

哺乳類の合成生物学, そして人工生命体へ

玉井 美保・田川 陽一*

医薬品やバイオ燃料といった人間社会に有益な物質を生産させる目的で、新しい機能を理想的に発現させる合成生物学的技術により設計された微生物や藻類などが実用化されようとしている。実験とデータの数理解析を反復して蓄積された情報をフィードバックして、その生物が本来有していない遺伝子発現回路やカスケードを自由自在に操るシステムを構築できるようになることが合成生物学的技術の魅力である。では、哺乳類における合成生物学的技術も考えることができるだろうか。トランスジェニック・遺伝子ノックアウト動物や核移植によるクローン動物作製といった発生工学技術はすでに、*Cre-loxP*¹⁾やテトラサイクリン誘導発現システム²⁾、CRISPR-CAS9システム³⁻⁸⁾などを組み合わせた最新の遺伝子工学的技術を導入しており、合成生物学的検証を行うことは可能になりつつある。

1. 哺乳類における合成生物学的技術

合成生物学的技術では、実験結果の取得と遺伝子発現システムのシミュレーションや予測などの数理解析との繰り返しによる最適化という地道な作業が必要である。特に、哺乳類となるとシステムが複雑なうえ、実験でのN数を増やすことが困難なこともある。たとえば、ある設計遺伝子を全身で発現するトランスジェニックマウスを作製する場合を考えてみる。 β アクチンプロモーターの下流に、目的の設計遺伝子およびイントロンとポリAシグナルを連結した発現ベクターを受精卵の前核に導入して、トランスジェニックを作製する。しかし、これだけでは合成生物学の技術を使ったとは言えない。合成生物学技術とは、全身の組織にただ発現させるのではなく、各々の組織や細胞でどのくらいの発現量にするか、時空間的にどのように発現させるかを厳密に設計し、その生命体に新しいシステムを導入することである。すなわち、以下のようなプロセス全般が必要となる。まず、既存の情報から予測し、構築した遺伝子発現の実験データを取得しては数理解析を行い、その結果に基づき、さらに改変した遺伝子発現ネットワークを構築し、導入することでその結果が正しいかどうかを検証する。さらに、修正を加えながら何度も繰り返すことで、最終的に、最適化した遺伝子発現ネットワークを導入することにより、これまでのマウスにはない最適な新規システムを有するトランスジェニックマウスを作製する、これら一連のプロセスが合成生物学的技術である。ということは、この最

適化のために、その都度トランスジェニックマウスを作製する必要があるということになるが、そのような膨大な回数の実験は、動物愛護的、経済的、労力的にも望ましくない。そこで、哺乳類で合成生物学的技術を確立するためには、それらの実験データを解析し検証できるプラットフォームを構築するための哺乳類における *in vitro* システムが必要不可欠となる。

2. 哺乳類の組織構造と組織間のコミュニケーション

哺乳類は多細胞である。細胞と細胞外マトリクスから個体に至るまではヒエラルキーが存在している(図1)。最適化を考えるには、細胞内の最適化だけにとどまらず、隣り合う同じ細胞同士(2細胞間とは限らず、多くが複数個の細胞に取り囲まれている)、または隣り合う異なる細胞種との関係による最適化も必要になる。さらには、それらのいくつかの異なる細胞種の集団である組織や臓器としての最適化も必要となる。組織や臓器には血管やリンパ管が走っており、個体を考えると、遠隔からのサイトカインなどの因子による離れた細胞間の影響も考えなくてはならない。また、哺乳類は成長をするため、その時系列も考える必要性がある。哺乳類の合成生物学は、ひとくくりで表現することは難しい。一つの哺乳類細胞→集団としての哺乳類細胞(組織)→組織から臓器→臓器間→個体としての生命体という段階(ヒエラルキー、図1)を経た理解と検証が必要となると思われる。これらそれぞれの情報が得られることにより、今までその哺乳類では持ち合わせていなかった代謝システムなどの生命維持システムを導入した哺乳類を創造することができるのではないかと考える。

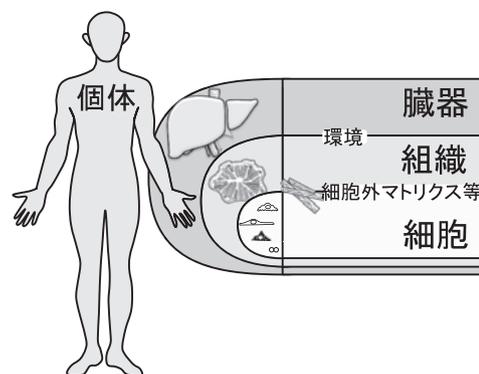


図1. 哺乳類細胞から個体形成までのヒエラルキー

*著者紹介 東京工業大学大学院生命理工学研究科生体分子機能工学専攻(准教授) E-mail: ytagawa@bio.titech.ac.jp

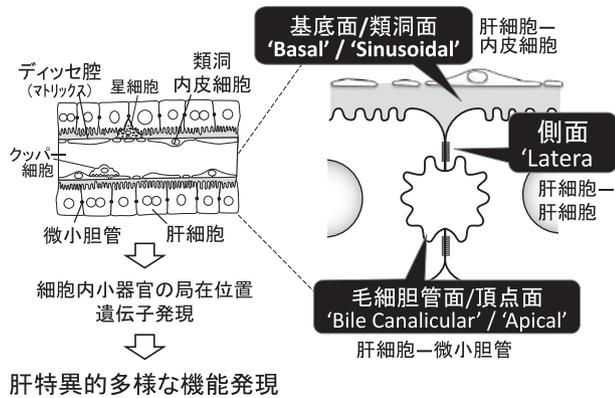


図2. 肝組織を例にした組織構造による細胞極性。組織には複数の細胞種が秩序的に配置されることによって、細胞極性が生じ、組織・臓器が機能している。

哺乳類に限らず、多細胞生物は複数の細胞種が各々特異的な役割を担っており、同種細胞間および異種細胞間で情報交換をすることにより、それらの最終集合体である個体を生命体として維持している。図1に示すように、細胞と細胞外マトリクスによって個体は形成されているが、細胞から個体が直接的に構築されているのではなく、その間には組織や臓器という集合単位でのヒエラルキーを有している。本稿では、肝臓を中心に考察し、哺乳類の合成生物学技術を確立・応用するためのプラットフォームを構築するための3つの *in vitro* システムを紹介したい。

肝臓は図2に示すような組織構造を構築しており、生命維持に必須となる多数の肝特異的な機能を発揮している⁹⁾。肝臓を構成する細胞は、実質細胞の肝細胞のみならず、非実質細胞としての内皮細胞や星細胞、クッパー細胞などがある。口から摂取した食物はさまざまな消化液により最小単位の物質まで分解され、十二指腸・小腸から取り込まれ、門脈を経由して肝臓に運ばれる。肝臓の中には毛細血管網としての類洞がある。その類洞内皮細胞の外側はディッセ腔と呼ばれる細胞外マトリクスが存在し、その外側を肝細胞が取り囲んでいる。ディッセ腔には星細胞がところどころに存在し、類洞内は血液が流れているが、そこにはマクローファージ系のクッパー細胞が存在している¹⁰⁾。肝細胞同士の接触している間には、微小胆管が形成される。つまり、肝臓の中の肝細胞は、類洞側における basal、肝細胞同士の接触面における lateral、微小胆管側における apical といった細胞極性を有し、各々の細胞極性面に特異的なトランスポーター分子が局在している¹¹⁾。したがって、細胞極性が確立していない系では肝臓に対応する代謝・動態試験などは不可能である。少なくとも、これらの極性を有した肝組織を構築するには、肝細胞と内皮細胞が必要である。

2.1 ES/iPS細胞からの *in vitro* 肝組織分化システム
肝組織を *in vitro* で構築するには、肝臓の器官形成を模

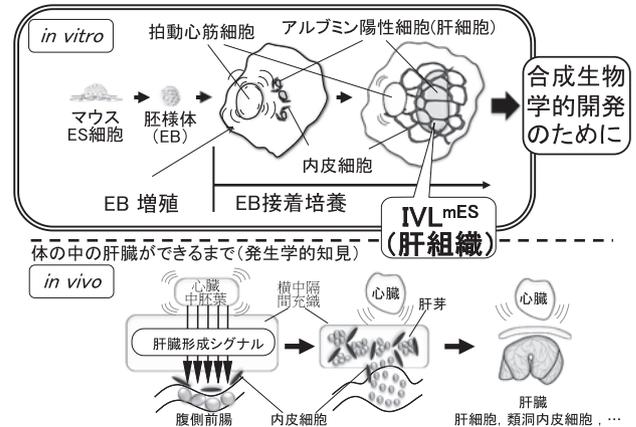


図3. 器官形成を模倣した *in vitro* 器官形成モデル。肝臓の器官形成は心臓中胚葉と臓側内胚葉とのコミュニケーションから始まる。

倣して、ES/iPS細胞から分化させることが良いと考え、我々はES/iPS細胞から内皮細胞ネットワークを有した肝組織への分化誘導(図3)を試み、その成果を報告してきた¹²⁻¹⁶⁾。ES/iPS細胞は万能性であるので、発生における三胚葉(内、中、外胚葉)に分化が可能であり、その中胚葉領域から心筋細胞を出現させることができる。心筋細胞から肝臓分化シグナルが産生されると、その周囲に、内胚葉由来の肝前駆細胞が現れて増殖を始める。その肝前駆細胞の増殖コロニーの中に、中胚葉由来の内皮細胞が遊走を始め、個体発生における肝臓器官形成時の肝芽と類似した組織構造が形成される。この肝組織ではさまざまな肝機能が確認され、図2のような肝細胞極性も再現されていることがわかった。この *in vitro* 分化誘導プロセスは、合成生物学的検証をするためのプラットフォームを構築するための実験系として有用であると考えている。

2.2 合成生物学的技術を導入した細胞株の樹立
哺乳類の生命システムでは、細胞間のコミュニケーションが必須である。上述の *in vitro* 肝組織形成モデルの合成生物学的アプローチを目的として、図4に示すように、幹細胞(ES/iPS細胞または肝前駆細胞など)には外来遺伝子発現システムを導入せず、幹細胞を教育しサポートする細胞に外来遺伝子発現システムを導入することも可能である。つまり、最適化する遺伝子制御の対象は、サポートする側の細胞であり、幹細胞側はそのサポート細胞からの指令に従って分化させることによって、最適な未分化維持、さらにスイッチを入れると幹細胞を分化誘導させる最適な条件を検討できる技術を確認することができる。幹細胞の分化系譜を追跡し、情報処理プラットフォームに載せ、サポート細胞へ導入する遺伝子発現システムを最適化していくという方法である。

2.3 哺乳類の人工生命体 近年のマイクロ流路を有する培養デバイス技術の発展は著しい。それぞれの臓

特集

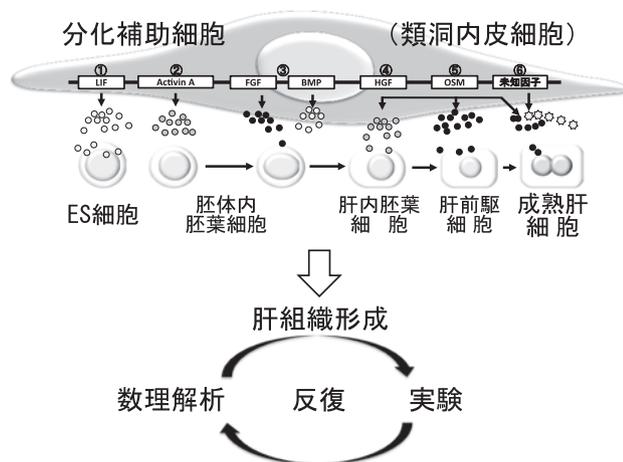
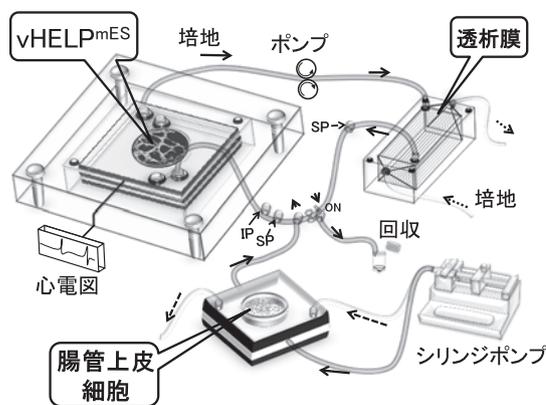


図4. 合成生物学的技術開発にむけた分化補助細胞樹立の戦略

器に対応して樹立され利用されている各々の細胞株をマイクロ流路培養デバイスで培養し、各々を連結した *in vitro* システムは、body (living system) on a chip と呼ばれている¹⁷⁾。しかし、このデバイスは生物という概念からは以下の①～③の点において大きく異なる。

① 哺乳類の組織・臓器は、複数種の細胞が秩序的な配列で構成されることにより必要な機能を発揮できるが、このシステムでは単に各種の細胞培養ディッシュの連結なのである。② 用いられている細胞は、腫瘍に由来する細胞株であり、本来、細胞の有している特異的な機能は低いかほとんどない。腫瘍細胞で構成されているシステムは正常な生命体とは言えない。③ 哺乳類は一つの細胞である受精卵から始まり、最終的には多種・多数の細胞からなる組織や臓器を有する一つの生命体となるが、このデバイスの細胞は複数種の個体由来なのである。そこで我々は、胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたモノクローナルであるES細胞から *in vitro* 生命システムを作出することを試み、本 *in vitro* モデルを「minimal mammal *in vitro* model (最小哺乳類 *in vitro* モデル)」と呼ぶことにしている。

我々はマウスES/iPS細胞から上述の肝細胞と内皮細胞ネットワークが共存している *in vitro* 肝組織のみならず、インスリンやグルカゴン産生細胞の集団である膵外分泌組織、心筋を一緒に分化誘導したvHELP (*in vitro* heart, endothelial, liver, and pancreas) を一つのディッシュ上に構築することができるようになった。さらに、vHELPを培養できるマイクロ流体デバイスを開発し、機能解析をおこなったところ、培地を流すことにより肝機能の有意な向上が確認できた¹⁸⁾。現在、腸管や透析機能を有したマイクロデバイスを開発し、vHELPデバイスとこれらを連結することにより、培養環境を適正に調節できる最小哺乳類 *in vitro* システムの作製に挑戦している(図5)。このような最小哺乳類 *in vitro* モデルは、

図5. 最小哺乳類 *in vitro* モデルの戦略

薬物代謝や毒性試験などの動物実験や臨床試験の代替システムとして社会貢献できると考えている。

まとめ

哺乳類の代謝をはじめとした生命維持システムは、進化の過程できわめて機能的に確立・選択されており、組織・臓器も各々の種の生活スタイルに適応した形で配置され、生理的条件下では最適化が完了していると思われる。しかし、人類は現状に満足せず、食欲にさらなる向上を目指している。人の代謝性疾患などにおいても、バイパス経路を構築するなどの提案ができるかも知れない。哺乳類の合成生物学的技術の開発はまだ初歩段階であるが、このような哺乳類の膨大な情報を得ることによって、人工生命体として我々が目指すようなモノクローナルな幹細胞由来の単純化した最小哺乳類 *in vitro* システムを用いた臨床試験代替法の確立や、*in silico* 人工生命システムへの貢献が期待できると思われる。

文献

- 1) Nagy, A.: *Genesis*, **26**, 99 (2000).
- 2) Gossen, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **15**, 5547 (1992).
- 3) Cong, L. *et al.*: *Science*, **339**, 819(2013).
- 4) Mali, P. *et al.*: *Science*, **339**, 823 (2013).
- 5) Hwang, W. Y. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **31**, 227 (2013).
- 6) Cho, S. W. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **31**, 230 (2013).
- 7) Jiang, W. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **31**, 233 (2013).
- 8) Fujii, W. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **41**, e187 (2013).
- 9) Grisham, J. W. *et al.*: *Prog. Liver Dis.*, **5**, 1 (1976).
- 10) Bhatia, S. N. *et al.*: *FASEB J.*, **13**, 1883 (1999).
- 11) Treyer, A. and Müsch, A.: *Compr. Physiol.*, **3**, 243 (2013).
- 12) 小川真一郎, 田川陽一: *生物工学*, **81**, 358 (2002).
- 13) Ogawa, S. *et al.*: *Stem cells*, **23**, 903 (2005).
- 14) Tsutsui, M. *et al.*: *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 696 (2006).
- 15) Tamai, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 495 (2011).
- 16) Tamai, M. *et al.*: *Amino Acids*, **45**, 1343 (2013).
- 17) Baker, M.: *Nature*, **31**, 661 (2011).
- 18) Akechi, M. *et al.*: *Shimadzu Review*, **67**, 53 (2010).