

# 論文審査の結果の要旨

氏名 小林 俊寛

本論文は胚盤胞補完法という方法を応用して多能性幹細胞からの臓器作出を試みた研究成果をまとめたものである。患者自身の幹細胞を使って実質臓器を構築することは再生医療の究極的な目標の一つであり、そのための細胞ソースとして期待されているのが生体内のすべての細胞に分化が可能な多能性幹細胞である。多能性幹細胞としては、ヒト受精卵から胚性幹細胞 (Embryonic Stem cell: ES 細胞) が樹立されて以降、これを用いた臨床応用を目指した多くの研究が進められてきた。特に近年、誘導型多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cell : iPS 細胞) 技術の開発により、特定の転写因子の導入により終末分化した体細胞を ES 細胞とほぼ同等の能力を持つ細胞に容易かつ再現性よく転換できることが可能となった。これにより“自身の多能性幹細胞”から *in vitro* で望みの細胞系譜に効率的に分化誘導することへの道が開け、糖尿病やパーキンソン病などの治療に応用されようとしている。しかし、これらの治療は細胞治療であり、臓器移植のための実質臓器の作出となると、三次元的な構造、多岐にわたる機能細胞の複合体という特徴をもつ臓器を *in vitro* で構築することは極めて難しいと考えられる。そこで論文提出者は多能性幹細胞が持つ大きな特徴の一つである“キメラ形成能 = 発生過程への寄与”を利用し、“胚盤胞補完法”の技術を応用することで *in vivo* で多能性幹細胞由来の臓器構築を試みた。

胚盤胞補完法は 1993 年に Chen らによって報告された。彼らは免疫グロブリンの構成に必要な酵素 Rag2 を欠損し、成熟したリンパ球を持たない *Rag2* ノックアウト (KO) マウスの胚盤胞に正常な ES 細胞を注入することでキメラマウスを作製した。それらを解析したところ、成熟したリンパ球はすべて ES 細胞由来のものであった。論文提出者はこの

原理を応用し、遺伝的に特定の細胞系譜さらには臓器が欠損したマウスの発生段階における“空き”を利用することで、外から注入した多能性幹細胞由来の臓器が作れないかと考えた。

まず胚盤胞補完法により臓器が作出可能か、腎臓および膵臓をターゲットとし、マウス多能性幹細胞を用いて検証した。胚盤胞補完法によりこれらを作成するため、臓器の“空き”を持ったマウスとして、腎臓欠損を示す *Sall1* KO マウスおよび膵臓欠損を示す *Pdx1* KO マウスを用いた。それらの胚に、成体の EGFP トランスジェニックマウスより樹立した iPS 細胞を注入し、仮親の子宮への移植後、妊娠満期で取り出した新生児を解析した。その結果、iPS 細胞の寄与が認められた *Sall1* KO マウスでは一様に EGFP 蛍光を示す iPS 細胞由来の腎臓が、*Pdx1* KO マウスでは一様に EGFP 蛍光を示す iPS 細胞由来の膵臓がそれぞれ作出できた。

胚盤胞補完法の究極的な目標は、この原理を利用し特定の臓器を欠損させた異種の生体内を使ってヒト多能性幹細胞由来の臓器を作製することである。そのためには注入された多能性幹細胞が異種の胚発生に同調・寄与し、その生体内において機能的な組織、臓器を作り出せるかが重要な点となる。そこで次に論文提出者は異種間におけるキメラ形成能を確認するため、多能性幹細胞を用いたマウス-ラット間の異種間キメラ作製を試みた。マウス多能性幹細胞をラット胚に、逆にラット多能性幹細胞をマウス胚に注入したところ、マウスおよびラットの多能性幹細胞はお互いの胚発生に寄与し、出生後も生存可能な異種間キメラ形成が可能であった。また注入された多能性幹細胞が異種の環境においても正常に胚発生を経て全身の機能的な細胞に分化できることも示された。

以上 2 つの知見を組み合わせ、ラット iPS 細胞を *Sall1* KO マウスおよび *Pdx1* KO マウスの胚盤胞に注入することで異種間胚盤胞補完法を介してラットの腎臓および膵臓を作出しようと試みた。その結果、*Pdx1* KO マウスにおいてラット iPS 細胞の寄与が認められた場合、一様に EGFP 蛍光を示すラット iPS 細胞由来の膵臓を作成することに成功し

た。一方で、*Salliko* マウスにおいては、ラット iPS 細胞の寄与が認められ異種間キメラが成立しているにもかかわらず *Salliko* マウスには腎実質が存在せず尿管のみしか見られなかった。

以上より、論文提出者が主体となり、最終的に異種の体内を使って胚盤胞補完法により臓器を作出するという原理を証明することに成功した。この成果は将来的なヒト多能性幹細胞由来の臓器作出に向けた重要な足がかりとなる研究で、博士（生命科学）の学位を授与できると認められる。