

金倉 譲 （大阪大学大学院医学系研究科 教授）
 後藤 昌史 （東北大学未来科学技術共同研究センター 教授）
 土居 雅子 （株式会社大塚製薬工場 研究開発センター
 鳴門研究所 所長）
 中辻 憲夫 （委員長；京都大学 物質－細胞統合システム拠点 設立拠点長）
 丹羽 仁史 （理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター
 チームリーダー）

評価の概要

ERATO 中内幹細胞制御プロジェクトは、異種の動物体内にヒトの多能性幹細胞からなる臓器を作出するという究極の目標のもと、その実現の基盤となる分子生物学および発生工学的技術の開発と、小動物と大動物をモデルにその技術を用いた臓器再生の実証を展開した。近年、急速に発展している発生生物学を基に、発生工学と連携して、多能性幹細胞を用いて特定の臓器を異種間の動物体内で作出することを目指す、独創的かつ挑戦的なプロジェクトであったと高く評価する。

本プロジェクトは、中内 啓光研究総括（東京大学医科学研究所教授）のリーダーシップのもと、小動物モデル研究グループと大動物モデル研究グループが、特定の臓器発生の基礎的なメカニズムの解明、幹細胞を用いた胚盤胞補完法による異種動物個体内の臓器作出の実証、キメラ作製や臓器不全動物の作製等に必要な発生工学的な基盤技術の開発に野心的に取り組んだ。

小動物モデル研究グループは、世界で初めてラット-マウスのキメラ作製に成功し、胚盤胞補完法によってマウスの体内にラットの ES 細胞および iPS 細胞由来の膵臓を作出することに成功した。また、マウスにおいて iPS 細胞由来の血管の作出を確認しており、再生した臓器の血管も患者の幹細胞由来にできることを示す重要な成果として高く評価できる。さらに、キメラに寄与できるブタ等の iPS 細胞樹立につながる手法を見出すなど、科学的に大きなインパクトを与える秀逸な成果を挙げた。大動物モデル研究グループは、膵臓欠損ブタの作製に成功し、大動物における胚盤胞補完法による臓器再生の可能性を実証した。これらの研究成果は新たな再生医療研究や発生工学研究の方向性を示すものである。また、2つの研究グループの連携により、ブタの遺伝子改変技術や異種間でのキメラ形成率を飛躍的に引き上げる技術も開発しており、これらの基盤技術は将来の産業応用にも貢献すると評価できる。

本プロジェクトのこれまでの成果は、インパクトファクターの高い国際学術誌に掲載されるだけでなく、新聞各紙やテレビ放送などでも大きな反響をよんでおり、社会的にも注目を集めていると言えよう。最終目標である臨床応用に向けては、安全面やコスト面、社会的な理解など高いハードルは存在するが、基礎研究として予想以上に画期的な成果を次々と挙げ、かつ産業的に価値の高い基盤技術も得られていることから、将来的に実用化につながる事が期待される。胚盤胞補完法を用いた臓器再生を目指す、斬新な研究構想を驚異的なスピードで実証したことは、研究総括のリーダーシップと、周辺研究の進捗をいち早く取り入れられるように必要な技術開発を進める戦略の賜物であり、研究総括のプロジェクトマネジメン

トについても高い評価を与えたい。

以上から、本プロジェクトの取り組みは、当初の予想を上回る展開を見せ、国際的にも最先端の研究成果を挙げたと判断する。今後の展開にも大いに期待が持てるものであり、戦略目標「生命システムの動作原理の解明と活用のための基礎技術の創出」に資する秀逸な成果が得られた。

1. 研究プロジェクトの設定・運営

1-1. プロジェクトの全体構想

近年、生体内ですべての細胞への分化が可能な多能性幹細胞である胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）の研究の急速な発展に伴い、ES/iPS細胞を用いて組織や臓器を再生する「再生医療」への期待が高まっている。特に、慢性腎不全など臓器不全症に対する根本的な治療には、人工臓器または臓器移植が必要であるが、人工臓器は生体適合性や生理機能の限界等の課題があり、臓器移植は感染や倫理の問題だけでなく、臓器提供者の絶対数が少ないという問題を抱えている。そのため、患者自身の多能性幹細胞を用いて移植可能な臓器を作ることは、再生医療において究極かつ重要な目標として、その実現が期待されている。しかしながら、臓器は立体的な空間で多種多様な細胞が複雑な相互作用によって形成されていることから、臓器の発生過程や機能形成の解明といった基礎的な研究だけではなく、再生医療への応用を見据えた実証的な研究を進めることで、臓器再生の実現に必要な課題を明らかにし、その解決を目指す、課題解決型基礎研究が求められている。

ERATO 中内幹細胞制御プロジェクトは、異種動物の体内にヒトの多能性幹細胞からなる臓器を作出するという究極の目標を掲げて2008年4月に発足した。本プロジェクトを指揮する中内研究総括は、ヒトの臓器を異種動物の体内に再生することで、臓器不全症の根本的な治療である臓器移植を可能にすることを念頭に、異種間の個体で目的の臓器を三次元に構築する技術基盤の確立とその実証を目指した。そのために、マウスやラット（小動物）において臓器再生に寄与する幹細胞の原理解明を確立し、大動物の異種間での臓器再生の技術の確立とその実証に取り組んだ。基礎的な解明と実証を並行して進めるという、課題解決型基礎研究の究極とも言えるプロジェクトと評価したい。

中内研究総括は、これまで造血細胞の研究において顕著な業績を挙げている。例えば、ヒトの造血幹細胞を用いてブタの体内に免疫系の構築を試みるなど、造血幹細胞を用いた研究開発において先駆的な研究を展開してきた。こうした研究成果から、種を超えて幹細胞を生着させ、血液等の臓器を補完するために必要な課題を十分理解していた。また、

1993年にChenらによって開発された胚盤胞補完法という、個体の発生初期の胚盤胞内に多能性幹細胞を注入することで遺伝子の変異や欠失を補完する技術を基に、臓器不全の動物の胚盤胞に患者ドナー由来の幹細胞を入れることで、幹細胞由来の臓器が再現できるのではないかとする着想に至り、試験的研究を始めていた。こうした試験研究から、胚盤胞補完による臓器再生という極めて大胆かつ独創的な構想に挑戦する中内研究総括の姿勢は高く評価できる。

再生医療への応用を念頭に、幹細胞の発生過程を時空間的に捉え、分子生物学的な観点だけでなく、臓器再生に至る発生工学的な観点を相互的に組み合わせ、ヒトの臓器を異種動物で再生するための基盤技術を構築するという斬新かつ野心的な研究構想は、「新しい科学技術の源流」を予感させるものであり、ERATOに相応しいものであったと確信する。本プロジェクトの研究が、戦略目標「生命システムの動作原理の解明と活用のための基礎技術の創出」

の達成に貢献することは想像に難くない。

1-2. プロジェクトの枠組みや研究体制、および研究活動の状況

本プロジェクトは、小動物モデル研究グループと大動物モデル研究グループから成る。このうち、小動物モデル研究グループとプロジェクト事務所は東京大学医科学研究所（東京・白金）に置かれ、大動物モデル研究グループは明治大学農学部発生工学研究室（神奈川・川崎）を中心に研究を実施した。研究実施場所が2つに分かれているものの、プロジェクトメンバーが定期的集まり、互いの研究進捗を報告しあい議論することで、課題を共有しかつ実験を互いに助けあってきた。特にプロジェクトの初期段階では、頻繁にグループ間での議論を行い、プロジェクトの問題意識を共有し、グループリーダーだけでなく、若手研究員にも自律的にプロジェクトを進行する意識を植え付けることに成功したことは、中内研究総括の強いリーダーシップの成果であり、高く評価される。また、異種間でのキメラ動物の作製と胚盤胞補完法の実証のために自然科学研究機構・生理学研究所と、ブタなどの大型動物の胚盤胞補完法の実証のために全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所と共同研究を行い、小動物と大動物の実証研究を進める体制を強化した。このように、研究対象の動物個体の大きさから別々に研究を進めてきた生物学と農学分野研究者らを集めることで、ERATO が意図する“ヘテロな研究者集団”が形成され、中内研究総括の狙いでもある、臓器再生に向けた幹細胞の制御に関する基礎的な解明と、小動物と大動物における実証研究を並行して行える非常に効果的な研究体制が構築されたことは高く評価したい。

このような研究体制のもとで、小動物モデルグループは、プロジェクト開始早々にマウスモデルにおいて、移植した幹細胞のみからなる特定の臓器を胚盤胞補完法によって作成できることを証明した。これまでラット-マウスの異種間でのキメラ胚の作製は不可能とされていたにもかかわらず、世界で初めてラット-マウスのキメラ作製に成功し、かつ胚盤胞補完法によってマウスの体内にラットの ES 細胞および iPS 細胞由来の膵臓を作出することに成功するなど、世界に極めて大きなインパクトを与える画期的な成果が得られた。また、マウスにおいて胚盤胞補完法によって作出された臓器の栄養血管が iPS 細胞由来であることも確認している。さらに本プロジェクト最終年度までには、これまで困難とされていたげっ歯類以外でキメラに寄与する多能性幹細胞の樹立に向けて、マウスにおいてアポトーシスの制御により Primed State の iPS 細胞がキメラに寄与することを確認しており、今後の臨床応用につながる事が期待できる。

大動物モデル研究グループにおいては、実用的なブタの遺伝子ノックアウト技術が確立されていなかったにも関わらず、遺伝子導入による膵臓欠損クローン豚の作製に成功し、胚盤胞補完法による臓器再生が可能であることを証明するなど、優れた成果を挙げた。また、研究グループの融合的な成果として、プロジェクト最終年度までにブタの遺伝子ノックアウトの可能性を実証した。さらに異種間でのキメラ形成率を引き上げるための技術も見出しており、これらの技術的なブレークスルーは異種間での臓器再生に繋がる基盤技術として期待できる。

これらの研究成果は、これまでの発生生物学の常識を打破した成果であり、その科学的意義は極めて大きいことは言うまでもない。インパクトファクターの高い国際誌に論文が掲載されるだけでなく、新聞各紙やテレビ放送などでも多数取り上げられ大きな反響をよんだことは、本プロジェクトの研究が科学的・実用的な視点だけでなく、社会的な視点からも大きなインパクトも有することを示している。また、膵臓欠損モデルブタの作製など本プロジェクトで確立している個々の基盤技術は、十分に産業的価値を有していることから、産学連携を担う企業研究者との連携により更なる飛躍が期待できる。以上のことから、本プロジェク

トの研究活動は高い水準で順調に推移しており、今後の研究展開にも期待が持てるものと判断する。

〔研究プロジェクトの設定および運営〕 a+（特に優れて的確かつ効果的である）

〔研究活動の状況〕 a+（特筆して望ましい研究展開を示している）

2. 研究成果

2-1. 小動物モデル研究グループ

小動物モデル研究グループの目的は、幹細胞由来の臓器再生をマウス等の小動物モデルにおいて実現させ、特定の臓器の再生過程や制御機構の解明につなげることで、そして同じ手法を用いて異種間の小動物においても特定の臓器を幹細胞から再生できるかを実証することである。本グループでは、まず、マウスモデルにおいて同種の幹細胞から特定の臓器を再生することに成功した。幹細胞から特定の臓器を再生することはこれまで報告がなかったが、血液細胞においてその可能性は証明されていたため、プロジェクト当初に実現し得たことは不思議ではない。この成果はプロジェクト開始当初に中内研究総括が考えていた、「胚盤胞補完法により特定の臓器を幹細胞から作製できるのではないか」という仮説を証明する第一歩の成果であり、プロジェクトの方向性を示す成果として評価したい。

マウスとラットの異種間における臓器再生については、そもそもマウスとラットの間ではキメラ胚の作製が不可能であることが提唱されていた。また、ラット ES 細胞株も樹立されていないこと、さらに臓器欠損モデルはマウスしか存在していなかったことから、プロジェクト開始当初から異種間における臓器再生の実現は極めて困難な道りであることが想定されていた。しかしながら、2008年12月にラット ES 細胞株樹立成功の論文が発表されると、速やかに本プロジェクトにおいてラット ES 細胞株を樹立し、既に用意していた膵臓欠損マウスの胚盤胞に注入してマウス体内にラット ES 細胞由来の膵臓を作製することに、世界で初めて成功した。また、これまで ES 細胞でしか実証されていなかった胚盤胞補完法に関し、iPS 細胞においても同様にラット-マウスの異種間で膵臓を作出することも示した。これらの成果は、これまで不可能とされてきたことを可能にした驚異的な成果であり、一流の学術誌への掲載のみならず、新聞各紙やテレビ放送にて多数取り上げられるなど、学術的にも社会的にも非常に大きな衝撃を与えた、秀逸な成果と評価できる。さらに、膵臓の再生ばかりでなく、腎臓、肝臓、胸腺などの再生も可能であることを示唆する知見も得られており、特定の臓器再生を実証すると共に、その制御機構の解明につなげることが期待される。

胚盤胞補完法による臓器再生が成功したことで、将来的な実用化に向けて新たな課題も見えてきた。例えば、胚盤胞補完法によって再生された臓器については、臓器に複雑に入り組んでいる血管や神経が患者の幹細胞由来だけでなく動物個体由来となっている可能性が大きく、また再生された臓器が移植されたときに患者の体内で免疫反応が生じないのか、といった点を検証する必要がある。これらの課題に対して、本グループでは、血管形成および血液系の発生が障害を受けるため胎生致死となる Flk-1 欠損マウスの胚盤胞に正常マウス iPS 細胞を加えてキメラマウスを作成したところ、胎生致死を免れて成体にまで発育したのみならず、全身の血管系ならびに血液系が iPS 細胞由来であることを確認している。マウスでの実験ではあるが、胚盤胞補完法で再生された臓器を支える血管も、同様に患者の幹細胞由来にできることを示唆しており、今後ブタなどの大動物に応用する上で重要な成果と言えよう。また、胚盤胞補完法による臓器再生の成功の条件として、キメラ形成能を有する iPS 細胞の

作製が必要であることも分かってきた。そのため本グループでは、iPS 細胞のキメラ形成能を評価する技術として、発生分化が進行したエピブラストステージの多能性幹細胞のアポトーシス抑制することによりキメラ形成手法を考案し、キメラ動物の作製が可能であることを示した。プロジェクト開始時点から課題であったキメラに寄与できるブタ、サル等のエピブラストステージ iPS 細胞によるキメラ形成を可能にする、特筆すべき成果として高く評価したい。これらの技術開発は、今後、科学的にも産業的にも重要性が増すと期待される。

さらに、本グループでは、最も研究が進展している血液細胞をモデルに、幹細胞とその微小環境の相互作用により造血幹細胞への分化、さらに様々な血球系への分化を誘導することに成功した。また、造血幹細胞のニッチ制御に神経系細胞が関与していることも世界で初めて明らかにしており、生物学的にも興味深い成果を得ている。これらの成果は、臓器再生と直接関係はないように考えられるが、三次元の臓器を再生する方法論の開発に活用していくための先駆的な基礎的知見であり、学術的な観点から評価できる。

以上のように本グループは、プロジェクト開始からわずか3年で、従来困難とされたマウスとラットの異種間での臓器再生が出来ることを実証したことは、計画段階で期待された以上のものであることは衆目の一致することである。この成果は、再生医療に求められる数々の技術開発を進展させたことで得られたものであり、その技術は学術的にも社会的にも重要な成果であると高く評価したい。また、プロジェクト最終年度までに、ノックアウトマウスの胚盤胞補完により iPS 細胞由来の血管再生が可能であることを見出した。本プロジェクトで開発した成果を臨床応用に繋げる上で、胚盤胞補完により作製した臓器の栄養血管が全て動物個体由来である事が重要な課題の一つであったが、それに対する有効な対処法を考案したことは非常に高く評価できる。さらに、キメラ形成能を持たないエピブラスト多能性幹細胞のアポトーシスを抑制することによりキメラを形成させることが可能であることを示し、ブタ、サル等で作成されてきたキメラ系性能を持たない iPS 細胞をキメラ動物の作製に利用するための道筋をつけた。これらの成果は、今後の研究の進展にとって大きなハードルをクリアし得る秀逸した成果と評価すべきである。本グループは、再生医療への実用化を踏まえて、基礎的な知見から画期的な基盤技術の開発まで飛躍的に研究を進展させ、世界を牽引する成果を得られたと判断する。

2-2. 大動物モデル研究グループ

大動物モデル研究グループは、比較的発生工学技術が確立しているブタを対象に、胚盤胞補完法に必要な臓器欠損ブタの作出と、臓器欠損ブタの体内に特定の臓器を再生し、移植することを目指して研究を開始した。プロジェクト開始当初、核移植法による遺伝子導入ブタの作製技術は確立していたが、遺伝子ノックアウト技術は確立していなかったことから、その技術の確立から臓器欠損ブタの作出までは膨大な時間を要することが想定され、プロジェクト期間中に臓器欠損ブタの作出の成功すら必ずしも期待できるものではなかっただろう。しかしながら、本グループは小動物グループの成果を基に、遺伝子ノックアウト技術ではなく、遺伝子導入によって膵臓欠損ブタの作出を試み、驚異的な速さで成功した。小動物モデル研究グループの成果を活かして、短期間で目標が達成できる可能性の高い方法を選択したことは賞賛に値すると言えよう。また、本グループは膵臓の欠損を遺伝するブタの精子凍結保存と体外受精にも成功しており、これらの技術は発生工学分野に大きな影響を与える成果として高く評価できる。

続いて本グループは、作出した膵臓欠損ブタを用いて、小動物モデルと同様に胚盤胞補完法により健常ブタ由来の膵臓を再生することにも成功した。大動物においても胚盤胞補完法による臓器の作出が可能であることを示した画期的な成果である。さらに、本来なら致死的

である膵臓欠損ブタは膵臓補完により成体まで生存し、正常な血糖値を示すことから膵臓機能も正常であることを確認した。現在、圧倒的なドナー不足であり、最も臨床応用に近いとされている臓器が膵臓の中のインスリン産生組織である膵島である。ブタの膵島を用いたバイオ人工膵島の臨床治験が産業界では進められているが、性能等の課題が残っている。また、iPS 細胞から膵島に類似の細胞を作る研究は行われているが、そのグルコース応答性や安全性の問題は解決されていない。本グループの成果は、大動物においても臓器欠損を補完出来ること、そして遺伝形質は欠損のまま個体を維持出来ることを実証した極めて重要な成果であり、膵島再生の実用化を飛躍的に前進させることが期待できる。

さらに、本プロジェクトの究極の目標である異種動物のキメラ形成に向けて、ブタだけでなく、ブタとウシにおいて胚盤胞キメラの作成に成功している。ただし、キメラ胎児の作出効率が低いことや、生存が困難であることなどの課題も明らかになっており、今後これらの課題に向けて更なる工夫が求められる。

本グループは、ブタとウシだけでなく、サル（マーモセット）桑実胚とブタ桑実胚の凝集実験により高効率にキメラ胚盤胞を作出することに成功した。今後、これらの知見を活かして大動物におけるキメラ動物の作出に向けた解決策が見出されることが期待できる。

本グループは、小動物モデル研究グループと連携して、ZFN (Zing Finger Nuclease)やTALEN (Transcription activator-like (TAL) effector nuclease) を用いて特定の遺伝子をノックアウトしたブタ胎仔繊維芽細胞の樹立に成功し、ブタにおいても遺伝子ノックアウトが可能なことを初めて示した。また、遺伝子ノックアウト細胞の繊維芽細胞の核を体細胞核移植することにより臓器不全を示す胎仔を得ることに成功した。遺伝子改変による疾患モデルブタの作製は、製薬業界ではかねてより期待されていたが、その技術開発は困難を極めていた。本グループの研究成果は、遺伝子改変による臓器欠損ブタの作出だけでなく、発生工学の基盤技術としても産業的インパクトは高いと評価できる。

以上、本グループは、胚盤胞補完法が大動物にも適用可能なことを示しただけでなく、ブタにおける発生工学技術を駆使した極めて類をみない技術を確認しており、その成果は学術的にも産業的にも高く評価できる。また、異種間での臓器再生につながる概念の実証や、疾患モデル動物の作出などにつながる基盤技術も継続して見出しており、今後の再生医学研究全般に道を開くことが期待される。

〔研究成果（科学技術的側面）〕 a+（成果として秀逸である）

〔研究成果（産業・社会的側面）〕 a+（成果として秀逸である）

3. 総合評価

本プロジェクトは、「多能性幹細胞を用いてヒトの臓器を異種の動物体内で作出する」という極めて挑戦的な目標のもと、異種間の動物モデルにおいて胚盤胞補完法による臓器再生の実証を目指す、非常に野心的かつ独創的なものである。中内研究総括の強力なリーダーシップのもと、大動物モデル研究グループを加えたバランスの取れたチーム構成によって、各研究者の自由な発想を重視した個別研究課題を推奨しつつも、グループを超えた連携が進むようなプロジェクト運営がなされた。まさに ERATO に相応しい研究プロジェクトであると言える。

この一見無謀とも言える目標に向って、本プロジェクトは3年間という短期間で、異種間キメラ作製および臓器再生に成功した。これまでの発生生物学の常識を打破した成果として、その科学的意義は極めて大きい。また、これらの成果は単に不可能を可能にしたということ

に留まらず、動物種の生物学的特性の決定や生体内における臓器サイズの決定機構など、これまで問うことの出来なかった問題の解決に道筋を与えるものであり、その意味で新たな研究分野を開拓したともいえるだろう。さらに、ラットやブタにおける発生工学技術の発展と確立は、これまでマウスでしか為し得なかった発生生物学的ないしは疾患モデル作製を介した医薬学研究に広く資するものであり、生命科学の今後の発展に資する重要な成果である。

本プロジェクトの最終目標である、移植治療を目的としたヒト臓器の異種動物での作出には、現行の異種間キメラ作製にかかわるガイドラインの改正といった社会的問題や、安全面やコスト面での問題などの高いハードルが存在している。しかしながら、本プロジェクトでは、再生した臓器を移植するために課題であった動物由来の血管への解決策を見出し、さらにはキメラに寄与するブタ、サル等の iPS 細胞を樹立するための基盤技術を開発しており、本研究成果を臨床へ応用するための技術的な問題を次々とクリアしている。また、膵臓欠損ブタを用いて胚盤胞補完法による健常ブタ由来の膵臓の作出を実証するなど、世界を驚かせる成果を挙げたプロジェクトと言えよう。さらに、ブタの遺伝子ノックアウトによる臓器欠損ブタの作出も成功し、これらのブタの発生工学技術は卓越した成果が得られたと評価する。これまでに本プロジェクトで得られた成果は、基礎研究として画期的なものであり、かつその技術は産業的にも高い価値を有するものと判断する。

以上より、本プロジェクトは、プロジェクト発足当初に掲げた挑戦的な目標に対して中内研究総括のリーダーシップのもと、発生工学と再生医学との連携を強化することで、新たな研究を展開し、戦略目標「生命システムの動作原理の解明と活用のための基礎技術の創出」に資する秀逸な成果が得られたと評価する。

〔総合評価〕 S （秀逸な成果が得られた）