

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03693

研究課題名（和文）1細胞解像度で知る気道の発生とヒト気道オルガノイド開発

研究課題名（英文）Establishment of human airway organoid by understanding airway development in single-cell resolution

研究代表者

森本 充 (Mitsuru, Morimoto)

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・チームリーダー

研究者番号：70544344

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：マウス胎児の気道上皮と間充織組織の分化プロセスをscRNA-seqで解析し、E14.5で基底細胞の早期運命決定とTGFβ遺伝子の上昇が基底細胞分化を促すことを発見。TGFβシグナルがId遺伝子発現抑制により細胞周期を抑制し、分化を始めることも明らかに。組織再生研究では、傷害後の基底細胞内Id遺伝子上昇による細胞増殖開始を示し、発生と逆の分子動態による組織再生を示唆。ヒトES細胞から気管組織分化誘導を試み、内胚葉由来臓器の間充織組織誘導プロトコルを確立し、ヒト気管間充織組織の軟骨細胞、平滑筋細胞誘導に成功。現在は上皮細胞との共培養条件の検討中。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究成果は、次のような分野への波及効果が期待されます。（1）気道疾患の治療法の開発：気道上皮および間充織の分化プロセスの理解を深めることで、気道疾患の治療法の開発が可能となります。例えば、気道再生療法や気道再建手術などの治療法に直接応用できます。（2）幹細胞療法の発展：組織幹細胞や間充織細胞を用いた幹細胞療法の開発に役立ちます。特に、気道再生や肺再生における幹細胞療法の進歩が期待されます。総合的に、本研究は気道および肺の生物学的理解に加えて、疾患治療や再生医療の進歩に向けた重要な基盤を提供することが期待されます。

研究成果の概要（英文）：The study examined fetal mouse airway epithelium and mesenchymal tissue differentiation at a single-cell level via scRNA-seq. Key findings include early fate decisions in basal cells at E14.5, driven by TGFβ upregulation and subsequent cell proliferation decrease. TGFβ signaling induced differentiation, delayed in TGFβ receptor-deficient epithelia. Injury studies revealed reversal of developmental dynamics in tissue regeneration. Additionally, distinct origins for tracheal cartilage and smooth muscle were identified. A protocol for inducing tracheal mesenchymal tissue from human ES cells was established. Further research focuses on optimizing co-culturing conditions with epithelial cells.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：呼吸器 気道 発生学 幹細胞 オルガノイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

呼吸器の発生再生分野では、研究の積み重ねにより気道上皮の発生、分化に重要な遺伝子や細胞間シグナルが多くわかってきた。一方で、得られた知識は細胞集団を一体として捉え、因果論的な理解にとどまっており、複合的な多細胞組織を1細胞動態から統合理解に理解するアプローチが不足していた。そして、多能性幹細胞からの分化誘導系を用いた再構成論的な解析による概念の実証が必要だと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウス気道発生原理を1細胞解像度の分子機構で理解し、その知識を利用したヒト多能性幹細胞からのヒト気道の再構成によるヒト気道発生機構の解明、最終的に上皮-間充織相互作用を検証できるヒト気道オルガノイドの開発を試みることを目的とする。

### 3. 研究の方法

研究代表は呼吸器の発生、再生研究に第一人者である。最近ではそれらの知識を活かしてヒト多能性幹細胞から気管の組織を誘導する技術の開発にも成功している。そのような背景を活かし、本研究ではマウス胎児の気道上皮、および間充織組織の分化プロセスを、scRNAseq を使って1細胞解像度で解析し、マウス発生工学で機能を検証する。特に上皮間充織相互作用に着目した解析を行う、気管間充織細胞の極性化の制御機構を解明する。ヒト iPS 細胞からの再構成論的アプローチにより、細胞間相互作用のコンセプトを検証する。最終的に組織間相互作用を再構成し、ヒト気道オルガノイドを開発する。

### 4. 研究成果

先行研究で行った E12.5~18.5 のマウス胎児の気管上皮細胞を使った、時系列を追った single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) 解析データをもとに、E14.5 以降に前駆細胞から全4種類の上皮細胞種が出現するまでの転写ネットワークの変遷を詳細に解析した。その結果、Tgf シグナルと Id 遺伝子の基底細胞分化に沿った特徴的な変動が観察された。Tgfbr および Id2 遺伝子のノックアウトもしくは過剰発現マウスを用いて、基底細胞におけるこれら遺伝子の機能、特に発生期と成体の再生現象における役割を解析した。TGFb 受容体欠損上皮では基底細胞の分化のタイミングが遅れることが示された。この知見を組織再生研究に発展させ、成体マウスの気道損傷再生研究を行った。気道上皮が傷害を受けると組織幹細胞である基底細胞内に Id 遺伝子が上昇して細胞増殖が始まることがわかった。すなわち、発生とは逆の分子動態により組織再生を行っていた。Id 遺伝子を過剰発現した気道上皮では、損傷後に基底細胞の増殖が早期に始まることが示された。これらの研究成果をまとめて、Developmental Cell 誌に報告した。

同時に、発生中の気管平滑筋細胞を時系列に回収し、上皮と同様に1細胞転写解析を行った。現在データ解析を進めており、分化プロセスの全体像を記述的に明らかにする研究を進めた。特にその中で気管平滑筋および気管軟骨前駆細胞の分化に必要な転写因子と細胞間シグナルを同定するための解析を進めた。Cre マウスを使った細胞系譜解析から、気管軟骨と気管平滑筋の起源が明確に異なること、また気管軟骨と気管間充織組織が共通の由来を持つことがわかった。これらの研究成果については現在の研究を進めており、近いうちに学術誌で報告する予定である。

ヒト多能性細胞から気道上皮細胞の分化誘導実験を行った。これまでに、内胚葉 前腸

呼吸器前駆細胞を誘導し、呼吸器前駆細胞だけをセルソーターを使って単離、3次元培養を行い、成熟化を促すことに成功していた。今年度の研究から、気道上皮マーカーである Nkx2.1 陽性細胞がスフェア状に成長する様子を確認できた。スフェアの細胞が分化した気道上皮細胞のマーカー陽性細胞を含んでいることを免疫染色で確認した。一方で、呼吸器間充織組織をヒト多能性幹細胞から分化誘導する研究にも取り組んだ。米国シンシナティ小児科病院の研究者と共同研究を行いながら、前腸由来臓器の間充織組織を誘導するプロトコルを確立し、さらにヒト気管間充織組織の軟骨細胞、平滑筋細胞を誘導することに成功した。これらの成果は2報の Nature Communications 誌、1報の Nature Protocols 誌に報告した。現在は上皮細胞との共培養の条件検討を続けている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Keishi Kishimoto, Kentaro Iwasawa, Alice Sorel, Carlos Ferran-Heredia, Lu Han, Mitsuru Morimoto, James M Wells, Takanori Takebe, Aaron M Zorn	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 Hirofumi Kiyokawa, Akira Yamaoka, Chisa Matsuoka, Tomoko Tokuhara, Takaya Abe, Mitsuru Morimoto	4. 巻 56
2. 論文標題 Airway tissue stem cells reutilize the embryonic proliferation regulator, Tgf -Id2 axis, for tissue regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 1917-1929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2021.05.016	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 Hirofumi Kiyokawa, Mitsuru Morimoto	4. 巻 250
2. 論文標題 Molecular crosstalk in tracheal development and its recurrence in adult tissue regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1552-1567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.345	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, Morimoto Mitsuru	4. 巻 148
2. 論文標題 Mammalian tracheal development and reconstruction: insights from <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> studies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 ND
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, Furukawa Kana T., Luz-Madrigal Agustin, Yamaoka Akira, Matsuoka Chisa, Habu Masanobu, Alev Cantas, Zorn Aaron M., Morimoto Mitsuru	4. 巻 11
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 1-12
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 Han Lu, Chaturvedi Praneet, Kishimoto Keishi, Koike Hiroyuki, Nasr Talia, Iwasawa Kentaro, Giesbrecht Kirsten, Witcher Phillip C., Eicher Alexandra, Haines Lauren, Lee Yarim, Shannon John M., Morimoto Mitsuru, Wells James M., Takebe Takanori, Zorn Aaron M.	4. 巻 11
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 1-16
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

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 森本 充
2. 発表標題 Trachea Development and Reconstruction
3. 学会等名 CLEAR Consortium Annual Symposium 2021 (米国 オンライン) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本 充
2. 発表標題 気管細胞の起源の発見と、その分子的理解からヒト気管の再建への挑戦
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本 充
2. 発表標題 Trachea Development and Reconstruction
3. 学会等名 The Taiwanese Society of Developmental Biology 2021:International Conference of Developmental Biology, Stem Cells and Regenerative Medicine.(台湾 オンライン) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本 充
2. 発表標題 幹細胞研究からオルガノイド開発、そして肺疾患解析へ、
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本 充
2. 発表標題 Airway tissue stem cells reutilize the embryonic proliferation regulator, Tgf -Id2 axis, for tissue regeneration.
3. 学会等名 The 25th congress of the Asian Pacific Society of Respiology; Emerging Talent Symposia. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本 充
2. 発表標題 Airway tissue stem cells reutilize the embryonic proliferation regulator, Tgf -Id2 axis, for tissue regeneration.
3. 学会等名 FUSION conference; Epithelial Stem Cell - Niche Interactions in Lung.(イギリス オンライン) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本 充
2. 発表標題 1細胞解像度で見る呼吸器細胞パターンニング
3. 学会等名 第5回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森本 充
2. 発表標題 1細胞解像度で見る呼吸器幹細胞の発生
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森本 充
2. 発表標題 1細胞解像度で見る呼吸器幹細胞の発生
3. 学会等名 第56回日本周産期・新生児医学会学術集会 教育講演（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsuru Morimoto
2. 発表標題 Wnt signaling confers tracheal identity in mouse and human
3. 学会等名 From Stem Cells to Human Development, the Company of Biologist. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森本 充
2. 発表標題 Wnt signaling confers tracheal identity in mouse and human
3. 学会等名 Wnt研究会2021
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

プレスリリース マウス胎児の中に見つけた呼吸器再生のヒント  
[https://www.riken.jp/press/2021/20210615\\_1/index.html](https://www.riken.jp/press/2021/20210615_1/index.html)  
 理化学研究所 呼吸器形成研究チーム  
<https://lungdev.riken.jp/>  
 呼吸器の発生をつかさどるメカニズムの解明 - 発生現象の発見に基づくES細胞から気管組織の作出へ -  
[https://www.riken.jp/press/2020/20200827\\_2/index.html](https://www.riken.jp/press/2020/20200827_2/index.html)  
 ES/iPS細胞からのヒト臓器の間充細胞作製法 - 正常な臓器形成の理解に基づく臓器細胞の作出 -  
[https://www.riken.jp/press/2022/20220818\\_1/index.html](https://www.riken.jp/press/2022/20220818_1/index.html)

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