

令和6年2月29日(木)17:00-19:00
日本医師会
「先端的な医科学技術がもつ生命倫理の課題」

多能性幹細胞からヒト胚に類似した構造を誘導する研究の 最新知見と展望

高島 康弘

京都大学 CiRA
未来生命科学開拓部門



自己紹介

1998年 神戸大学医学部卒業

1998年 神戸大学医学部附属病院 第二内科
春日雅人先生（国立国際医療研究センター元理事長・総長）

1999年 西脇市立西脇病院内科

2001年 神戸大学医学系研究科大学院・理研 神戸 CDB
西川伸一先生：マウスES細胞の分化研究

2006年 理研 CDB ヒトES細胞の研究

2007年 ケンブリッジ大学
Austin Smith先生：ナীব型ヒトES/iPS細胞に関わる研究

2015年 京都大学 CiRA ヒトES/iPS細胞を用いたヒト初期発生の研究

多能性幹細胞(ES/iPS細胞)の歴史

1960-70年代 胚性癌細胞 (EC細胞) 研究の発展

- 奇形癌腫細胞株の樹立 (テラトカルシノーマ、生殖細胞に由来)

1970年 マウス初期胚はEC細胞と同様の能力を持つ

- マウス皮下に移植すると、奇形 (癌) 腫を作った

1981年 マウス初期胚からES細胞が報告される

- マウスと発生工学・分子生物学を利用した研究が進歩
- マウスES細胞を用いた試験管内発生モデル

1998年 ヒトES細胞が報告される

- ヒトES細胞を利用した再生医療
- ヒトES細胞を利用した試験管内発生モデル

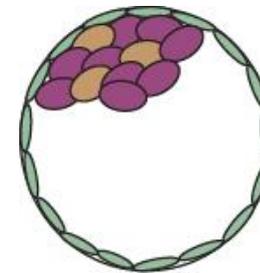
2006年 マウスiPS細胞が報告される

2007年 ヒトiPS細胞が報告される

- ヒト胚に由来するという倫理的問題が消失

2014年 ナイーブ型ヒトES/iPS細胞の樹立

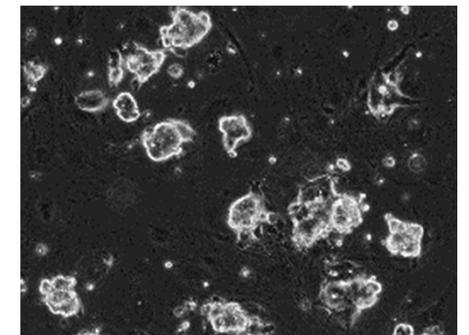
- 着床前胚からはじまる発生を解析できるようになる



Primed 型



Naïve 型



胚盤胞とES細胞(マーマセット)

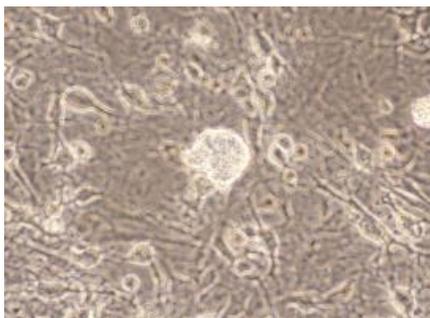
マーマセット胚



胚盤胞

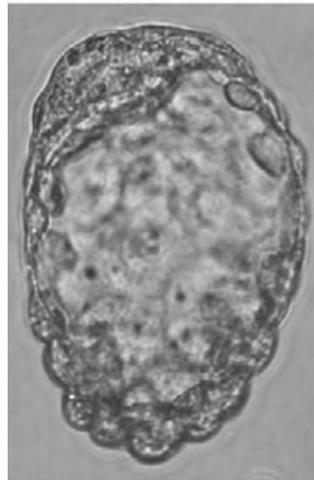


胚盤胞



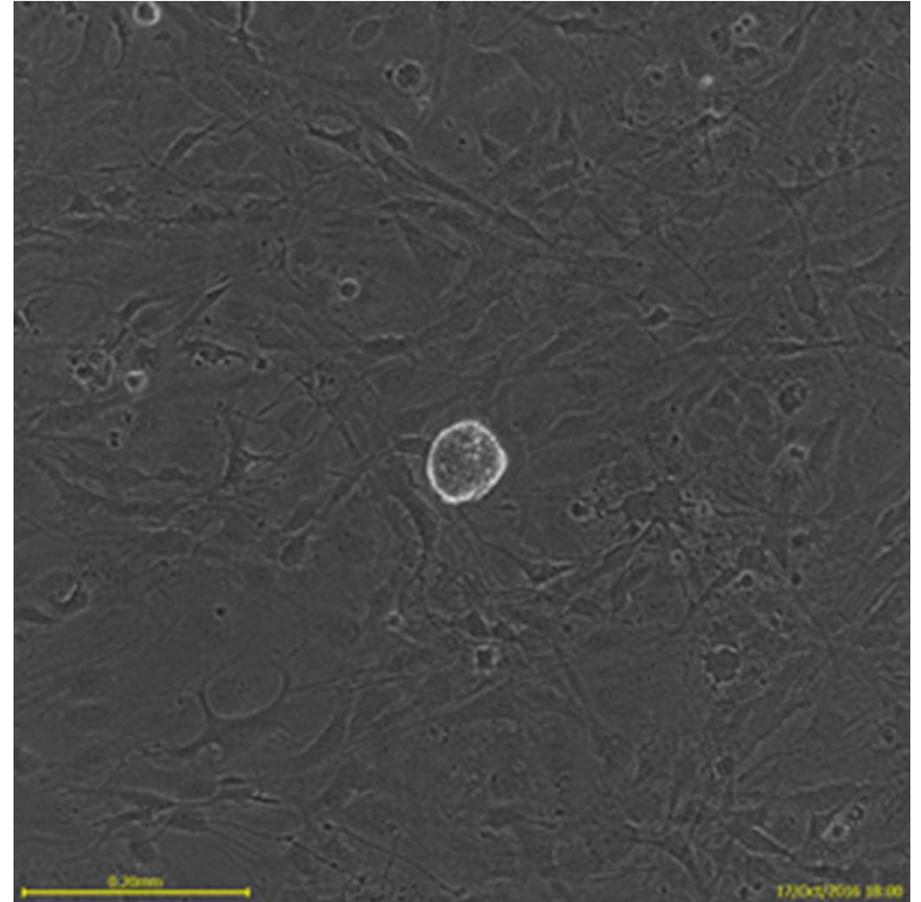
エピブラスト

マウス胚盤胞



(Nichols et al., 2009)

マーマセットES細胞の樹立過程



「幹細胞を用いて、ヒト初期発生を試験管内で三次元構築する」

日本医療研究開発機構(AMED)

令和元年度-令和3年度

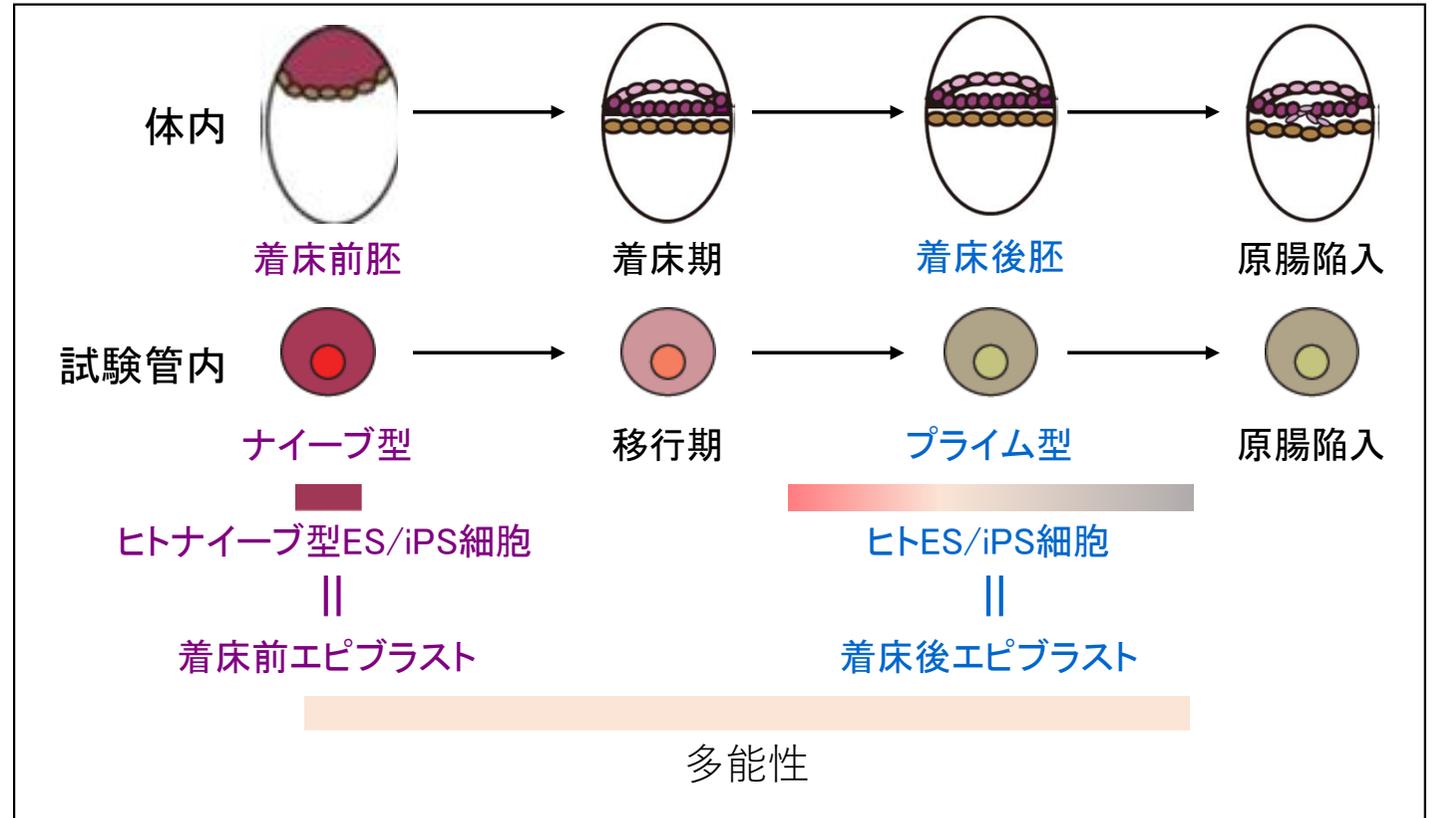
「再生医療実現拠点ネットワークプログラム（幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム）」

令和3年年度－令和9年度

革新的先端研究開発支援事業

AMED-CREST

「健康・医療の向上に向けた早期ライフステージにおける生命現象の解明」



ヒト初期発生を模倣した革新的な試験管内における胚モデルを確立する。モデルを用いて、ヒト初期発生の生命現象を理解し、基盤となる分子メカニズムを解明することを目指す。網羅的遺伝子発現・エピゲノムを解析し、早期ライフの細胞アトラスを作成し、着床不全や流産、発生異常といった疾患を理解するための基盤を作る。新たな生命科学分野であるため、生命倫理に関する規制調査も行う。

なぜヒトの初期発生を研究する必要があるのか

現状・問題点：臨床的側面

- ・ 着床不全、流産
IVF/ICSIを利用した研究において、着床するのは約50%、そのうち妊娠継続できるのは50%とする研究報告もある(C. M. Boomsma et al. Hum Reprod 2009 Vol. 24 Issue 6 Pages 1427-35)。
- ・ 器官形成期における妊婦と薬剤
薬剤が催奇形性を起こす多くの原因は不明。

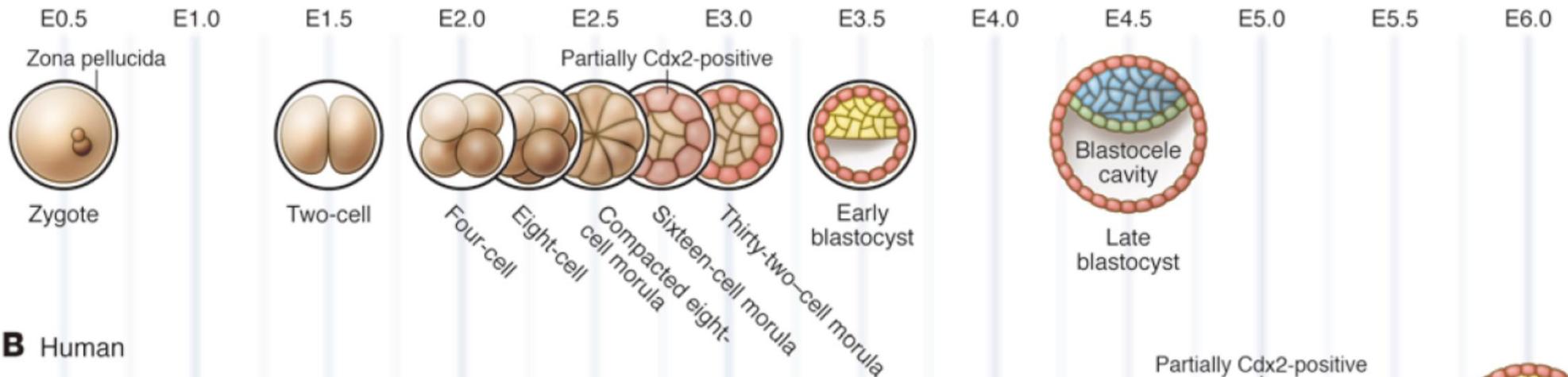
なぜヒトの初期発生を研究する必要があるのか

現状・問題点：基礎研究的側面

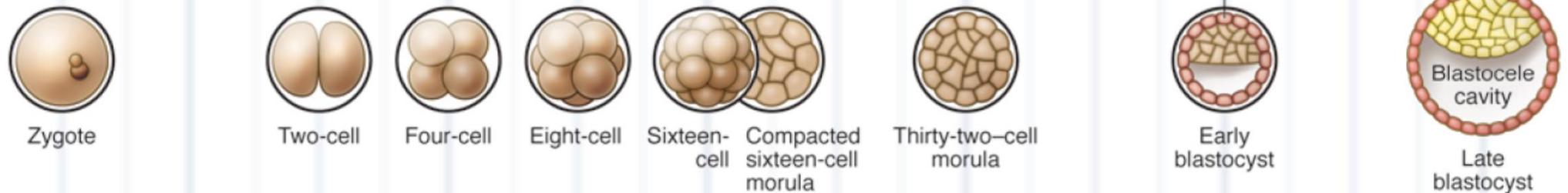
- iPS細胞を用いて再生医療を目指しているが、ヒト初期発生は明らかではない
- ヒト胚の子宮着床後の発生はほぼ未解明
 - 受精後約14日(妊娠4週)以前は妊娠しているかも不明
- 妊娠が分かったとしても着床後ヒト胚の解析は困難である

マウスとヒト胚の発生比較1

A Mouse

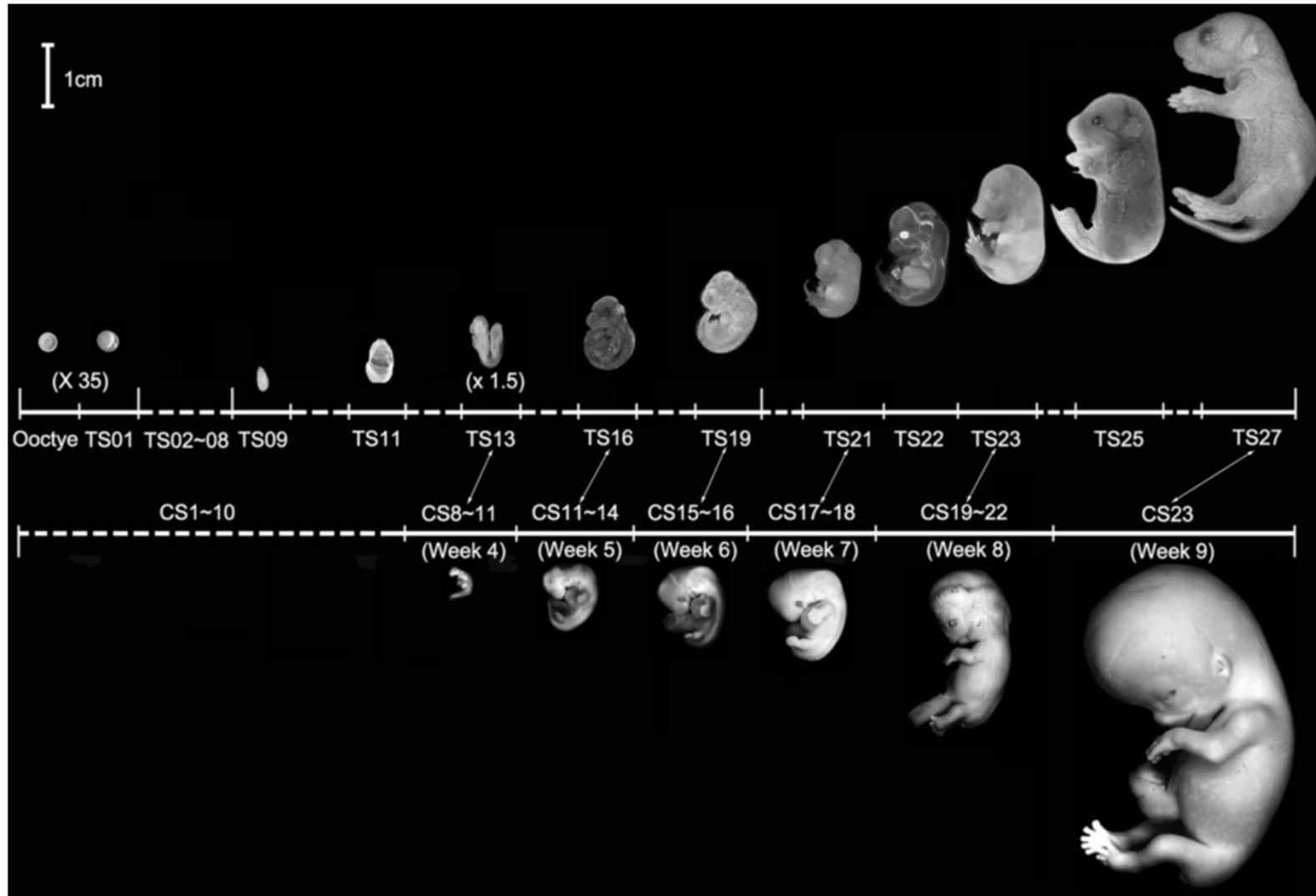


B Human



● Cdx2-positive TE cell
 ● Oct4-positive ICM cell
 ● Nanog- and Oct4-positive EPI cell
 ● Gata6- and Oct4-positive PE cell

マウスとヒト胚の発生比較2



Xue et al. BMC
Genomics 2013,
14:568

ヒト初期発生研究に関する近年の報告

- scRNA-seqによる受精卵-ヒト胚(着床直後)の解析

Yan et al., Nature Structural & Molecular Biology, 2013

Blakeley et al., Development, 2015

Petropoulos et al., Cell, 2016

Tyser et al., Nature 2021

マウスとヒトの遺伝子発現は、完全に一致するわけではなく、ヒトでの解析も重要

- 試験管内で胚を発生させる研究

Bedzhov et al., Nature Protocols, 2014

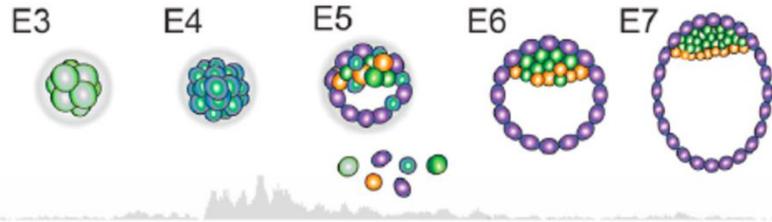
Deglincerti et al., Nature, 2016

Xiang et al., Nature, 2020

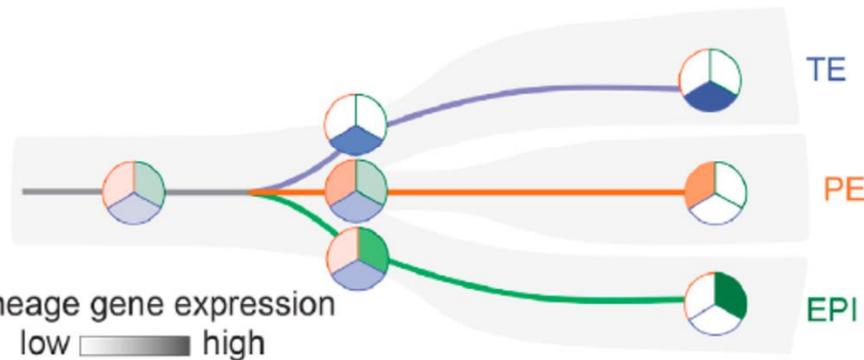
胚を子宮に着床させることなく試験管内で発生させる。しかしながらヒト胚の使用は倫理的にも限定。

ヒト胎児を利用した研究報告1: 着床前胚scRNA-seq

1529 single-cell RNA-seq libraries from 88 human embryos



Initial co-expression and concurrent lineage formation



X-chromosome dosage compensation



Resource

Cell

Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos

Authors

Sophie Petropoulos, Daniel Edsgård, Björn Reinius, ..., Sten Linnarsson, Rickard Sandberg, Fredrik Lanner

Correspondence

rickard.sandberg@ki.se (R.S.), fredrik.lanner@ki.se (F.L.)

In Brief

A comprehensive transcriptional map of human preimplantation development reveals a concurrent establishment of trophoblast, epiblast, and primitive endoderm lineages and unique features of X chromosome dosage compensation in human.

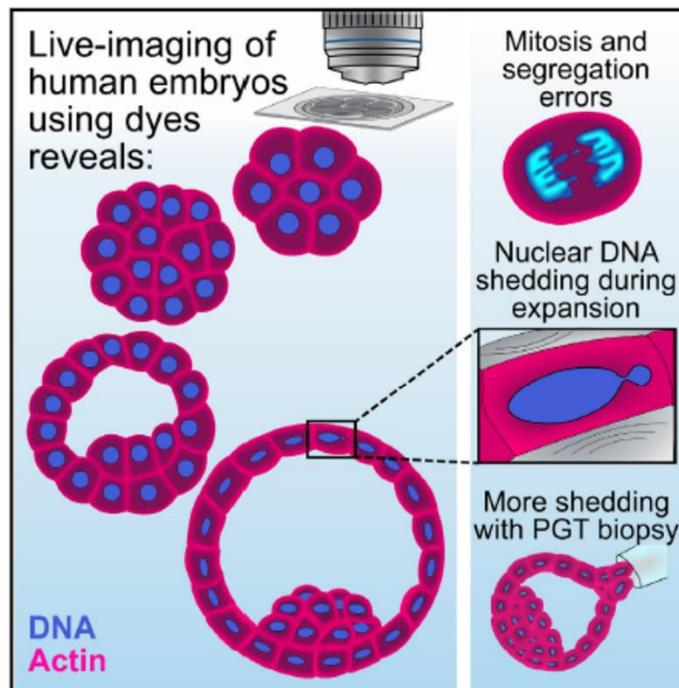
ヒト胎児を利用した研究報告2: 着床前胚Imaging

Cell

Article

Human embryo live imaging reveals nuclear DNA shedding during blastocyst expansion and biopsy

Graphical abstract



Authors

Ana Domingo-Muelas, Robin M. Skory, Adam A. Moverley, ..., Denny Sakkas, Carlos Simón, Nicolas Plachta

Correspondence

dsakkas@bostonivf.com (D.S.), carlos.simon@uv.es (C.S.), nicolas.plachta@pennmedicine.upenn.edu (N.P.)

In brief

Live imaging of human embryos unveils differences from mouse development and reveals DNA shedding from trophoctoderm cell nuclei associated with mechanical stress from blastocyst expansion and biopsy for preimplantation genetic testing.

Domingo-Muelas et al., 2023, Cell 186, 3166–3181
July 20, 2023 © 2023 Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.06.003>

ヒト胎児を利用した研究報告3: 着床後胚NGS解析

Lineage tracing of human development through somatic mutations

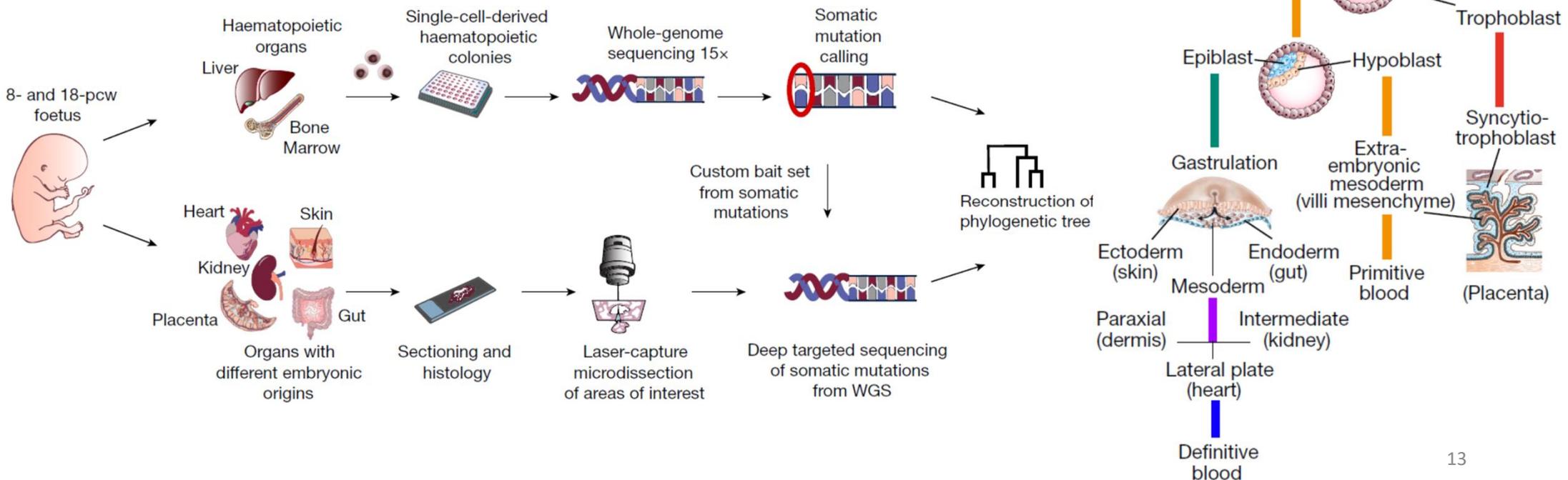
Michael Spencer Chapman^{1,2,3,8}, Anna Maria Ranzoni^{1,4,5,8}, Brynelle Myers^{1,4,5}, Nicholas Williams¹, Tim H. H. Coorens¹, Emily Mitchell^{1,3,4}, Timothy Butler¹, Kevin J. Dawson¹, Yvette Hooks¹, Luiza Moore^{1,6}, Jyoti Nangalia^{1,4,5}, Philip S. Robinson^{1,7}, Kenichi Yoshida¹, Elizabeth Hook⁶, Peter J. Campbell^{1,4,9} & Ana Cvejic^{1,4,5,9}

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03548-6>

Received: 29 May 2020

Accepted: 13 April 2021

Published online: 12 May 2021



ヒト胎児を利用した研究報告4: 着床後胚scRNA-seq

Single-cell transcriptomic characterization of a gastrulating human embryo

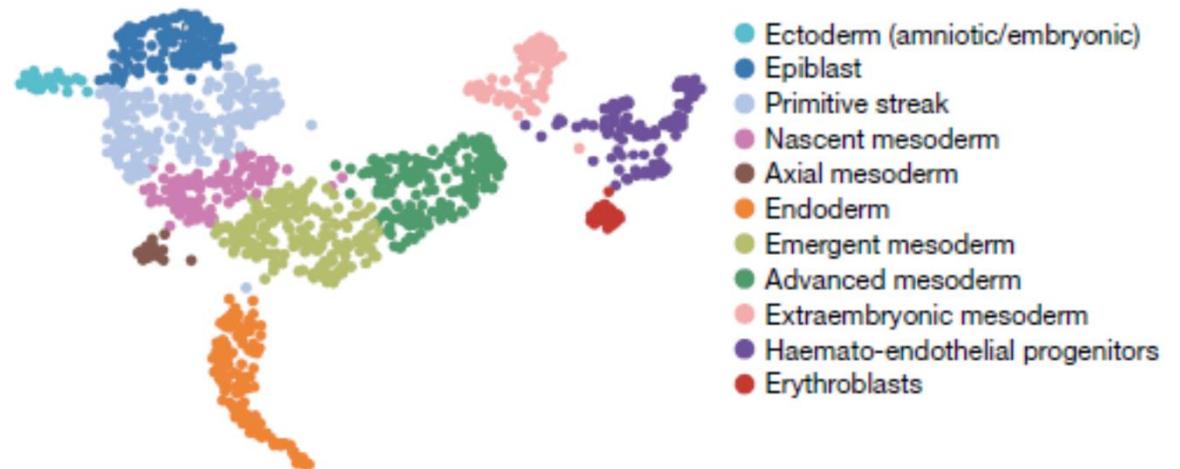
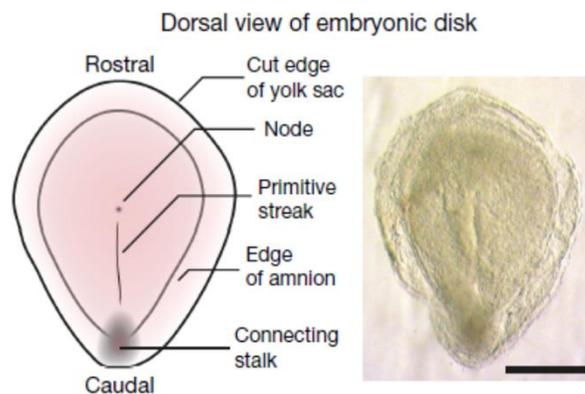
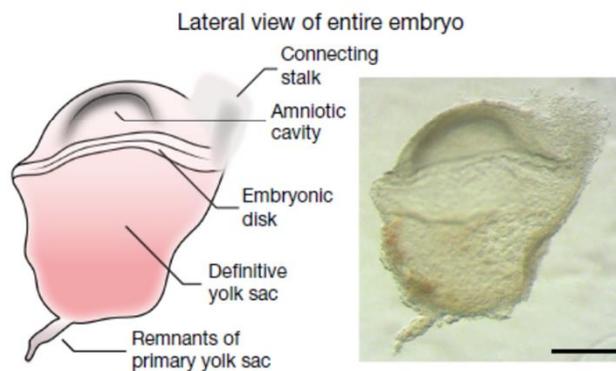
Richard C. V. Tyser^{1,6}, Elmir Mahammadov^{2,3,4,6}, Shota Nakanoh⁵, Ludovic Vallier⁵, Antonio Scialdone^{2,3,4,7} & Shankar Srinivas^{1,7}

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04158-y>

Received: 28 July 2020

Accepted: 5 October 2021

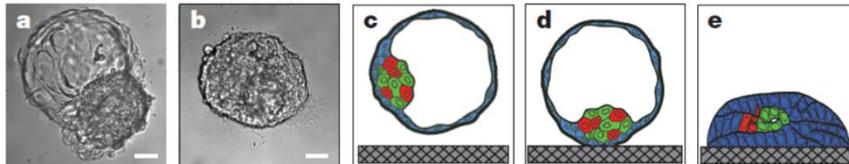
Published online: 17 November 2021



ヒト胎児を利用した研究報告5: ヒト胚長期培養

Self-organization of the *in vitro* attached human embryo

Alessia Deglincerti^{1*}, Gist F. Croft^{1*}, Lauren N. Pietila¹, Magdalena Zernicka-Goetz², Eric D. Siggia³ & Ali H. Brivanlou¹



12 MAY 2016 | VOL 533 | NATURE

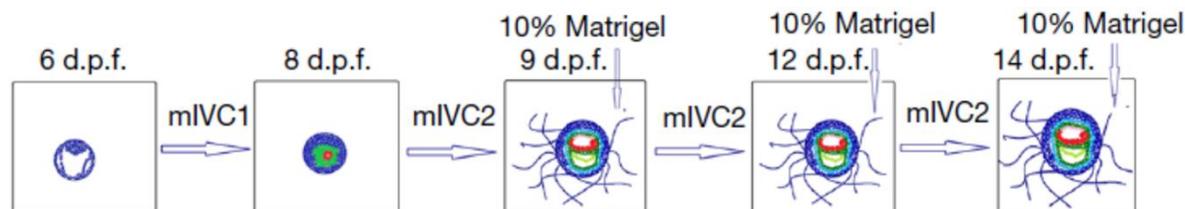
A developmental landscape of 3D-cultured human pre-gastrulation embryos

<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1875-y>

Received: 24 December 2018

Accepted: 5 December 2019

Lifeng Xiang^{1,2,3,4,7}, Yu Yin^{1,3,4,7}, Yun Zheng^{1,4,5,7}, Yanping Ma^{2,7}, Yonggang Li^{2,7}, Zhigang Zhao¹, Junqiang Guo^{1,5}, Zongyong Ai^{1,4}, Yuyu Niu^{1,4}, Kui Duan^{1,4}, Jingjing He^{1,4}, Shuchao Ren¹, Dan Wu¹, Yun Bai², Zhouchun Shang⁶, Xi Dai⁶, Weizhi Ji^{1,4*} & Tianqing Li^{1,4*}



ヒト胎児を利用した研究の限界と幹細胞モデル

ヒト胎児を用いた研究の限界

- ヒト胚(余剰胚)を利用した研究はリソースや倫理面からの制限がある。
 - 世界的な流れとして、ヒト検体（胎児）を使った研究は急増している
 - 日本ではほぼ研究できていない
 - 日本の規制ではヒト胚は14日あるいは原始線条を越えての培養は禁止
- ヒト胚における遺伝子改変を行った機能的な研究の難しさ
(阿久津先生講演)

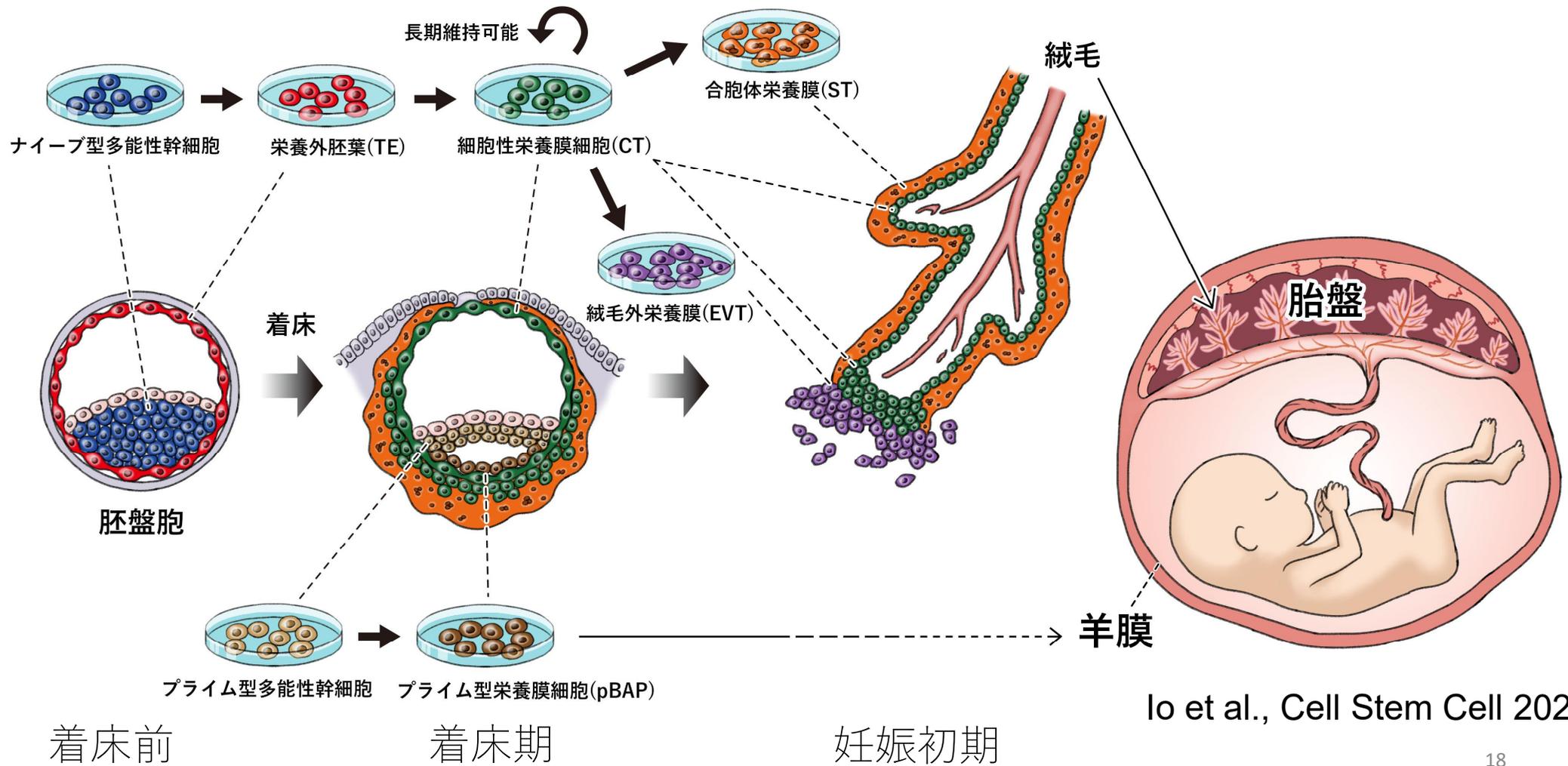
提案:ヒト胚を用いることなくヒト初期発生を解析

- 幹細胞を用いたヒト発生モデルの構築
 - 卵割期から着床後に至るES細胞ヒト胚モデル
 - 三次元複雑臓器の原基誘導

期待される成果

- ブラックボックスとされる着床期ヒト初期発生の解明
 - 受精後約14日(妊娠4週)以前は妊娠しているかも不明
 - 着床不全
- ヒトES/iPS細胞からの分化誘導方法の改良
 - 現状、ヒト初期発生を忠実に模倣できているのかは、不明
 - 患者さんの体の中でも機能的に働く分化細胞の誘導は困難(多くはパラクライン効果)
 - 移植医療を目指した複雑な臓器・器官を作製することは実現していない
- 原腸陥入期：細胞がダイナミックに移動し、器官・臓器の原基が形成
 - ヒト胚モデルを利用して、臓器・器官の原基を作製
 - 器官形成期は薬剤による催奇形性が知られるがヒトにおける詳細なメカニズムは不明：先天異常に関連する発生毒素因子（感染・薬剤・ホルモン等）・二分脊椎
- 不妊症に対するメカニズム・治療法の確立
 - 着床不全に対する治療法の開発

ナীব型ヒトES/iPS細胞を用いて胎盤細胞を作製



Io et al., Cell Stem Cell 2021

国際幹細胞学会の幹細胞を用いたガイドライン

| カテゴリー1 | カテゴリー2 | カテゴリー3 |
|--|--|--|
| <p>1A 専門的な監視プロセスによる審査が免除される</p> <ul style="list-style-type: none"> ・in vitroで実施されるほとんどの多能性幹細胞研究 ・in vitroで実施されるほとんどのオルガノイド研究 ・出生後の動物宿主へのヒト幹細胞の移植 | <p>2 専門的な監視プロセスによって審査される</p> <ul style="list-style-type: none"> ・in vitroでの研究のための胚、または胚を作るための配偶子の入手 ・ヒト胚からの細胞株の樹立 ・胚または配偶子の遺伝情報の改変 ・原始線条が形成されるまで、または受精後14日目までのいずれか早い方の期間、ヒト胚を研究のためにin vitroで培養 ・ヒト細胞を非ヒト胚に移植し、ヒト以外の動物の子宮での妊娠に利用 ・幹細胞由来の統合胚モデル ・MRTを施したヒト胚のヒト子宮への移植 | <p>3A 容認されない：現時点で安全ではない</p> <ul style="list-style-type: none"> ・子孫に遺伝するゲノム編集 ・ミトコンドリアDNAを改変した胚 (MRTを含まない) の子宮への移植 ・ヒト幹細胞から分化させた配偶子の生殖利用 <p>3B 容認されない：説得力のある科学的根拠を欠くか、倫理的に問題がある</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒト幹細胞由来の胚モデルの妊娠への利用 ・ヒト生殖クローニング ・ヒト生殖細胞が存在する可能性のあるヒト-動物キメラの交配 ・ヒト-動物キメラ胚のヒトや類人猿の子宮への移植 ・由来を問わず、ヒト胚の動物子宮への移植 |
| <p>1B 報告可能だが、通常は専門的な監視プロセスによる審査は行われない</p> <ul style="list-style-type: none"> ・幹細胞を用いた非統合胚モデル ・キメラ胚のin vitroでの培養 (ヒト細胞を非ヒト胚に移植すること) ・受精や胚の作成を伴わないin vitroでの配偶子の生成 | | |

カテゴリー2
専門的な倫理申請を要する

幹細胞を用いて完全なヒト胚モデルを製作する(ヒト胚を構成するすべての細胞を含む:統合胚)

ISSCR
Guidelines
for Stem Cell
Research and
Clinical Translation

Version 1.0, May 2021
www.isscr.org



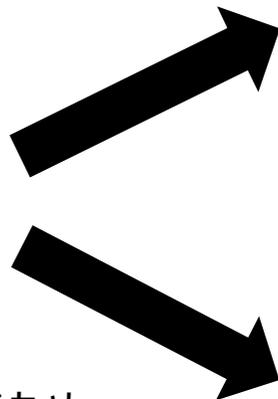
カテゴリー1B
一般的な研究申請を要する

幹細胞を用いた不完全なヒト胚モデルを製作(ヒト胚を構成するすべての細胞を含まない:非統合胚)

ES/iPS細胞由来ヒト胚モデルが注目されている



ES/iPS細胞
多能性幹細胞



多能性幹細胞から作製されるため
・大量に作製することができる
・倫理的な問題に縛られにくい

ヒト胚発生を研究するための
ツールとして注目されている

着床前から原腸嵌入期までを一気通貫
にモデル化した成果

統合胚モデル：胚全体の発生を再現

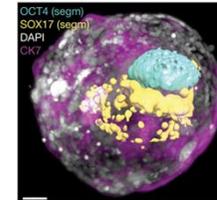
Blastoid



Yu *et al.* (Nature) 2021
Liu *et al.* (Nature) 2021
Yanagida *et al.* (CSC) 2021
Kagawa *et al.* (Nature) 2022

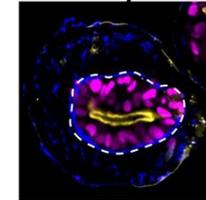
期間 着床前のみ

SEMs



Oldak *et al.*
(Nature) 2023

Human embryoids



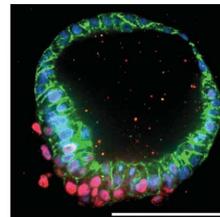
Weatherbee *et al.*
(Nature) 2023

着床後のみ

非統合胚モデル：胚発生を部分的に再現 倫理的な制約に縛られにくい

PASE

Postimplantation amniotic sac embryoid

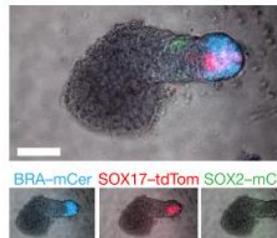


BRACHYURY/E-CADHERIN/DAPI

Zheng *et al.*
(Nature) 2019

期間 着床後のみ

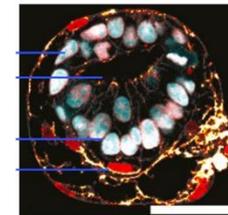
Gastruloid



BRA-mCer SOX17-tdTom SOX2-mCit

Moris *et al.*
(Nature) 2020

hEEs

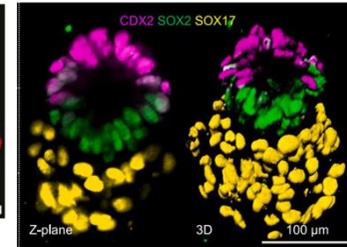


SOX2 NCAD DAPI

Pedroza *et al.*
(Nature) 2023

着床後のみ

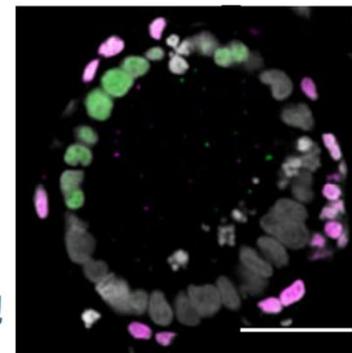
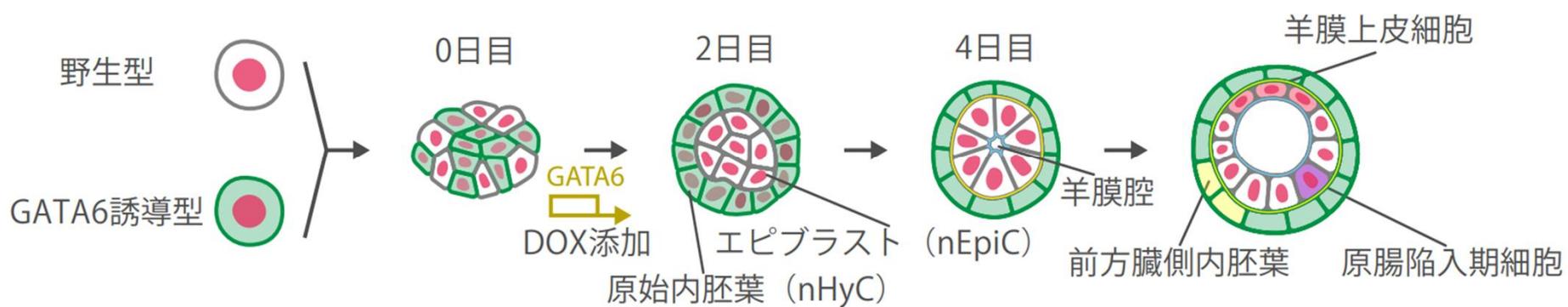
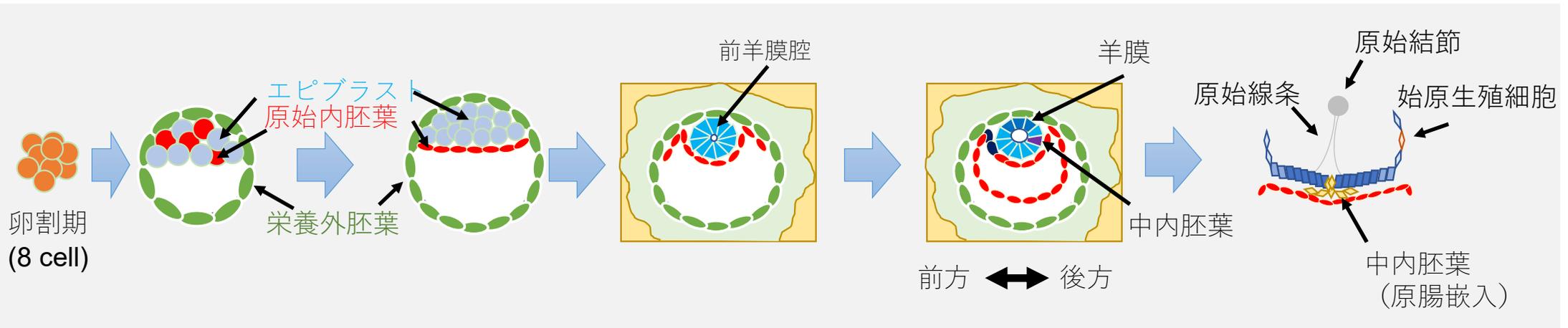
Peri-gastruloids



CDX2 SOX2 SOX17

Liu *et al.*
(Cell) 2023

原始内胚葉の誘導とヒト初期発生モデルの構築

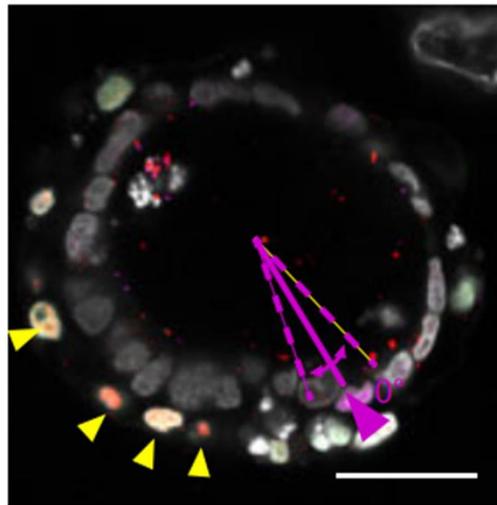
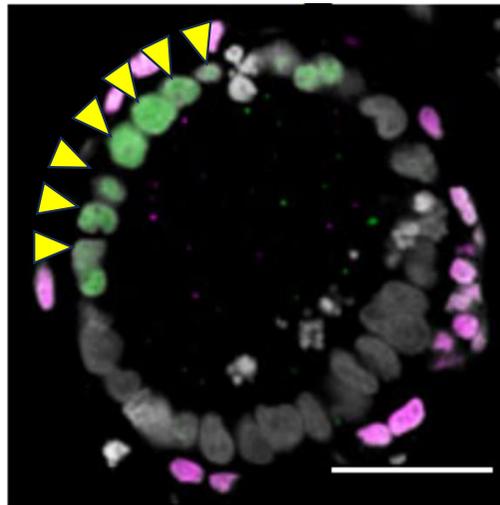


非統合胚モデルにおける胚形成過程とエピブラスト分化の再現

培養6日目

羊膜様細胞の出現

前後軸形成



前方 ← → 後方

▲ 羊膜様細胞

▲ 前方臓側内胚葉細胞

▲ 原腸陥入期細胞

TFAP2A: 羊膜マーカー

GATA6: 原始内胚葉マーカー

T: 原始線条マーカー

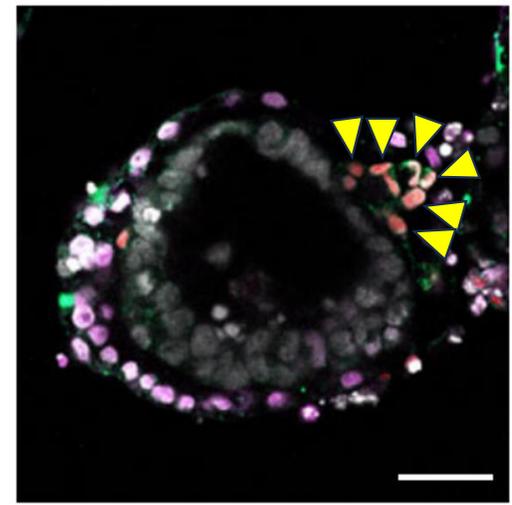
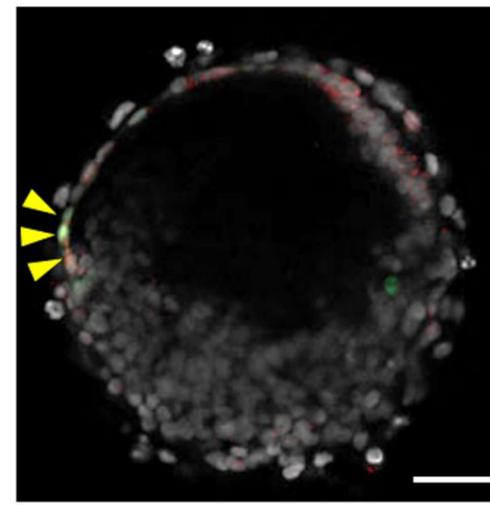
OTX2: 前方臓側内胚葉マーカー

GATA4: 原始内胚葉マーカー

培養9日目

始原生殖細胞様細胞の出現

血管内皮前駆細胞の出現



▲ 始原生殖細胞様細胞

▲ 血管内皮前駆細胞様細胞

BLIMP1: 始原生殖細胞マーカー

TFAP2C: 始原生殖細胞マーカー

GATA6: 原始内胚葉マーカー

ERG: 血管内皮前駆細胞マーカー

CD34: 血管内皮前駆細胞マーカー

バイラミノイドは着床前から原腸陥入初期まで発生を再現することができる

Okubo et al. Nature 2023

幹細胞を利用した胚オルガノイド研究の今後：私見

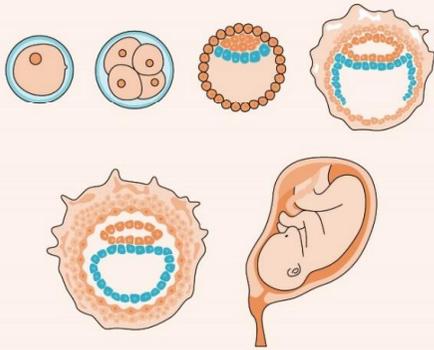
- 新たな生命倫理問題が出現した
 - ヒト胚オルガノイドはヒト個体を細胞から作り出すリスク
 - 実際には、現時点ではかなり遠い

- 胚オルガノイド研究を日本において推進する必要があるか？
 - 胚オルガノイド研究のヒト健康に対するメリットがあるのか？ → イエス
 - ✓ ヒト胚オルガノイドは最も生理的な分化誘導方法
 - ✓ ヒト胚を使用する必要がなくなる

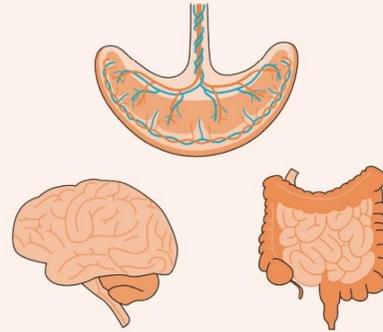
- 胚オルガノイド研究の今後と考えるべき問題点
 - メリットから「世界」では研究が一気に進むだろう
 - ✓ 日本においても社会に説明し、対話する必要がある
 - ✓ ヒト胚・胎児利用に比べ日本社会では許容できるのでは(iPS細胞研究に対する理解)
 - 個体として成し得ない限りは、許容されるのではないか

私たちの研究

ヒト初期発生研究

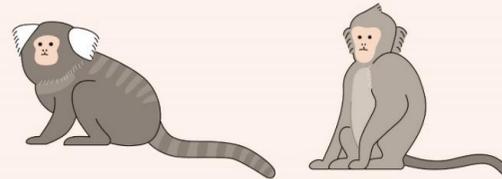


幹細胞制御と臓器



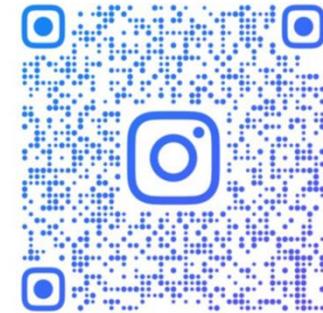
多能性幹細胞

霊長類モデル



<https://takashima-lab.cira.kyoto-u.ac.jp/>

Instagram



@YASU_TAKASHIMA

Acknowledgements and collaborators

Kyoto University

CiRA
Takuya Yamamoto
Mio Kabata

Mitinori Saitou
Tomonori Nakamura
Misao Fujita

Hospital
Masaki Mandai
Hironori Haga

CIEA

Erika Sasaki
Keiko Kishimoto

TMDU

Hideki Masaki
Hiromitsu Nakauchi

University of Exeter

Austin Smith
Ge Guo

Takashima Lab

Takumi Okubo
Shingo Io
Katsunori Semi
Masae Sato
Daisuke Suzuki
Takafumi Namiki
Yoshiki Iemura
Kuan-Chun Lan
Shimpei Shitanaka
Ayano Nakamura
Belinda Kaswandy
Minatsu Matsufuji
Minori Ichiraku
Yuka Fujiwara
Rika Takashima

