

第5回「多能性幹細胞等からのヒト胚に類似した構造の作成等に関する検討」に係る作業部会
議事概要

日 時：令和5年12月18日（月）13：01～14：57

場 所：Web会議

出席者： 構成員【別紙】

オブザーバー

関係省庁（厚生労働省、文部科学省、こども家庭庁）

生命倫理専門調査会事務局（以下事務局）

議 事：1. 開 会

2. 議 題

1. 第4回「多能性幹細胞等からのヒト胚に類似した構造の作成等に関する検討」に係る作業部会議事概要（案）
2. ご講演「ナীব型ヒト多能性幹細胞による非統合胚モデルを用いて着床前から原腸陥入初期までのヒト初期発生を再現」
京都大学iPS細胞研究所准教授 高島康弘構成員
3. 多能性幹細胞等からのヒト胚に類似した構造の作成等に関する検討について
4. その他

3. 閉 会

（配布資料）

資料1 第4回「多能性幹細胞等からのヒト胚に類似した構造の作成等に関する検討」に係る作業部会議事概要（案）

資料2 作業部会からの報告書案

高島構成員より「ナীব型ヒト多能性幹細胞による非統合胚モデルを用いて着床前から原腸陥入初期までのヒト初期発生を再現」

午後1時01分 開会

○座長 それでは、定刻となりましたので、ただいまから第5回「多能性幹細胞等からのヒト胚に類似した構造の作成等に関する検討」に係る作業部会を開催いたします。

構成員の皆様には御多忙の折にもかかわらず御参集いただき誠にありがとうございます。

まずは本日の出席状況の報告を事務局からお願いします。

○事務局 事務局でございます。

本日の会議の構成員の御出席の状況を御報告いたします。

本日の会議には構成員10名、オブザーバー皆様御出席となっております。

続きまして、オンライン会議システムについて御説明をさせていただきます。

今回より Teams 会議システムを使用することとなりました。参加の皆様が御発言、御発表など可能となっておりますが、ウェビナーで開催していた際と同様に構成員を優先とさせていただきます。オブザーバー、関係省庁の方々には御理解、御協力を頂ければ幸いです。

御発言をされる際は挙手ボタンを押していただきますと座長から順番に指名をさせていただきます。ミュートを解除して御発言をお願いいたします。モニター越しに挙手いただいても結構でございます。

○座長 ありがとうございます。

引き続き事務局から本日の配布資料の説明をお願いいたします。

○事務局 事務局でございます。

配布資料の確認をさせていただきます。

資料1、第4回の議事概要案です。

資料2、こちらは作業部会からの報告案ですが、先ほど直前になって大変恐縮ですが、オブザーバーを含め皆様にお送りさせていただきました。これは生倫調への報告書案ということで、先週12月14日に事務局から構成員の先生方にまず配布をさせていただきました。これは構成員の先生方からこの案について御意見を頂きたいという趣旨のメールを付してお送りしたのになっております。

オブザーバーの皆様方には先ほどお送りしましたが、本日はこれを画面に映しながら先生方から御意見を頂き、内容を検討、更新していきたいと考えております。

以前お願いしましたように、年明け2回目の144回の生倫調を3月に予定しておりますが、ここで作業部会からの報告としてこちらの報告書案を完成させて上げたいと事務局としては考

えておりますので、先生方年末のお忙しいところお時間頂き恐縮ですけれども、どうぞよろしくお願いたします。なお、作業部会は年明けにもう2回ありますが、その会合にはこだわらずメールベースで是非ともこの報告書の完成に向けて御尽力賜りたくお願いする次第でございます。

○座長 それでは、議題2に進めます。

議題2、ナイーブ型ヒト多能性幹細胞による非統合胚モデルを用いて着床前から原腸陥入初期までのヒト初期発生を再現、皆様御存じのように構成員らのグループの論文がつい最近ですけれども、Natureに掲載されました。それについて御説明、御講演いただくことになっております。よろしくお願いたします。

○発表者 御紹介いただいた私たちの非統合胚モデルに関しまして報告させていただきます。

この研究での報告のポイントなんですけれども、ナイーブ型のヒト多能性幹細胞を用いまして着床前の原始内胚葉へ誘導する方法を開発しております。

それから、誘導した原始内胚葉とエピブラストの2種類の細胞を利用しまして、二層性胚盤様に類似の構造をつくることに成功しました。この構造に更に栄養膜細胞というものを加えることで非統合胚のモデルになりますけれども、作成し、発生させたところ、前後軸の形成や着床後に見られる特定の細胞群への分化などを再現することができました。

このモデルを用いて着床前から始まる着床期の発生を進めるメカニズムの一端を解明できたということが本研究の骨子となっています。

いろいろ同じような論文が出ていますけれども、基本は下線を引いていますけれども、着床前から着床後までを一気通貫して見れるシステムが私たちの特徴になるかと思います。実際の報告に関してはメディアの方にも取り上げていただき、特に朝日新聞の方では内閣府での会議自体も取り上げて、ヒト胚モデルに関する内容も踏み込んだようなコメントを頂いて、コメントを頂いておりました。

内容に入っていきますけれども、これは受精卵から始まって発生が続いていく図に関してなんですけれども、既に御承知のことと思いますけれども、もう一度話しますと、胚盤胞の内部細胞塊、ここの部分からエピブラストと原始内胚葉が出てくると、下図で説明しますとまず桑実胚から栄養外胚葉と内部細胞塊に分かれて、内部細胞塊からエピブラストと原始内胚葉に分かれていく。もともと栄養外胚葉へ誘導するような報告はしてございまして、原始内胚葉を誘導するというを今回行っております。

と申しますのも、緑色の原始内胚葉とエピブラストが合わさって発生が進んでいきます。こ

の緑色の原始内胚葉というここにありますけれども、またエピブラストというのはちょうど極性を持って発生をしていって、この中真腔に羊膜腔というのがあるんですけれども、それがだんだん開いていくと、原始内胚葉とエピブラストの間に基底膜ができてくる。その後羊膜が大きくなると同時に中胚葉系のものででき、最終的に原腸陥入に至っていくという流れになります。これを解明するために私たちは今回のモデルをつくり報告することができました。

この会で議論していますように、ヒト胚の発生というのはなかなか分かりにくいので、倫理的な問題もありなかなか研究ができないところを幹細胞を使って研究するというのを私自身行ってきました。今まで、統合胚のモデルとしては、本作業部会の構成員やオーストリアの香川さんがBlastoidというのを報告しておられます。同時に今年になりまして、1つはJacob Hannaのグループ、それからもう一つはMagdalena Zernicka-Goetzのグループからそれぞれ統合胚モデルとして着床後の胚全体の発生を再現するものというものが報告されました。

それに対しまして非統合胚モデルということで、胚としては、全ての細胞種はそろってないモデルだけれども、生命発生の一部を再現できるということで、P A S Eモデルというモデル（Jianping Fuたちのグループ）であったりとかgastruloidと呼ばれるようなもの、あるいは今回同時期に報告されましたh E Eモデルという原始内胚葉とエピブラストを合わせるもの、あるいはPeri-gastruloids、これも同じように原始内胚葉とエピブラストを合わせるものというのが報告されております。

これらの報告においては、Blastoidとして、基本着床前を中心としており、着床させて少し発生させるというのがありますけれども、現状では着床前のブラストシストを中心としており、着床後まで正確に発生させることは困難でした。それに対しまして、今年出た統合胚モデルというのは、今度は着床後から始まっておりまして、着床前からの発生を一連の流れとして研究するというのとはできないモデルでした。

それから、非統合胚モデルとして報告されたものは、基本的には着床後のみです。本年度のNature誌に報告されたものに関しましても着床後からスタートするものになっております。私たち自身は着床前から原腸陥入期までを一気に見れるものをつくりたいということで、こういうモデルを報告した成果はないという状況でした。

この目的のために、着床前から観察するために私たちが利用したのはヒトのナイーブ型多能性幹細胞という細胞です。ナイーブ型というのは、現行のプライム型とは形も非常に違うんですけれども、プライム型からナイーブ型にリセットするということができるということ、あるいはヒト胚からもナイーブ型がつかれるということは現在には分かっております、ナイーブ型

の多能性幹細胞を使用して今回のモデルづくりを行っております。

まず、ナイーブ型ができることによって可能になったこととしまして明らかな成果は、ヒトのBlastoid、着床前の胚モデルをつくるということが可能になったことです。

その他、私たちの方では着床前のちょうど周りを取り囲むような栄養膜細胞、栄養外胚葉を直接的に誘導するということができる。それも着床前のものができるということは既に報告しております。

まず、着床前胚の原始内胚葉を特異的かつ効率的に分化誘導できる方法を探しました。ナイーブ型の多能性幹細胞から原始内胚葉を誘導した後に、誘導した原始内胚葉とナイーブ型の多能性幹細胞、あるいは既に報告した栄養外胚葉細胞というのを利用することでヒト胚モデルをつくるというのが私たちのストラテジーになります。

もともとマウスのES細胞で報告されていたような方法で原始内胚葉系列への誘導を行いました。具体的にはこのGATA6という遺伝子を導入することで、効率的に原始内胚葉を誘導することに成功いたしました。

続いて、遺伝子の過剰発現で誘導できたので、今度はタンパク質、あるいは培地の中に阻害剤を入れることで誘導できないかということを試したところ、7つのシグナルを入れることで着床前胚の原始内胚葉を効率的に誘導できるということも見いだしました。

実際に自分たちが誘導した原始内胚葉の細胞がヒト胚にどれくらい近いかということが重要で、ヒト胚との比較というのが必要になります。ヒト胚との比較をした図が右の図になります。赤い色はより相関が高い、青い色ほど相関が低くなることを示しています。もともとのナイーブ型というのは着床前のエピブラストに非常に高い相関があります。それに対しまして、原始内胚葉を誘導するとGATA6過剰発現であれ、7因子化合物であれどちらにしても原始内胚葉に非常に相関の高いような細胞ができました。

これで原始内胚葉ができたので、次は3次元のモデルをつくっていくということに移っていきます。

ナイーブ型多能性幹細胞にGATA6を誘導できるような遺伝子を細工しまして誘導したものの、この緑色にマークしていますけれども、ナイーブ型の多能性幹細胞と混ぜ合わせます。ゼロ日目というのはこんな感じで赤色と緑色が非常に混じり合った状態状態で存在しております。それにドキシサイクリンを加えてGATA6を過剰発現させると、先ほどお話ししたように原始内胚葉に分化していきます。そうしますと緑の細胞、原始内胚葉の細胞がアグリゲーションの中の細胞の集合塊の外側に移動していくんですね。こういうような形になると、これはちょ

うどエピブラストの周りに原始内胚葉を裏打ちするような形になってきた状態です。

更に培養を続けると羊膜腔が空いてくるんですけども、ちょうどここにPAR6というタンパク質が中心に集積してきており、着床前からヒト胚発生を再現できるようなモデルというのを開発ができたと考えております。

それから、ここでお示ししますのは、今つくったモデルというのはちょうどエピブラストと原始内胚葉のこの2つからできているんですけども、先ほどの胚というのは実際には周りに栄養膜細胞というのが存在しています。それがあることとないことでどういう差があるのかというのを解析するためにこのようなモデルを私たちはつくりました。

これはトランズウェルと言われるメンブレンなんですけれども、この上に細胞を培養すると、細胞から分泌される因子が出てくるんですけども、栄養膜細胞はパイラミノイドモデルとは隔てて培養できます。つまり胚と全く同じような構造を取ることなく、ちょっと離れた位置から栄養膜の役割というのを見ることができます。

このような分けて培養することで何が起こったかと申しますと、栄養膜細胞、nTBというふうに略していますけれども、nTBを加えるとこのような形で非常に大きな腔ができるんです。つまり漫画で示しますように、もともとnTBがなくとも羊膜腔できるんですけども、nTBを加えることでより大きな羊膜腔ができるということが分かりました。

さらにメカニズム解析をしているんですけども、この中で一つ分かったことは、栄養膜細胞からIL6と呼ばれる分泌因子、タンパク質を分泌しておりまして、IL6という遺伝子を破壊した栄養膜細胞と培養するとどうなるかということ、もともとあったようなトロホブラストで出てきた羊膜腔というのは非常に小さくなってしまふということが分かりました。つまりモデルを用いることでトロホブラストから分泌されるIL6というのが働くことで羊膜腔をつくっていくというヒト発生のメカニズムの一端というのを解明することに成功しております。

同様に私たちのモデルにおいて、ばらばらに培養しているということで遺伝子の改変ということができます。ヒト胚で遺伝子の改変って結構大変なところになるんですけども、幹細胞レベルで改変することは非常に簡単です。

例えばこれも基底膜を見ようとしたものなんですけれども、エピブラストの細胞と周りに原始内胚葉の細胞が取り囲んでいるんですけども、原始内胚葉の細胞が基底膜をつくっているということで、実際に原始内胚葉の細胞から基底膜に関連するLaminB1という遺伝子をノックアウト、破壊してしまうとどうなるかということ、元あったようなモデルというのは全くできなくなってしまうということが分かりました。つまりハイポブラスト、栄養外胚葉という

のがエピブラストを支えるような形でエピブラストの発生を進めていて、このような極性というのは消失してしまうということが分かりました。

ほかに6日目のモデルの中で分かってきたこととしまして、もともとエピブラストって均一な細胞集団なんですけど、エピブラストの一部が羊膜というものに変化していく、分化していくということが分かりました。あるいはエピブラストの一部から中胚葉が出てきて原腸陥入を起こしていくんですけども、中胚葉が出てくるのを原始内胚葉がコントロールしている。つまり原始内胚葉サイドからある種の分泌因子が出て、分泌因子が出ていないところが中胚葉になる。前方化、後方化と呼ばれますけれども、原始内胚葉の細胞はこのモデルの中で実際にヒトの原始内胚葉でも前方化シグナルを出して後方側から中胚葉が出てくるということもこのモデルを解析することで理解できました。

これらは今までのヒト胚の発生ではなかなか胚だけを見ても分からないものがモデルを利用することで明らかになった例であります。特に遺伝子改変というのはヒト胚するのはかなり困難ですので、これがいとも簡単にできるというのはかなり大きいことかなというふうに考えております。

また、これは6日目までの培養なんですけれども、9日目まで培養するとどうなるかというところから生殖細胞が出てきたりとか、あるいは血管内皮の前駆細胞のようなものも出てくるということが分かりました。

それから、ヒト胚の初期発生をモデルを用いることでよりメカニスティックに明らかにできるということ、それから同時に着床後、特に原腸陥入期に出てくるような細胞というのがこのモデルの中にも出てくるということが分かりました。これは遺伝子発現のシングルセルレベルで解析するというところをしていますが、このモデルの中にはここに示しますような様々な細胞が出現してきているということが分かりました。

研究のまとめに入りますけれども、まず1つは原始内胚葉の細胞、特に強調したいのは着床前の原始内胚葉細胞というものをナイーブ型のヒト多能性幹細胞を利用することで誘導できることが分かりました。また、これらを混ぜ合わせることでヒトの初期発生というのを非常に模倣したようなモデルを効率的につくることができました。

今後の発展として私自身が考えていることですが、1つはこのモデルができましたので、ヒト着床期の発生メカニズムというのがより明らかになっていくだろうというふうに考えておりますし、さらにこれは将来的なものとして一步一步着実に進めていく必要がありますけれども、組織や臓器というのをこのモデルの中でつくっていけないかなというふうに考えてお

ります。

これは最初のスライドと繰り返しになるので、省略しますが、このあたりが私たちの今回の研究のポイントになります。

最後に着床期の胚モデルというのは今年になって何報か報告があります。その違いがどこなのかというのをまとめた図がこちらになります。

ちょっと英語になって申し訳ないんですけども、モデルとして報告されているのが私たちのものを入れて5報、先週にももう一報出てきていますので、6報出たことになります。

元となる細胞というのが私たちとほかのグループでは大きく違います。最初の2つのグループというのはRSeT™で培養された多能性幹細胞を利用しております。もともとナイーブ型と呼ばれていましたけれども、最近の論文の中ではintermediateというふうに使われていて、これはほかの論文で報告された結果をお示ししているんですけども、大体発生期の10日目ぐらいに合致するというふうに使われています。

もう一つはEPSCと呼ばれる細胞ですけども、これもほかの論文検証したところ、もともとナイーブ型であったり初期であるというふうに使われていたんですが、10日目ぐらいということで着床後付近になる細胞であるというふうに使っております。

もう一つは、これはHENSMという培地でイスラエルのJacob Hannaたちのグループですけども、これはほかのグループが検証しておりませんので、合致する時期は不明というふうに使わせていただいております。

私たちが使っているのは2つの培養法でt2iLGO、あるいはPXGLと呼ばれる培地で培養しておりますけれども、E5相当、プラスシスト、胚盤胞ぐらいのステージというふうに使っておりますし、実際にそのようにほかのグループが検証しております。

ここから分かることというのは、再三申していますようにこれらのモデルというのはほかのグループのモデル、基本着床後になっております。Jacob Hannaも論文の中でポストインプラントーションから始まるモデルですよということを記載しております。一方私たちのところは着床前から誘導しているということ、それから今回誘導するのに用いている細胞というのがいろいろあります。統合胚モデルになるような2つであったりとか、あるいは非統合胚系のものであるというのが3報あるかなというふうに使っています。

また、培養日数を見ますと、大体11日目ぐらいというのをこのグループ、Magdalenaのグループは言っていますけれども、実際E10に合致する細胞から始まって11日目というのと14日ルールを超えてしまっているじゃないかということになるかと思うんですけども、実際は

そこまでもいっていないということで、培養日数と発生のステージというのは必ずしも一致するものではないというのがお分かりいただけると思います。ここも6日ぐらい培養しますけれども、10日から始まると16日になってしまっているけれども、そこまでも実際は発生していないということがあったりするかなというふうに、自分たちのグループに比べかなり長い間培養しており、20日以上過ぎています。

私たちの胚モデルに関しましては基本6日まで培養し、観察しておりますけれども、最大9日ぐらいまで培養を延ばしました。出発点のナイーブ型が5日相当であることから、2週間程度でちょうど原腸陥入期ぐらいのものが見えているということで、より生理的な日数での発生という面でも私たちのモデルというのは結構ヒト発生の真似をしているモデルではないかなというふうに考えております。

以上になりますけれども、私たちの研究はこれらのいろいろな方々の御指導の下にできた研究になります。

以上です。

ありがとうございます。

○座長 どうもありがとうございました。

バイラミノイドモデルバイラミノイドモデルの有用性をいかに発揮したご研究かなと思えました。非常に簡潔に分かりやすく説明していただきましてありがとうございます。

議題3. 多能性幹細胞等からのヒト胚に類似した構造の作成等に関する検討について

資料2 作業部会からの報告書を検討・作成。

○事務局 本日も長時間にわたり御議論いただきありがとうございました。

次回第6回作業部会でございますが、年明け1月18日木曜日、2時から先生方のお時間を頂いておりますので、よろしく願いいたします。

次に、座長から御発言、御説明があると思います。

お願いします。

○座長 18日はもう一度繰り返しになりますけれども、ここで大分御意見頂いたので、それを反映する形で報告案を作成していきたいというのと、最後に積み残し的になっております管理指針、規制の枠組みについてちょっと話していきたいと、最終的には3月の生命倫理調査会との合同委員会、そこで提示をしていきたいんですけれども、あとは1月の話の結果次第です

かね。

○事務局　そうです。

○座長　では、本日の第5回作業部会をこれで終了したいと思います。

皆さん、どうもありがとうございました。

閉会

【別紙】

「多能性幹細胞等からのヒト胚に類似した構造の作成等に関する検討」に係る作業部会
(構成員：10名)

座長 阿久津 英憲 国立成育医療研究センター研究所再生医療センター長

井上 悠輔 東京大学医科学研究所准教授

加藤 和人 大阪大学大学院医学系研究科教授

神里 彩子 東京大学医科学研究所准教授

小林 俊寛 東京大学医科学研究所特任准教授

斎藤 通紀 京都大学高等研究院教授

高島 康弘 京都大学iPS細胞研究所准教授

藤田 みさお 京都大学iPS細胞研究所特定教授

柳田 絢加 東京大学大学院農学生命科学研究科助教

吉田 松生 自然科学研究機構基礎生物学研究所教授