

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16156

研究課題名(和文) Wntシグナルを介した上皮間充織相互作用による気管間充織細胞極性化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism underlying the mesenchymal polarization of the trachea through Wnt signaling

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、まず、間充織極性に関わるWnt signal関連遺伝子の発現について検討を行った。scrRNA-seqおよびIn situ hybridizationにより、気管極性過程において発現するWnt関連遺伝子を同定した。また、呼吸器間充織をIn vitro再構築することで、間充織極性化の過程を培養皿上で解析するシステムの構築に挑戦した。ヒトおよびマウスES細胞から呼吸器間充織細胞を分化誘導することに成功した。現在、これらの細胞を上皮細胞と混合し、間充織細胞が極性化する過程を構築している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は先行研究において、気管が正しい長さ太さに成長するためには、間充織細胞の極性化が必要であることを見出した。一方、これまでの当該分野の研究の多くは上皮細胞に焦点を当てており、間充織組織の発生についてはあまり研究されていなかった。本研究では、呼吸器間充織細胞をヒト幹細胞から作成することを世界に先駆けて成功した。これらの細胞を上皮細胞と混合培養することで、ヒト臓器の形成過程を培養皿上で再構築する技術の確立に繋がる。これらの技術はヒト臓器の正常な形成機構の解明・病態の理解につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to explore the Wnt-related genes which are expected to be involved in mesenchymal polarization of the trachea. scrRNA-seq transcriptomics and its validation with in situ hybridization have identified several Wnt signaling components during mesenchymal polarization. We also tried to establish the system in which the process of mesenchymal polarization can be analyzed in vitro. We have succeeded in generating tracheal mesenchyme from human/mouse embryonic stem cells. We are currently combining these mesenchyme with epithelial cells to recapitulate the process of tracheal mesenchymal polarization.

研究分野：発生生物学

キーワード：気管 極性化 間充織 Wnt

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臓器のかたちは、個々の細胞の振る舞いや細胞間の協調的な運動によって決定づけられる。細胞の極性化は、細胞や組織に方向性や協調性を付加する過程であり、臓器が正しい三次元構造を作るために必須である。我々は先行研究において、間充織細胞が上皮組織方向に極性を同調させながら、マウス気管管腔の長さを決定していることを発見した。これらの結果は、臓器の形態形成における間充織細胞の極性化の重要性を示している。しかしながら、臓器の間充織の発生過程を研究する適切なモデルはこれまで確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究計画では、気管発生における間充織細胞の極性化を制御する上皮-間充織相互作用を理解することを目的とする。さらに、マウスおよびヒト幹細胞を用いた再構成論的アプローチにより、気管発生における間充織細胞の極性化過程を培養皿上で再構築することに取り組んだ。

3. 研究の方法

- (1) 先行研究において、呼吸器における間充織細胞の極性化には Wnt signaling の活性化が関与する可能性が示唆されている。そこで、気管間充織が極性化する過程において発現する Wnt signaling 関連遺伝子を single cell RNA sequence (scRNAseq) および in situ hybridization により解析した。
- (2) ヒトおよびマウス幹細胞から、呼吸器の上皮細胞および間充織細胞を作成する分化誘導系を樹立し、これらの細胞を混合培養することで、間充織細胞極性化の in vitro 再構成に挑戦した。

4. 研究成果

- (1) scRNA-seq 解析により、呼吸器間充織細胞および上皮細胞に発現する Wnt signal 関連遺伝子を網羅的に解析した。その結果、これらの組織において高い発現を示す Wnt 関連遺伝子を明らかにすることができた。
- (2) まず、ヒトおよびマウス幹細胞から、呼吸器上皮細胞ならびに間充織細胞を誘導することから始めた。呼吸器上皮細胞の分化誘導方法については、既報が存在したため、これらの条件を基に、分化誘導条件を検討した。その結果、ヒト・マウスいずれの幹細胞からも高効率に呼吸器上皮細胞を分化誘導する系を確立することに成功した。次に、呼吸器間充織細胞の分化誘導に取り組んだ。幹細胞から標的細胞を樹立するためには、正常な発生過程を理解する必要性があった。そこで、マウス胎児の scRNAseq のデータを解析し、呼吸器固有の間充織に分化するために必要なシグナル伝達経路を明らかにした。その結果、レチノイン酸・BMP・Hedgehog・Wnt シグナルの活性化が必要であることが分かった。これらのシグナルの活性化を幹細胞から

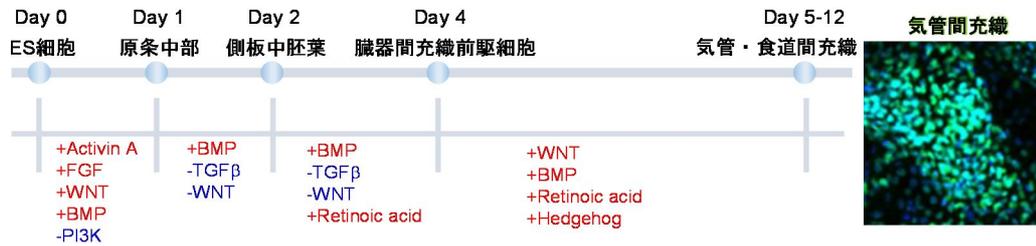
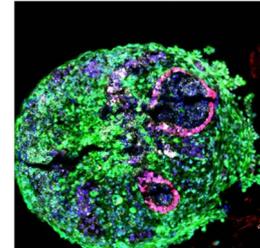


図1 ヒト幹細胞からの呼吸器間充織細胞の分化誘導

の分化誘導実験に適用することで、ヒトおよびマウス ES 細胞から呼吸器固有の間充織細胞を誘導することに成功した (図1)。次に、樹立した間充織細胞と上皮細胞を融合することによって、間充織を豊富に含むオルガノイドの作製することに挑戦した。培地や混合する細胞比、培養プレートなど種々の培養条件を検討した結果、より生体の呼吸器に近い構造を有したオルガノイドを作成することができた(図2)。

以上の検討結果から、ヒト呼吸器の間充織細胞と上皮細胞を誘導し、共培養する実験系を確立することに成功した。この共培養系は、間充織細胞の極性化を初めとした上皮細胞と間充織細胞の相互作用を研究する有用なモデルとなりうる。



GFP (間充織)
NKX2.1(呼吸器上皮)

図2 呼吸器オルガノイド

5. 主な発表論文等

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

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

1. 著者名 Keishi Kishimoto, Kana T. Furukawa, Agustin Luz Madrigal, Akira Yamaoka, Chisa Matsuoka, Masanobu Habu, Cantas Alev, Aaron M. Zorn, Mitsuru Morimoto	4. 巻 756825
2. 論文標題 Bidirectional Wnt signaling between endoderm and mesoderm confer tracheal identity in mouse and human	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biorxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/758235	査読の有無 無
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 Lu Han, Praneet Chaturvedi, Keishi Kishimoto, Hiroyuki Koike, Talia Nasr, Kentaro Iwasawa, Kirsten Giesbrecht, Phillip C Witcher, Alexandra Eicher, Lauren Haines, Yarim Lee, John M Shannon, Mitsuru Morimoto, James M Wells, Takanori Takebe, Aaron M Zorn	4. 巻 861781
2. 論文標題 Single cell transcriptomics reveals a signaling roadmap coordinating endoderm and mesoderm diversification during foregut organogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biorxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/756825	査読の有無 無
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 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 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------