

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15320

研究課題名(和文) 胚盤胞補完法を用いたin vivo肺再生

研究課題名(英文) GENERATION OF LUNG ORGAN FROM EMBRYONIC STEM CELLS VIA BLASTOCYST  
COMPLEMENTATION IN MIC

研究代表者

西條 康夫 (SAIJO, YASUO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：10270828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Cas法を用いてFgf10exon1欠損マウスを作製し、ホモ欠損マウスで肺欠損を確認した。肺欠損マウス胚にES細胞を移入して、ES細胞由来の肺の作製を試みた。まず、ヘテロマウス同士を交配し、ホモ欠損マウス胚を含む胚にES細胞およびiPS細胞を胚盤胞補完法を用いて移入した。その結果、キメラマウスの全てに肺の発生が確認された。肺はGFP陽性で、胚盤胞補完法でES細胞由来の肺が作出可能であることが強く示唆された。また、FGF10欠損マウスがホモ欠損であることを証明するため、Fgf10exon3欠損マウスを作出し、複合ヘテロFgf10exon1/exon3マウスの作出を現在行っている。

研究成果の概要(英文)：We have developed Fgf10<sup>-/-</sup> mice by CRISPR/Cas system. Since the Fgf10<sup>-/-</sup> die immediately after birth, the Fgf10<sup>+/-</sup> genotype mice are maintained. We implanted 40 control embryos that was not injected ES cells into pseudopregnant mice and we obtained 13 littermates (32.5%) from the mice. 4 littermates (30.7%) showed limb defect (Fgf10<sup>-/-</sup>) and they were confirmed histologically that they had hypoplastic or aplastic lung. EGFP positive ES cells were injected into blastocyst of Fgf10<sup>-/-</sup> mice. 45 littermates were obtained from those mice. 38 littermates were EGFP positive. All EGFP positive mice showed the lung organ histologically. We sacrificed and analyzed histology in EGFP positive mice over one month. EGFP was positive in their lungs. The tissue, cells, and structure of their lung were well developed and not different from normal mice lung by H-E staining. Frozen section of the lung showed EGFP positive in alveolar epithelium, endothelium, tracheal cartilage.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺再生 胚盤胞補完法 多能性幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞による肺再生研究：iPS 細胞から肺上皮細胞への分化誘導法は、既に複数の報告があり、その方法は確立しつつある。しかしながら、肺は、複雑な3次元構造を持ち、かつ多数の細胞種からなる複雑な臓器である。その結果、移植に耐える肺臓器再生には、スキャフォールドの作成、大量の細胞培養技術、バイオリクター装置開発など、ハードルは非常に高い。

胚盤胞補完法を用いた in vivo 臓器再生：胚盤胞補完法とは、特定の細胞を作る能力を欠損している動物の胚盤胞に正常な動物由来の多能性幹細胞を注入すると、欠損した細胞が完全に多能性幹細胞由来のものに置き換えられるというものである。この方法を用いて、中内博士のグループは遺伝的に膵臓を欠損するマウスの胚盤胞に、ラット iPS 細胞を注入することによって、マウスの生体内でラットの膵臓を作ることに成功した (Cell 142: 787, 2010)。同様に腎臓でも成功している。

Fgf10 ノックアウトマウス：Fgf10/Fgfr2 シグナルは肺発生に重要である。Fgf10 ノックアウトマウス (Nat Genet 21:138-141, 1999) や Fgfr2 ノックアウトマウス (Development 127:483-492, 2000) では肺の無発生が報告されている。また、TALEN と CRISPR/Cas システムを使って Fgf10 ノックアウトが作成され、同様に肺欠損が示された (Scientific Reports 4:5705, 2014)。

応募者のこれまでの研究成果：申請者は、マウス iPS 細胞から肺上皮への分化方法を確立し、in vitro で肺スキャフォールドに生着培養することにより、肺胞構造の再構築を示した。更に肺胞上皮細胞に分化した iPS 細胞をプレオマイシン障害肺に投与することにより肺障害の改善を確認した (Stem Cells Trans Med 3:675-85, 2014)。

### 2. 研究の目的

この胚盤胞補完法を用いて、iPS 細胞による生体内肺再生の可能性を明らかにする。入手可能な Fgf10 ノックアウトマウスの胚盤胞に GFP 陽性のマウス iPS 細胞を移入することにより作出したキメラマウスを解析して、以下の点を明らかにする。

(1) 肺組織ができる iPS 細胞のナイーブ化状態と移植細胞数等の条件の確立

(2) 再生された肺組織における GFP 陽性細胞が形成する細胞種

(3) キメラマウスの発生過程及び出生マウスの呼吸状況と発育状態

### 3. 研究の方法

本研究目的を達成するために、期間内に次の研究を遂行する。胚盤胞補完法に用いる肺臓器形成不全 Fgf10 ノックアウトマウス由来胚盤胞を作製するマウスコロニーの準備をおこなう。次に、得られた受容胚に GFP ラベル

したマウス iPS 細胞を移入し、偽妊娠マウスに移植してキメラマウスを得る。このキメラマウスでの肺臓器の有無を、移入した iPS 細胞のプライム状態と比較し検討する。さらに補完的にできた肺臓器を構成する細胞全部が iPS 細胞由来かどうか、組織学的に正常の肺が出来ているかどうか解析する。また、出生後飼育し、生存や成長が可能か、肺は正常に機能しているか、四肢の発生はどうかを検討し、in vivo 肺再生を目的として Fgf10 遺伝子は、適切なターゲット遺伝子が解析する。もし、Fgf10 ノックアウトマウスで成功しない場合、コンディショナルノックアウトや他の遺伝子異常マウスの使用の可能性を検討する。

### 4. 研究成果

本研究の目的は、胚盤胞補完法を用いて iPS 細胞由来の肺をマウス個体で作成することである。

初年度は、Fgf10 欠損マウスの作成と胚盤胞補完法の技術習得を行った。共同研究者である徳島大学泰江博士が、CRISPR/Cas 法を用いて Fgf10 exon1 欠損マウスを作製した。このマウスの精巣上体を新潟大学に移送し、ヘテロマウスのライン化を行った。FGF10 欠損マウス次に Fgf10 exon1 欠損マウス (ホモ) で肺臓器の欠損を確認した。

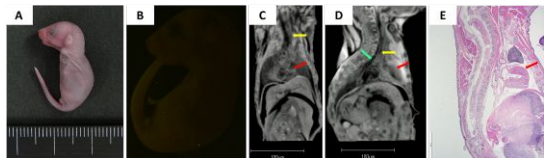


Fig1. Fgf10<sup>-/-</sup> mice was analyzed at birth. A; Macroscopic finding of Fgf10<sup>-/-</sup> mouse. No limb was detected. B; No fluorescent was observed by fluorescent stereomicroscope. C, D;  $\mu$ -Computed tomography (CT) of Fgf10<sup>-/-</sup> mouse (C; frontal plane, D; sagittal plane).  $\mu$ -CT showed lung aplasia or hypoplasia. E; Aplastic or hypoplastic lung were confirmed by H-E staining (paraffin section). Red arrows indicate heart, yellow arrows show trachea, and a green arrow indicates esophagus.

一方、胚盤胞補完法の技術習得を野生型マウスの胚を用いて行った。胚に、EGFP 発現マウス ES 細胞および iPS 細胞を注入して、キメラマウスの作成方法の確認を行った。ES 細胞・iPS 細胞とも、キメラマウス作製可能であり、EGFP 発現でキメラの有無が容易に判別可能であった。

2年目は、肺欠損マウス胚に ES 細胞・iPS 細胞を移入して、ES/iPS 細胞由来の肺の作製を試みた。まず、ヘテロマウス (Fgf10<sup>-/+</sup>) 同士を交配して作成し、4分の1の確率でホモ欠損マウス胚を含む胚に ES 細胞および iPS 細胞を胚盤胞補完法を用いて移入した。その結果、キメラマウスの全てに肺の発生が確認された。しかしながら、腹壁ヘルニアが多発し、多くのマウスは出生後死亡した。肺は GFP 陽性で、胚盤胞補完法で ES 細胞由来の肺が

作出可能であることが強く示唆された。

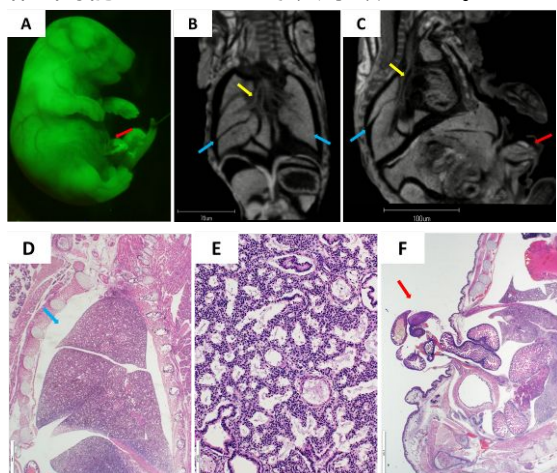


Fig2. We investigated GFP positive mice who had died at birth because of ventral hernia.

A; Strong fluorescence of EGFP was seen at whole body of fetus by fluorescent stereomicroscope. B, C;  $\mu$ -CT showed lung, trachea, and bronchus ( B; frontal plane, C; sagittal plane) . D, E; Lung was detected histologically(H-E staining, paraffin section) ,too. But there were kept insufficient volume of air. F; H-E staining exhibited prolapsed intestine that were covered by thin skin. Red arrows display ventral hernia. Yellow arrows indicate bronchus. Blue arrows represent lung.

また成人まで成長したキメラマウスの肺を摘出して、解析したところ、肺上皮細胞の多くは EGFP 陽性で ES 細胞由来であることを確認した。

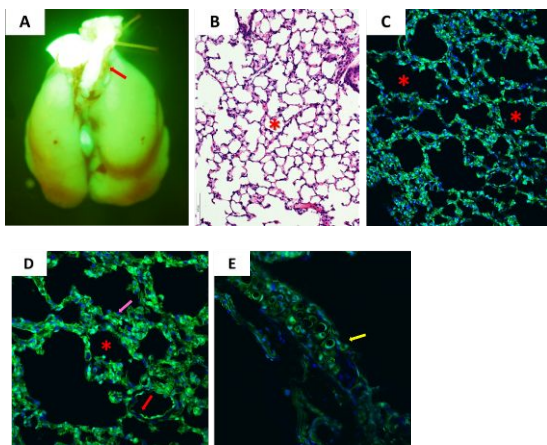


Fig3. We sacrificed and analyzed histology in EGFP positive mice lived over one month.

A;Fluorescent stereomicroscope showed strong fluorescence of EGFP at lung and trachea. Red arrows displays trachea. B; Tissue, cells, and structure of these lung were not different from wild type mice lung. C,D,E; Frozen section were stained by only 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Strong fluorescence of EGFP was seen in alveolar epithelium, endothelium, and tracheal cartilage. Fluorescence of EGFP was not seen in those tissue of the mice that had been EGFP

negative at birth (data was not shown). Red arrow indicates endothelium. Pink arrow represents alveolar epithelium.

Asterisk shows alveoli. Yellow arrow represents tracheal cartilage.

その後、注入 ES 細胞を減ずることで、腹壁ヘルニアが減った。一方、iPS 細胞注入胚ではキメラマウスの出生が極めて少数である、iPS 細胞の変更等が必要あることが明らかとなった。

また、FGF10 欠損マウスがホモ欠損であることを証明するため、Fgf10exon3 欠損マウスを作出し、複合ヘテロ Fgf10exon1/exon3 マウスの作出を現在行っている。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

〔 雑誌論文 〕 ( 計 7 件 )

1. Kawashima H, Ariizumi T, Saijo Y, Moriyama M, Umezu H, Ikeda Y, Ogose A, Endo N. Chromosomal rearrangements in myoepithelial carcinoma of the breast that presented as metachronic double cancer with invasive ductal carcinoma in the ipsilateral breast. *Cancer Genet.* 2016 209(11):501-505.doi:10.1016/j.cancergen.2016 .10.005. 査読有

2.Kamimura K, Matsumoto Y, Zhou Q, Moriyama M, Saijo Y. Myelosuppression by Chemotherapy in Obese Patients with Gynecological Cancers. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2016 Sep;78(3):633-41. doi: 10.1007/s00280-016-3119-2. 査読有

3.Ye X, Zhou Q, Matsumoto Y, Moriyama M, Kageyama S, Komatsu M, Satoh S, Tsuchida M, and Saijo Y Inhibition of Glutaminolysis inhibits cell growth and promotes autophagy and inhibits cell growth via down-regulating mTORC1 signaling in lung squamous cell carcinoma cell lines *Anti-Cancer Research* 2016 Nov;36(11):6021-6029. 査読有

4.Takayama K, Sugawara S, Saijo Y, Maemondo M, Sato A, Takamori S, Harada T, Sasada T, Kakuma T, Kishimoto J, Yamada A, Noguchi M, Itoh K, Nakanishi Y. Randomized Phase II Study of Docetaxel plus Personalized Peptide Vaccination versus Docetaxel plus Placebo for Patients with Previously Treated Advanced Wild Type EGFR Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Immunol Res.* 2016:1745108. 査読有

5. Moriyama M, Yano T, Furukawa T, Takada T, Ushiki T, Masuko M, Takizawa J, Sone H, Tazawa R, Saijo Y, Ishii H, Nakata K. Possible Involvement of Lung Cells Harboring an Abnormal Karyotype in the Pathogenesis of

Pulmonary Alveolar Proteinosis Associated with Myelodysplastic Syndrome. Ann Am Thorac Soc. 2015 Aug;12(8):1251-3. doi: 10.1513/AnnalsATS.201503-175LE. 査読有

6. Miyauchi E, Inoue A, Kobayashi K, Maemondo M, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Saijo Y, Yoshizawa H, Hagiwara K, Nukiwa T; North-East Japan Study Group. Efficacy of chemotherapy after first-line gefitinib therapy in EGFR mutation-positive advanced non-small cell lung cancer-data from a randomized Phase III study comparing gefitinib with carboplatin plus paclitaxel (NEJ002). Jpn J Clin Oncol. 2015 Jul;45(7):670-6. doi: 10.1093/jjco/hyv054. 査読有

7. Fukuhara T, Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Saijo Y, Hagiwara K, Morita S, Nukiwa T. Factors associated with a poor response to gefitinib in the NEJ002 study: Smoking and the L858R mutation. Lung Cancer. 2015 May;88(2):181-6. doi:10.1016/j.lungcan.2015.02.004. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

1. A Kitahara, Q Zhou, X Ye, K Oda, T Sasaoka, M Abe, K Sakimura, Y Ajioka, A Yasue, M Tsuchida, Y Saijo. Generation of lung organ from embryonic stem cells via blastocyst complementation in mice. ISSCR 2017, Boston USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：生体内における移植可能な多能性幹細胞由来肺臓器作出法

発明者：西條 康夫、周啓亮、北原哲彦、笹岡 俊邦、小田 佳奈子、阿部 学、崎村 建司、味岡 洋一、泰江 章博

権利者：国立大学法人 新潟大学

種類：特許権

番号：特願 2017-98477

出願年月日：平成 29 年 5 月 17 日

国内外の別： 国内

取得状況(計 1 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

西條 康夫 (SAIJO, YASUO)

新潟大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10270828

(2)研究分担者

笹岡 俊邦 (SASAOKA, TOSHIKUNI)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：60222005

小田 佳奈子 (ODA, KANAKO)

新潟大学・脳研究所・特任助教

研究者番号：60708212

(3)連携研究者

崎村 建司 (SAKIMURA, KENJI)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：40162325

大内 淑代 (OHUCHI, HIDEYO)

岡山大学 医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00253229

(4)研究協力者

( )