

多能性幹細胞を用いてマウスの体内でラットの臓器を作製することに成功

どうしても臨床応用に こだわりたいのはなぜか？

ブタの体内でヒトの臓器を育て、ヒトの体に移植する——まるでSF小説のようなストーリーが、実現に向けて一歩ずつ近づいている。
私たちの常識を覆す画期的な物語の裏には、臨床応用をひたすらまっすぐに見据える、1人の研究者の眼差しがあった。

ラットの臓器を持った マウスの子が生まれた！

2010年9月、日本発のニュースが世界を驚かせた。戦略的創造研究推進事業ERATO「中内幹細胞制御プロジェクト」が、多能性幹細胞を用いてマウスの体内でラットの臓器(すいぞう)を作製したというのだ。

成長したマウスの体内に、成長したラットの臓器を移植したのではない。マウスの胎内で育ったマウスの子が、ラットの臓器を持って生まれてきたのだ。まるでSF小説のようなこの事実の衝撃の大きさは、ある意味で説明不要だろう。しかし、衝撃が大きいからこそ、その裏に隠れがちな本質的意義を理解してほしいと、プロジェクトの研究総括である中内啓光教授は力説する。

「私たちが目指すのは、従来の臓器移植に代わる新しい治療法の実現です。現在、さまざまな臓器不全症の治療として、他人の臓器や人工臓器を移植する方法が行われていますが、ドナー不足や生体適合性など、課題は少なくありません。多能性幹細胞を用いて患者自身の臓器を再生できれば、それらの問題を解決し、より本質的な治療を提供できます。今回の成果は、その実現に一歩近づくものなのです」

無限の増殖能を持ち、生体のすべての組

織の細胞に分化が可能な多能性幹細胞の研究は、京都大学の山中伸弥教授らによるiPS細胞の作製成功により一気に活気づいた。従来、多能性幹細胞研究の主流だったES細胞は、受精後の胚から作り出すため、倫理的な問題や、本人由来ではないことから生じる免疫拒絶反応の問題が指摘され、実用化へのハードルとなっていた。その点、iPS細胞は組織細胞を多能性幹細胞に転換するため、ES細胞のような倫理的問題もなく、患者自身の細胞から望みの臓器の細胞を作ることができると期待されている。

しかし、同時に、大きな課題もクローズアップされてきた。ES細胞もiPS細胞も、分化した組織細胞から形作られるのは紙のように薄い2次元構造までで、立体的な3次元構造の再現は困難なのだ。これでは、実際の臓器を再生することはできない。中内教授自身、iPS細胞の発見より以前からES細胞を用いて臓器再生の研究に取り組み、やはり3次元構造が再現できないという難問に頭を悩ませていた。

生物の体を試験管に見立てて 3次元の壁を越えた

1993年、中内教授の目に、スタンフォード大学の研究員時代に同僚だった中国人研究者ジェンツー・チェン氏らの論文が留まった。そして、そこに記されていた「胚盤胞補完法」(*)というユニークな方法に大いに興味を持った。

* 胚盤胞補完法

1993年、チェン氏らによって報告された方法。

成熟したリンパ球を持たない遺伝子改変マウスの胚盤胞(受精後間もない胚)に正常なES細胞を注入することで、成熟したリンパ球を持ったマウスを作製した。作製したマウスのリンパ球はすべてES細胞由来のものとなる。

「リンパ球を持たないのは特定の遺伝子を欠損しているためですが、胚盤胞に正常なES細胞を注入することで、欠損したリンパ球が補われ、ES細胞由来のリンパ球を持ったマウスが生まれるというわけです。そのときは、ユニークな方法だと感心しただけですが、そのうち、これはリンパ球ではなく臓器にも応用できるのではないかと思いつきました」

これまでは、試験管の中で臓器を再生しようとし、3次元の壁を越えられずにいた。しかし、胚盤胞補完法を用いて生物の体を試験管に見立て、その中で育てれば、うまくいくのではとひらめいたのだ。

早速、アイデアを試してみようとしたが、周囲の反応は冷ややかなものだった。しかし、中内教授の自らのアイデアへの自信が揺らぐことはなかった。粘り強く協力者を探すうちに、当時大学院生だった小林俊寛研究員と出会う。卵細胞を扱う技術の確かさを見込んで声をかけたところ、興味を示してくれた。そして、二人三脚で研究を重ねた結果、臓器ができないように遺伝子操作したマウスの胚盤胞にES細胞を注入し、臓器を持ったマウスを作製することに成功。マウスの臓器は、ES細胞由来のものであることが確かめられた。ついに、多能性幹細胞から3次元の臓器を再生することに成功したのだ。

他人ではなく
患者自身の
臓器の移植を。



研究総括

中内啓光 なかうち・ひろみつ

1978年横浜市立大学医学部卒業、83年東京大学大学院医学系研究科博士課程修了。スタンフォード大学医学部遺伝学教室博士研究員、理化学研究所国際フロンティア研究システム研究員、筑波大学基礎医学系教授などを経て、2002年より東京大学医科学研究所教授。08年より同研究所幹細胞治療研究センター長を務める。

胚盤胞補完法を利用した臓器作出の原理

手作業で微細な調整を施し 受精卵に針を突き刺す

膵臓の発生に中心的な役割を持つ *Pdx1* という遺伝子がある。*Pdx1* を欠損したマウス(ノックアウトマウス:KOマウス)は、膵臓が形成されないため、生後すぐに死亡する。しかし、このノックアウトマウスの胚盤胞に正常な多能性幹細胞(ES細胞もしくはiPS細胞)を注入すると、注入された多能性幹細胞が欠損を補完する役割を果たし、多能性幹細胞由来の膵臓を持ったマウスが生まれてくる。これが、胚盤胞補完法の原理だ。

チェン氏らによって、この方法が成熟したリンパ球を持たないノックアウトマウスに有効ことが示されていた。中内教授はそれを臓器にも応用できると考えたのだ。

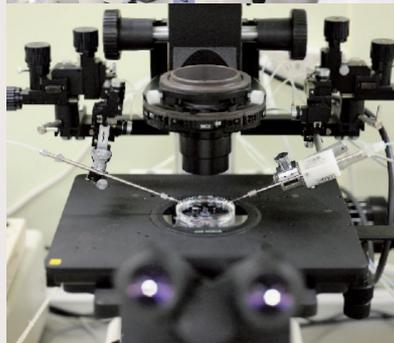
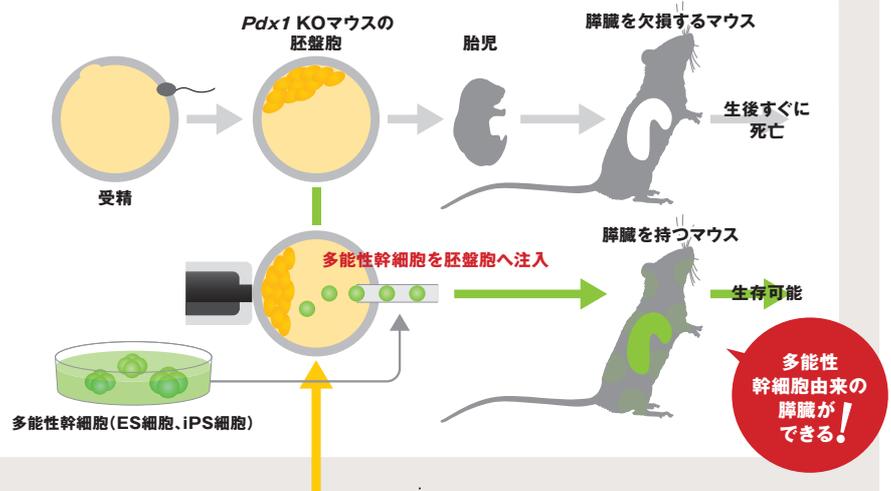
理論的には十分可能であると自信を持っていた中内教授だが、なかなか協力を得られなかった。やはり、多くの人はこのような実験が成功するとは思わなかったのでしょうか。

実験に使う受精卵を扱うには、管の一方の端を口でくわえ、呼吸を微妙に調整しながらもう一方の端から卵を出し入れし、シャーレの中に運ぶなどの作業が必要となる。受精卵に多能性幹細胞を注入するのは、さらに至難の技だ。マイクロマニピュレータと呼ばれる装置を使い、電子顕微鏡の画像を観察しながら、手作業で微細な調整を施し、針を受精卵に突き刺して、多能性幹細胞をうまく注入させなければならない。手先の器用さや忍耐強さが要求される。

クジラの精子をウシの卵子に 注入した経験を生かして

中内教授の協力者となった小林研究員は、信州大学繊維学部にて在学中、こうした操作を行った経験があった。

「クジラの精子の受精能が研究テーマだったのですが、クジラの卵子の入手は難しい。そこで、ウシの卵子を使って研究していました。もちろん、そのまま発生が進むわけではありませんが、受精した直後、ごく初期の発生の様子は確かめられるのです。ただし、自然には受精しませんから、



呼吸を調整して卵を扱い、マイクロマニピュレータで針を受精卵に突き刺す

マイクロマニピュレータを使い、ウシの卵子に針を刺して、クジラの精子を注入していました」

その後、幹細胞の研究に興味を持ち、卒業後は東京大学に移って、中内教授の研究室で大学院生として研究に携わるようになった。研究テーマは臓器再生ではなく造血幹細胞だったが、中内教授に大学時代の貴重な経験や能力を認められ、声を掛けられた。もともと再生医療には興味があり、身につけた技術を生かせるとあって快諾。本来のテーマである

造血幹細胞の研究に取り組みながら、胚盤胞補完法を用いた多能性幹細胞からの臓器作出を手がけ始める。

マウスのお腹を開けて 膵臓が光っていることを確認

小林研究員は、*Pdx1* ノックアウトマウスの胚盤胞に緑色蛍光たんぱく質EGFPで標識したマウスの多能性幹細胞を注入。仮親の子宮に移植した後、生まれたマウスを解析した。

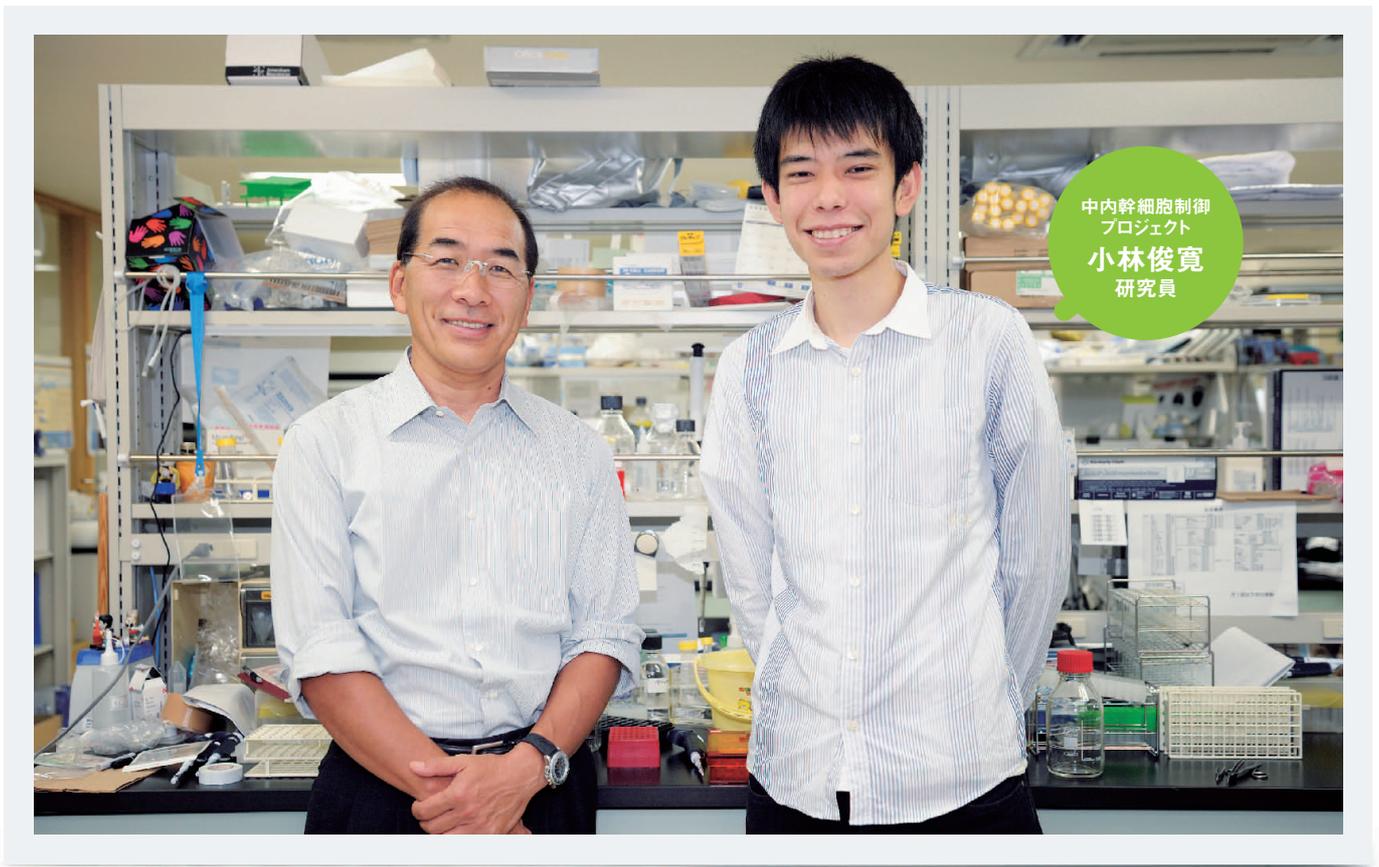
その結果、多能性幹細胞の寄与が認められた *Pdx1* ノックアウトマウスの膵臓は、一様にEGFP蛍光を示しており、膵臓を形成する外分泌組織、内分泌組織、膵管のそれぞれが、すべてEGFP陽性の多能性幹細胞由来の細胞から構成されていることが確認された。

「膵臓ができたとしても、それが完全に多能性幹細胞由来のものでなければ意味がありません。やってみないとわからないし、うまくいっているという確信もありませんでした。マウスのお腹を開けて、膵臓が光っているのを確認したときは、うれしかったですね」(小林研究員)

また、それらのマウスが高血糖などの症状を示すことなく生体まで発育し、正常な耐糖機能も獲得していることから、多能性幹細胞由来の膵臓が、生体内で正常に機能していることもわかった。こうして、胚盤胞補完法により、多能性幹細胞由来の機能的な臓器を作り出せることが確かめられた。

多能性幹細胞を用いてマウスの体内でラットの膵臓を作製することに成功

どうしても臨床応用にこだわりたいのはなぜか？



中内幹細胞制御
プロジェクト
小林俊寛
研究員

マウスーラット異種間キメラであることにこそ意義がある！

臨床応用できる ヒトの臓器を作るために

胚盤胞補完法により、多能性幹細胞からマウスの膵臓を作り出すことに成功した中内教授は、それに満足することなく、すぐさま、次の課題に取り組んだ。ラットの膵臓を持ったマウスという、異種動物間キメラ(**)の作製だ。

**異種動物間キメラ

キメラ(2種類以上の遺伝的に異なる細胞からなる個体)を、種の異なる細胞および胚を用いて作製したもの。

素人目にも、マウスの体内でマウスの膵臓を作り出すことに比べるとかなりの難題に思える。しかし、中内教授にためらいはなかった。違う種類の動物の中で臓器を再生できなければ意味がないと、当初から考えていたからだ。

「私が臓器の再生に取り組んだ目的は、あくまでも臨床応用にあります。同種間でし

か臓器を再生できないのなら、ヒトの臓器はヒトを用いてしか再生できません。そんなことは倫理的にとっても許されないでしょう。しかし、異種間で臓器を再生できる可能性が示されれば、たとえばブタの体内でヒトの臓器を育てることも夢ではありません。それでも倫理的問題は残るかもしれませんが、

少なくともヒトの体内で育てるよりはずっと現実味があります」

とはいえ、異種動物間キメラは、1984年にヒツジ・ヤギのキメラの作製に成功していたものの、マウス・ラット間で成功した前例はない。たやすく実現するとは、中内教授も小林研究員も考えてはいなかった。どうすればこのハードルをクリアできるのか、議論を重ねながらもとりあえず実験を進めてみたところ、意外な結果が出た。多能性幹細胞を用いれば、マウス・ラット間の異種間キメラが成立したのだ。この結果をみて、ただちに膵臓欠損マウスの胚盤胞にラットのiPS細胞を注入したところ、マウスの体内にラットの膵臓を作製することに成功したのだ。

マウス-ラット異種間キメラ



臨床応用を阻む 「規制」という壁

「ERATOのプロジェクトでは、大きく2つの課題を設定していました。1つは、マウスやラットのような小動物を用いて、異種動物の体内で臓器を作製すること、もう1つは、将

来的に大動物であるブタの体内でヒトの臓器を育てることを見据えて、遺伝子操作によって特定の臓器を持たないブタを作り出すことです。どちらもかなりチャレンジングだと思っていましたが、今回の成果により、前者はクリアできました。後者についても、予想以上に順調に成果が得られつつあります」

ブタの体内でヒトの臓器を育てると聞くと、多くの人は荒唐無稽に感じるかもしれない。しかし、ブタの臓器はヒトに近く、アメリカなどでは、肝臓移植の順番を待っている患者への一時的な措置として、ブタの肝臓が利用されるケースもあるという。■

実際に治療が始まる頃には、外国に行っても高いお金を払わなければならないかもしれないのだ。

「規制はたしかに必要なかもしれませんが。しかし、確かめてみなければ、前に進むことができないのも事実です。倫理的な部分だけでなく、医療への貢献、医療関連産業や知的財産といった経済的な側面を考えることも必要なのではないのでしょうか」

今回の成果は、世界初のマウス・ラット間キメラでの臓器再生で世界を驚かせた。しかし、中内教授の興味はそこにはない。目指すのはあくまでも臨床応用だ。その裏

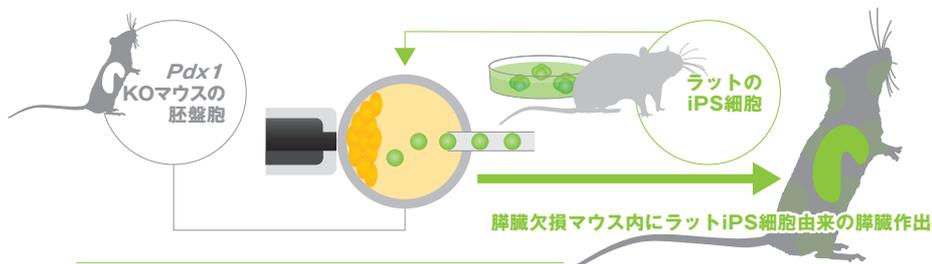
ことを見据えて、研究対象とする臓器として膵臓を選んだのだ。

「成果が発表されたその日に、患者さんからメールがありました。1型糖尿病は、子どものうちから悩まされている人が多い。そんな人たちを救うためにも、さらに研究を前に進めて、1日も早く臨床応用への道を開きたいと思っています」

マウスの体内でラットの膵臓を作製する——驚天動地とも思える研究成果の裏には、「患者を救いたい」という強い志を持った研究者の、優しく、熱い眼差しが隠されていた。■

異種間胚盤胞補完法により、マウス内にラットの臓器を作出

ラットiPS細胞を*Pdx1*ノックアウトマウスの胚盤胞に注入し、マウスの体内にラットiPS細胞由来の膵臓を作出することに成功した。組織学的な解析においても一様にEGFP蛍光を示す細胞で構成されており、膵臓の機能を示す生体因子の発現も認められた。実際に、このマウスは成体までに发育して膵臓も正常に機能しており、異種動物間胚盤胞補完法により、異種個体内に多能性幹細胞由来の臓器を作製できると証明された。



臨床応用に向けては、血管や神経の細胞が多能性幹細胞由来のものにならないという問題、逆に目的の臓器以外でも多能性幹細胞由来の遺伝子が発現してしまうという問題、さらにはヒトiPS細胞の改良も必要となるなど、残された課題も少なくない。しかし、3次元構造という壁を越え、多能性幹細胞から臓器を再生する方法を示した今回の成果により、世界中で研究が活発になるだろう。

そこで中内教授が危惧(きぐ)するのが、世界と比べた日本の規制の厳しさだ。

「今回の成果を踏まえて、次にブタの体内でヒトの臓器を育てようと思っても、日本では規制によって許されません。そこで、まずは試験管の中で実験を重ねようと考えています」

世界を見渡せば、中国はそうした規制がなく、自由に研究を進めることができる。英国ではこういった実験がガイドライン上、可能である。アメリカは規制があるが、今回の成果を受けたガイドラインの変更が予想される。このままでは日本は取り残されてしまい、

には、「患者のために役立ちたい」という強い思いがある。

研究に使う時間と労力は患者のためであってほしい

「私はもともと臨床医を目指していました。研究の道に進んでからもいつかは臨床に戻りたいという気持ちを持ち続け、そのきっかけを持っていません。今に至っています。メカニズムの解明など、生物学的な興味もないとは言いません。しかし、研究に使っている時間と労力は、将来、患者の役に立つためのものであってほしいと願っているんです」

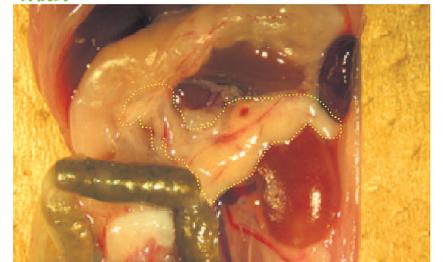
研究対象とする臓器として膵臓を選んだのも、臨床応用を念頭においてのことだ。多くの患者が悩まされている1型糖尿病の治療として、近年、膵臓に含まれる膵島の移植という治療法が確立してきた。臓器全体の移植と比べて安全性が高く、身体的負担が低いなどの利点がある。しかし、ドナー不足のため、移植を受けられずにいる患者が多数存在する。そんな状況を踏まえ、ヒトへの臨床応用の最初のステップとなる

ラットの膵臓を持った*Pdx1*KOマウス

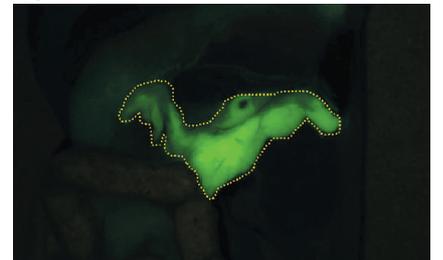


マウス内に作出されたラット膵臓の形態

明視野



EGFP



EGFP画像(写真下)により、作出した膵臓がラットiPS細胞由来のもので確かめられた。ただし、サイズは本来のラットの膵臓より小さかったことから、大きさは胚盤胞によって決まると思われる。