

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2022

課題番号：18KK0423

研究課題名（和文）気管及び食道オルガノイドの立体構造の作成基盤確立と間充織極性化機構の解明

研究課題名（英文）Establishing 3-dimensional structure of trachea and esophageal organoid toward understanding the mechanism underlying mesenchymal polarization

研究代表者

岸本 圭史（Kishimoto, Keishi）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：70700029

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 24ヶ月

研究成果の概要（和文）：気管と食道の形成は前腸と呼ばれる一本の管から分岐することから始まる。この過程では、上皮細胞と間充織細胞の相互作用が必要であり、その異常は気管食道分岐異常を引き起こす。本研究では、ヒト幹細胞から呼吸器および食道の上皮ならびに間充織を分化誘導する実験系を樹立し、これらの細胞を融合することで、間充織と上皮細胞の双方を含む気管および食道のオルガノイドの三次元構造を効率的に樹立することに成功した。さらに、これらのオルガノイドでは、上皮細胞と間充織細胞の相互作用が観察された。今後、この技術は気管食道の分化や極性化といった正常発生のシステム、さらには病態の理解に向けてのモデルシステムとしての期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、間充織細胞を豊富に含む呼吸器並びに食道オルガノイドをヒトES細胞から作成する儀実基盤を確立することができた。本研究結果は、ヒト臓器の正常発生を研究するモデルとして有用なツールとしての活用が期待される。さらに、これらのオルガノイドにおいて、呼吸器・食道疾患に起因する遺伝子を操作することによって、病態を培養皿上で再現するモデルとして期待される。

研究成果の概要（英文）：The trachea and esophagus are originated from a single common tube, foregut, throughout the interaction between epithelial and the surrounding mesenchyme. The failure of this interaction results in severe developmental birth defects such as tracheo-esophageal fistula. In this study, we separately generated respiratory and esophageal mesenchyme from human pluripotent stem cells by mimicking the process of normal organogenesis. Furthermore, these cells were combined to establish more complex organ-like structure. In the organoids, we observed signaling interaction between epithelial cells and the surrounding mesenchymal cells. This technique can be applied for the study of normal human organogenesis and disease modeling.

研究分野：発生生物学

キーワード：オルガノイド 気管 食道 間充織

様式 F - 19 - 2

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、気管と食道の長さや太さが異なる遺伝プログラムによって制御されていることを明らかとしてきた。マウス遺伝学により、気管と食道の長さは Wnt5a が平滑筋前駆細胞の極性を調節することによって調節されており、気管の太さは Sox9 遺伝子による軟骨細胞の分化制御によって調節されることを報告した。これらの結果は、気管食道の形成には間充細胞の正常な発生が不可欠であることを示している。しかしながら、生体の深部で生じるこれらの発生現象を解析することは技術的に困難であった。

臓器の構造を模したオルガノイドの樹立は、こうした問題を解決する一つの技術として世界的に注目を浴びている。申請者らは、臓器オルガノイドの研究において世界をリードするシンシナティ小児病院 (Aaron Zorn 博士および James Wells 博士) と連携し、ヒト幹細胞より、気管・食道の臓器を模した三次元構造を *in vitro* で作成する技術の確立に取り組んだ。研究開始当時報告されていた、呼吸器及び食道オルガノイドはいずれも上皮細胞によって構成され、間充細胞はほとんど含まれていなかったため、臓器間充細胞を作成する技術の確立から開始した。

2. 研究の目的

本研究ではヒト ES 細胞から間充細胞を豊富に含む気管・食道オルガノイドを作成し、上皮・間充相互作用ならびに間充細胞の発生の仕組みを明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

(1) 臓器固有の間充細胞の分化誘導系の確立

申請者らは、マウス胎児 (8.5, 9.0, 9.5 日胚) の前腸から single cell RNA sequence 解析を行い、臓器固有の間充細胞のマーカー遺伝子の単離を行った。さらに、間充細胞の分化に必要なシグナル伝達因子を同定した。これらの情報をヒト ES 細胞の分化誘導系に反映させることによって、呼吸器・食道を含む臓器固有の間充細胞を誘導した (図 1)。

(2) 呼吸器並びに食道に分化可能な前駆上皮細胞の樹立

ヒト ES 細胞から呼吸器および食道の上皮細胞の前駆細胞である前腸内胚葉細胞を誘導する条件を検討した。特に NOGGIN, RA, を初めとした成長因子の濃度、添加時間について検討を行った。

(3) 間充細胞を豊富に含む呼吸器並びに食道オルガノイドの樹立

上記の (1)(2) で作製した細胞を融合することで、生体内の臓器に近いオルガノイドの三次元構造の作出を行った。上皮細胞・間充細胞の数、比率、融合するタイミング・細胞外基質の種類、成長因子の種類等について検討した。作成したオルガノイドについて、マーカー遺伝子の発現、および発生に重要なシグナル伝達分子の発現について定量 PCR および免疫染色、*in situ* hybridization を行った。

(4) オルガノイドの成長並びに成熟の誘導

平滑筋前駆細胞を含む成熟したオルガノイドの作製するため、*in vitro* の長期培養および、マウス腎臓への移植実験を行った。

4. 研究成果

(1) 臓器固有の間充細胞を誘導するためのシグナル経路を、マウス胎児を用いた 1 細胞 RNA 解析から推定し、これらのシグナルを制御する成長因子や化合物を培養液に添加する濃度やタイミングを検討した結果、pFG-SpM (後方前腸臓器中胚葉) に RA/BMP シグナルを活性化させると肝臓の間充細胞が誘導されることや、RA/BMP/WNT シグナルを活性化すると肝臓線維芽細胞が誘導されることが分かった (図 2 a, b)。

一方、pFG-SpM の RA/HH シグナルを活性化しつつ BMP シグナルを不活性化すると、胃の間充細胞が形成されることが分かった (図 2 c)。興味深いことに、同様の誘導を aFG-SpM (前方前腸臓器中胚葉) に施すと、食道の間充細胞が誘導された (図 2 e)。さらに、aFG-

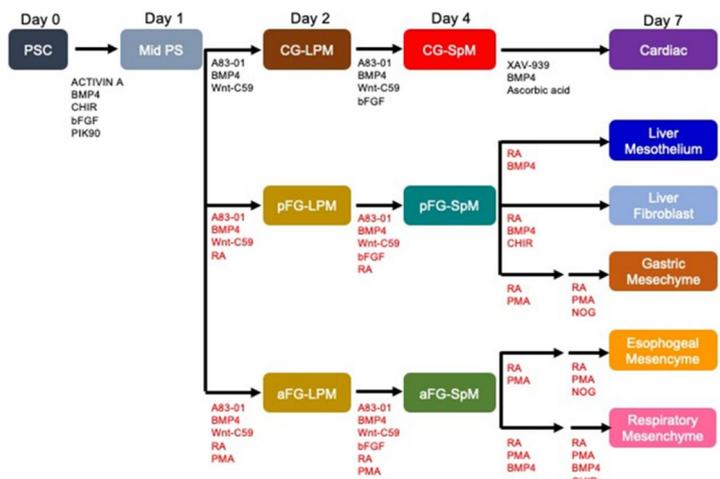


図 1 臓器間充細胞分化の模式図

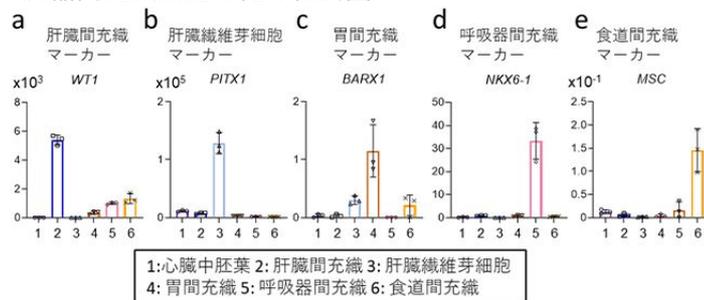


図 2 ヒト ES 由来臓器間充細胞のマーカー遺伝子発現

SpMにおいてRA/HH/BMP/WNTシグナルを活性化することで、呼吸器の間充細胞が誘導された(図2d)。さらに、作製した呼吸器間充細胞を長期間培養することによって、気管間充の特徴である軟骨細胞と平滑筋細胞に分化することが確認できた(図3)。

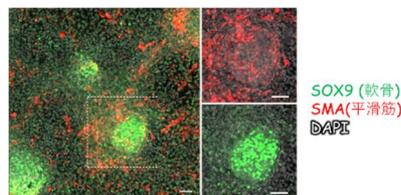


図3 ヒト ES 由来軟骨及び平滑筋細胞

(2) 呼吸器と食道上皮は共通の前駆細胞から発生するため、まず共通前駆細胞を作製することから始めた。添加する増殖因子の濃度、時間の検討から、呼吸器および食道の上皮細胞に分化できる前駆細胞を効率的に誘導することに成功した(図4)。

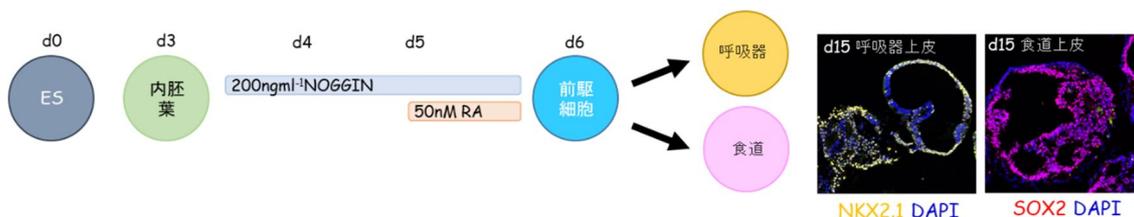


図4 呼吸器及び食道上皮前駆細胞の樹立

(3) 正常な気管食道発生には上皮と間充の相互作用が不可欠である。そこで、1) 2) で作製した細胞を融合することでより、発生過程の組織形態に類似した三次元構造体の作製を試みた。条件検討の結果、上皮組織が間充組織に覆われた呼吸器並びに食道オルガノイドを作成することに成功した(図5)。

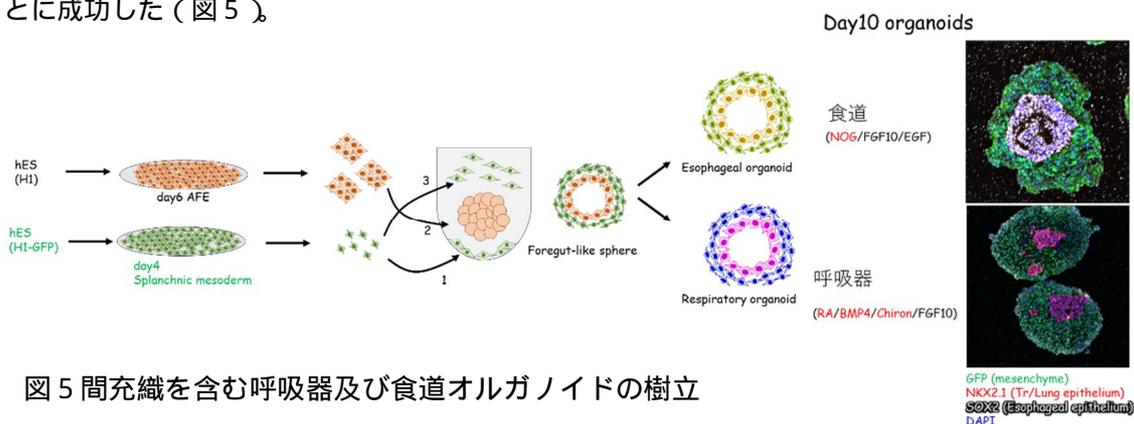


図5 間充織を含む呼吸器及び食道オルガノイドの樹立

いずれのオルガノイドにおいても各種マーカー遺伝子(呼吸器: NKX2-1, TBX4, WNT2, TBX5, 食道: SOX2, P63, FOXF1)の発現を確認することができた(図6)。また、いずれのオルガノイドでも、SHHが上皮細胞に発現しており、間充織ではHHシグナルの標的であるGLI1が発現していた。即ち、作製したオルガノイドでは正常発生に必要なSHHシグナルを介した上皮間充織の相互作用が観察された。

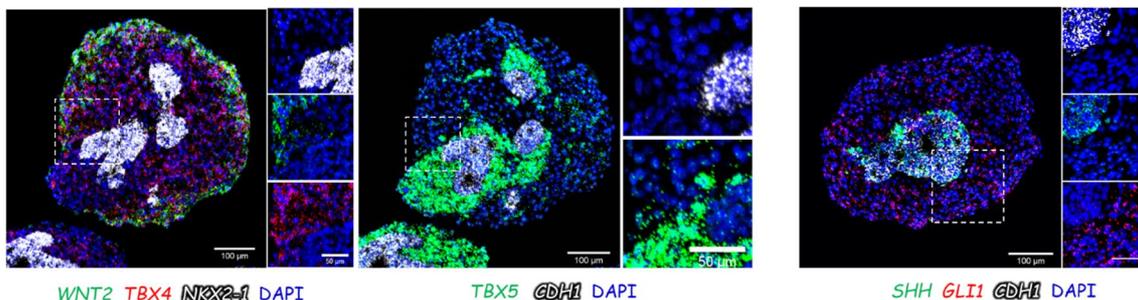


図5 呼吸器オルガノイドにおける各種マーカー遺伝子の発現

(4) 平滑筋を含むオルガノイドを誘導するため、in vitroでの長期培養を行った。分化に必要な成長因子の添加やマトリゲルを初めとした基質の添加を初めとした条件検討を行ったが、間充細胞の平滑筋の分化はほとんど観察されなかった。そこで次に、(3)で作製したオルガノイドをマウスの腎増に移植することで成長分化を促進した。その結果、呼吸オルガノイドでは平滑筋は形成されなかったものの、食道オルガノイドの間充織はほとんど平滑筋細胞と分化した(図6)。

食道オルガノイド (移植8週後)

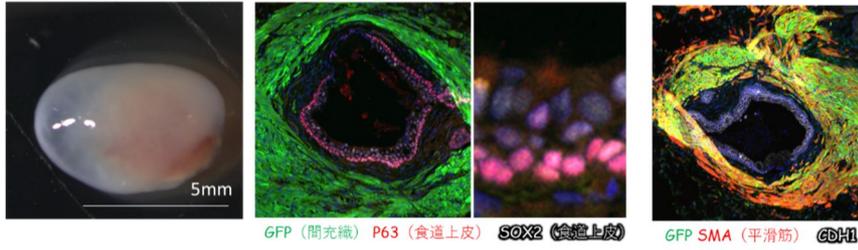


図6 食道オルガノイドにおける各種マーカー遺伝子の発現

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kishimoto Keishi, Morimoto Mitsuru	4. 巻 148
2. 論文標題 Mammalian tracheal development and reconstruction: insights from in vivo and in vitro studies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev198192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.198192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kishimoto Keishi, Iwasawa Kentaro, Sorel Alice, Ferran-Heredia Carlos, Han Lu, Morimoto Mitsuru, Wells James M., Takebe Takanori, Zorn Aaron M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Directed differentiation of human pluripotent stem cells into diverse organ-specific mesenchyme of the digestive and respiratory systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 2699 ~ 2719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41596-022-00733-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Eicher Alexandra K., Kechele Daniel O., Sundaram Nambirajan, Berns H. Matthew, Poling Holly M., Haines Lauren E., Sanchez J. Guillermo, Kishimoto Keishi, Krishnamurthy Mansa, Han Lu, Zorn Aaron M., Helmuth Michael A., Wells James M.	4. 巻 29
2. 論文標題 Functional human gastrointestinal organoids can be engineered from three primary germ layers derived separately from pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 36 ~ 51.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stem.2021.10.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Han L, Chaturvedi P, Kishimoto K, Koike H, Nasr T, Iwasawa K, Giesbrecht K, Witcher PC, Eicher A, Haines L, Lee Y, Shannon JM, Morimoto M, Wells JM, Takebe T, Zorn AM.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Single cell transcriptomics identifies a signaling network coordinating endoderm and mesoderm diversification during foregut organogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 4158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-17968-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kishimoto K, Furukawa KT, Luz-Madrigal A, Yamaoka A, Matsuoka C, Habu M, Alev C, Zorn AM, Morimoto M.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Bidirectional Wnt signaling between endoderm and mesoderm confers tracheal identity in mouse and human cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 4159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-17969-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Keishi Kishimoto
2. 発表標題 Induction of organ specific splanchnic mesoderm from human embryonic stem cell
3. 学会等名 CLEAR consortium 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keishi Kishimoto
2. 発表標題 Mechanism and in vitro reconstruction of mammalian trachea-esophageal development
3. 学会等名 CLEAR consortium 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keishi Kishimoto
2. 発表標題 Understanding and recapitulating trachea-esophageal development
3. 学会等名 2023 RIKEN BDR-CuSTOM Joint Organoid Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keishi Kishimoto
2. 発表標題 Understanding early respiratory and esophageal development toward in vitro modeling organogenesis with human pluripotent stem cells
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keishi Kishimoto
2. 発表標題 Understanding early respiratory and esophageal development toward in vitro modeling organogenesis with hPSCs
3. 学会等名 Cincinnati Children's First Annual Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ゾーン アーロン  (Zorn Aaron)	シンシナティ小児病院・Center for Stem Cell and Organoid Medicine (CuSTOM)・Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Cincinnati Children Hospital			