

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03741

研究課題名（和文）肺臓器移植を目指した異種間胚盤胞補完法による肺臓器創出と肺欠損大型モデルの開発

研究課題名（英文）Generation of lungs by blastocyst complementation in interspecific setting using ES cells

研究代表者

周 ケイリョウ（ZHOU, Qiliang）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：10770232

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、肺臓器を欠損するFgf10 Ex1mut/Ex3mut 複合ヘテロマウスを開発し、Fgf10欠損の胚盤胞にGFP発現マウスES細胞を移入し、マウスの生体内においてGFP陽性ES細胞由来する肺臓器の作出に成功した。ヒトへの移植を前提とした異種間肺臓器作出方法技術の確立を目指し、異種間の設定でvenus陽性ラットES細胞をFgf10欠損マウス胚盤胞に移入し、マウス生体内にラットES細胞由来の肺臓器の作出に成功している。ラットES細胞にレスキューされたFgf10欠損のキメラ産仔を解析したところ、肺の実質部分（肺胞上皮細胞）、間質部分において優位にvenus陽性ES細胞由来であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの重症肺疾患においては肺移植しか救命の道がない。しかし、絶対的なドナー不足と移植後の免疫拒絶が深刻な問題となる。多能性幹細胞を用いる肺臓器作成ができれば、上記問題の克服が可能となる。本研究は同種間胚盤胞補完法を用いるin vivoでの肺再生技術を発展させ、異種間キメラでの肺臓器作製に成功している。さらに大型動物における肺臓器創出技術の確立への展開することにより、今後肺移植を目指すための肺臓器再生研究または肺疾患解明や新薬開発のためのモデル動物開発に大きく貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in the generation of lungs using mouse embryonic stem cells (ESCs) in apneumatic Fgf10 Ex1mut/Ex3mut mice by blastocyst complementation. Then, we show that rat ESCs can rescue the lung organization in mouse by interspecific blastocyst complementation. Lungs in the chimera mouse were efficiently derived from the venus positive rat ESCs. An interspecific blastocyst complementation method using chimeric animals may be useful as a way to create lung in animals.

研究分野：再生医学

キーワード：肺再生 胚盤胞補完法 多能性幹細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの重症慢性肺疾患において肺移植しか救命の道がない。しかし、絶対的なドナー不足が深刻な問題となり、移植待機患者の約 6 割が待機中に死亡に至っている。ドナー不足の継続が予想され、今後も待機患者数が増え続けていく中、新たな解決策が望まれる。また、移植後の免疫拒絶及びそれに伴う合併症が術後死亡にもつながる。多能性幹細胞を用いて肺臓器の作成ができれば、上記問題の克服が可能となる。

(2) 多能性幹細胞による *in vitro* 肺再生研究： ES 細胞や iPS 細胞から 2 次元プロセスでの肺上皮細胞や気道上皮細胞への分化誘導法が複数報告されている。また、ヒト iPS 細胞から肺オルガノイドの作製方法も確立しつつある。臓器レベルでは、バイオリアクター装置を用いた脱細胞化スキャフォールドによる肺臓器再生が報告され、一時的なガス交換機能を示している。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り、*in vitro* での移植に耐える肺臓器の再構築は極めて難しいと考えられている。

(3) 胚盤胞補完法を用いた *in vivo* 臓器再生： 胚盤胞補完法は、特定の細胞を作る能力を欠損した動物の胚盤胞に正常な多能性幹細胞を注入することで、欠損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、中内啓光博士の研究グループはゲノム編集により脾臓を欠損させたマウス/ラットの生体内において異種の多能性幹細胞に由来する脾臓を作ることに成功した。同様に腎臓の作成にも成功しているが、モデル動物は成獣までの生存は確認できなかった。本研究は肺臓器そのものの創出を目指し、肺発生に非常に重要である Fgf10 とその主な受容体である Fgfr2 シグナルに注目し、肺上皮のみならず間葉系の発生にも必須な Fgf10 遺伝子をノックアウトし、胚盤胞補完法を用いてマウス生体内で ES 細胞由来肺臓器の創出ができるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究は、異種間胚盤胞補完法を用いて、ヒトへの移植を前提とした異種間肺臓器作出方法技術の確立を目指すものである。我々は既に、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集法で肺臓器を欠損する Fgf10 Ex1mut/Ex3mut マウスを開発し、胚盤胞補完法にてマウスの生体内に GFP 陽性 ES 細胞に由来する機能的肺臓器の作出に成功している。次の段階として、異種間の設定でラット ES 細胞を Fgf10 欠損マウス胚盤胞に移入し、マウス生体内にラット ES 細胞由来の肺臓器の作出を目指す。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 システムを用いて Fgf10 Ex1 ヘテロマウスと Ex3 ヘテロマウスをそれぞれ作成する。

(2) Fgf10 Ex1 ヘテロマウスと Ex3 ヘテロマウスを掛け合わせることによって、Fgf10 Ex1mut/Ex3mut 複合ヘテロマウスの胚盤胞を得る。

(3) Fgf10 Ex1mut/Ex3mut 複合ヘテロマウスの胚盤胞に venus 陽性ラット ES 細胞を注入し、偽妊娠マウスの子宮に戻し、キメラマウスを作成する。

(3) Fgf10 Ex1mut/Ex3mut 複合ヘテロマウス胚盤胞に由来するキメラマウスにおいて、再生された臓器肺がどこまで発育したか、正常な肺組織であるかを組織学的に評価する。各種細胞(気道上皮細胞、肺胞上皮細胞、間質細胞、血管内皮細胞等)は理論通りにドナーの rat ES 細胞由来かを venus と各細胞マーカーを使って免疫蛍光 2 重染色を用いて詳細に解析する。

4. 研究成果

(1) Fgf10 Ex1mut/Ex3mut 複合ヘテロマウス胚盤胞がラット ES 細胞により補完されるのかを検証するため、venus 陽性ラット ES 細胞をマイクロインジェクションした胚盤胞胚を偽妊娠マウスの子宮に戻し、異種間キメラマウスを作成した。異種間においてもキメラマウス作成が可能であることを確認した。venus 陽性ラット ES 細胞を移入した 1123 個の Fgf10 Ex1-/+ x Ex3-/+ 胚盤胞胚を偽妊娠マウス子宮に着床させ、246 匹(21.9%)の産仔が得られた。中に、13 匹(5.3%)の産仔が出生時に venus 陽性(キメラ)で、うち 5 匹が Fgf10 Exon1/Exon3 複合ヘテロ胚盤胞由来であった (Table1)。

Table 1. Results of blastocyst complementation for lung generation

Analysis stage	Blastocyst transferred	Neonates	Chimeric fetuses	Genotype			Lung complemented
				wild/wild	Ex1 or Ex3 hetero	compound hetero	
Neonate	1123	246 (21.9%)	13 (5.3%)	3	5	5	5 (100%)

上記結果により異種間胚盤胞補完法を用いてラット ES 細胞によるキメラマウスの作製が可能であることを示した。

(2) venus 陽性ラット ES 細胞からの寄与を立体蛍光顕微鏡にて確認した。Fgf10 Ex1mut/Ex3mut 複合ヘテロキメラマウスにおいては、全体的に強い venus 発現を認め、肺組織の形成も認められた (Figure 1)。ただし、作成された肺のサイズは小さめで、肺葉形成も不完全であった (Figure 2)。

Figure 1.

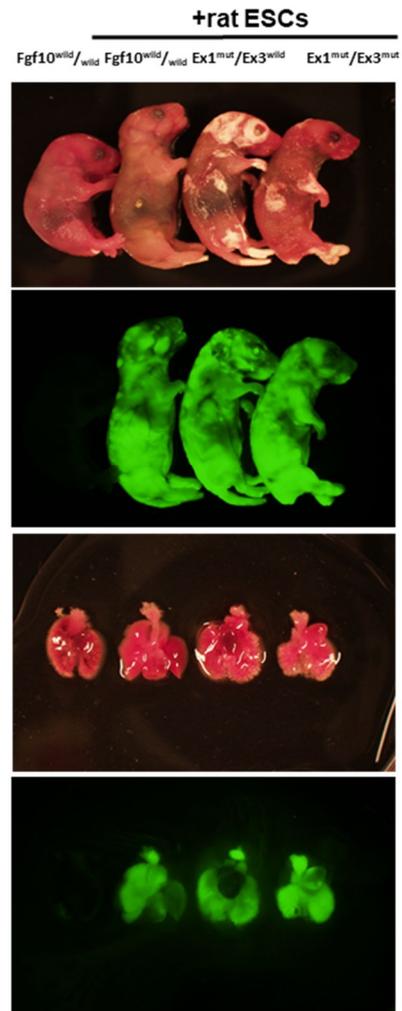
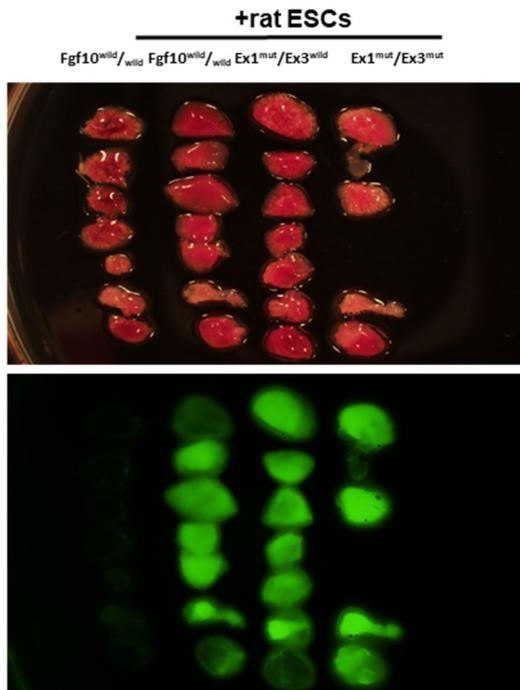
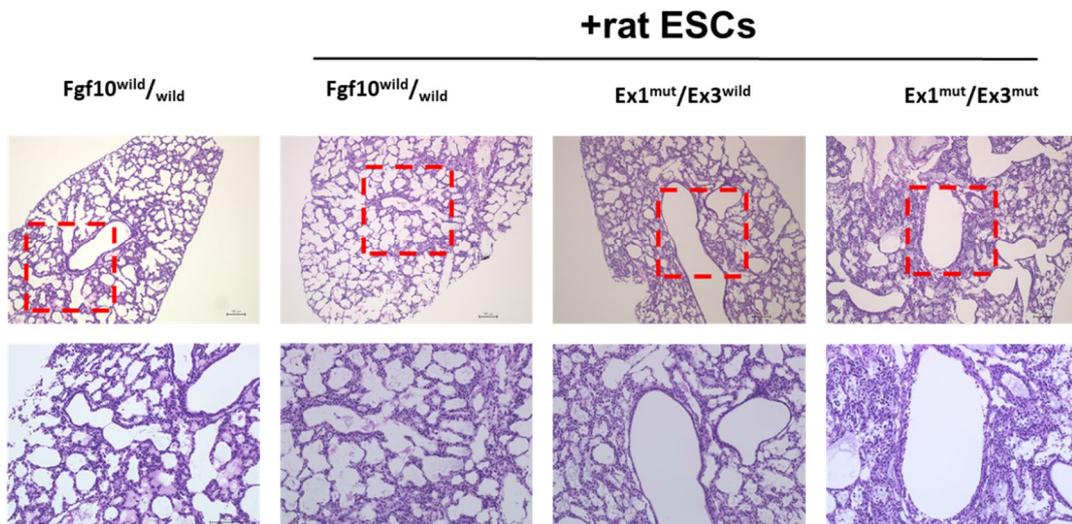


Figure 2.



(3) Fgf10 複合ヘテロ胚盤胞由来のキメラマウスにおける再生された肺臓器を HE 染色でさらに解析を行った。H E 染色では、複合ヘテロ胚盤胞由来のキメラマウス肺葉組織は気管支、肺胞、血管の形成が確認され、明らかな組織学的な異常を認めなかった (Figure 3)。

Figure 3.



(4) Fgf10 複合ヘテロ胚盤胞由来のキメラマウスにおける再生された肺臓器を各種肺組織のマーカーおよび venus の発現について二重蛍光染色で詳しく解析した。肺の実質部分(Ⅰ型肺胞上皮細胞、Ⅱ型肺胞上皮細胞、クララ細胞)が優位に venus 陽性ラット ES 細胞由来であることをしめした (Figure 4)。また、肺臓器の間質部分 (血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、傍気管平滑筋細胞、結合組織) においても大部分が GFP 陽性 ES 細胞由来であることを確認した (Figure 5)。

Figure 4.

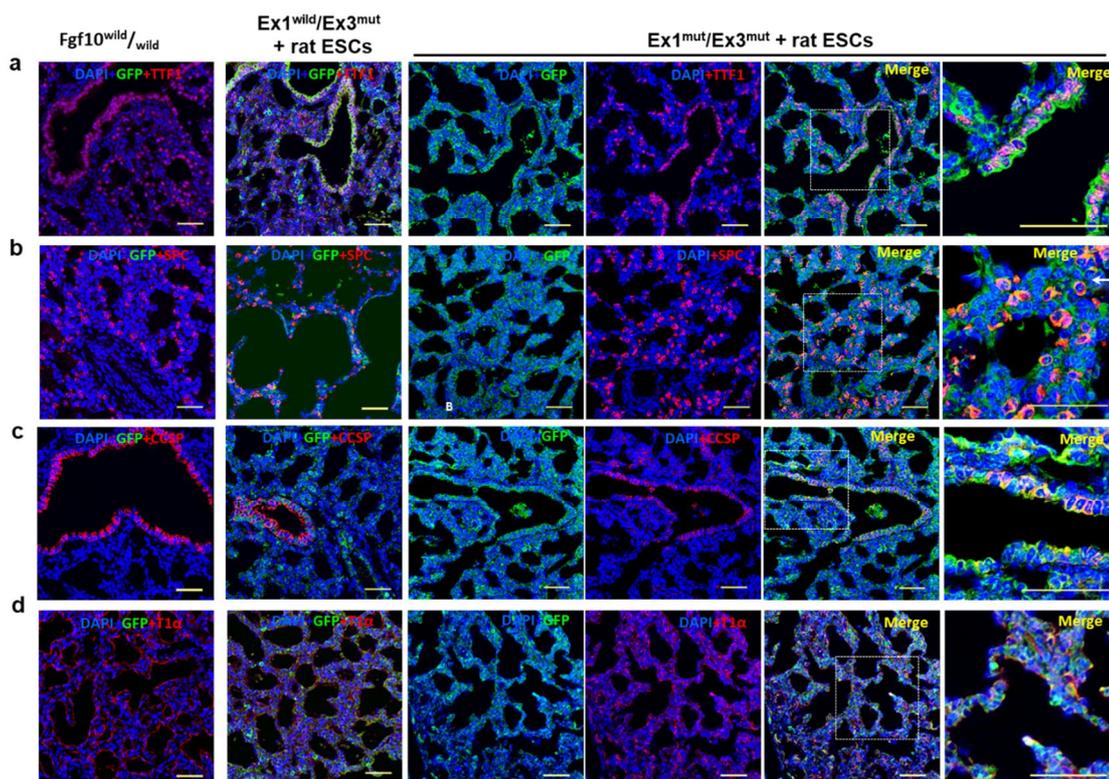
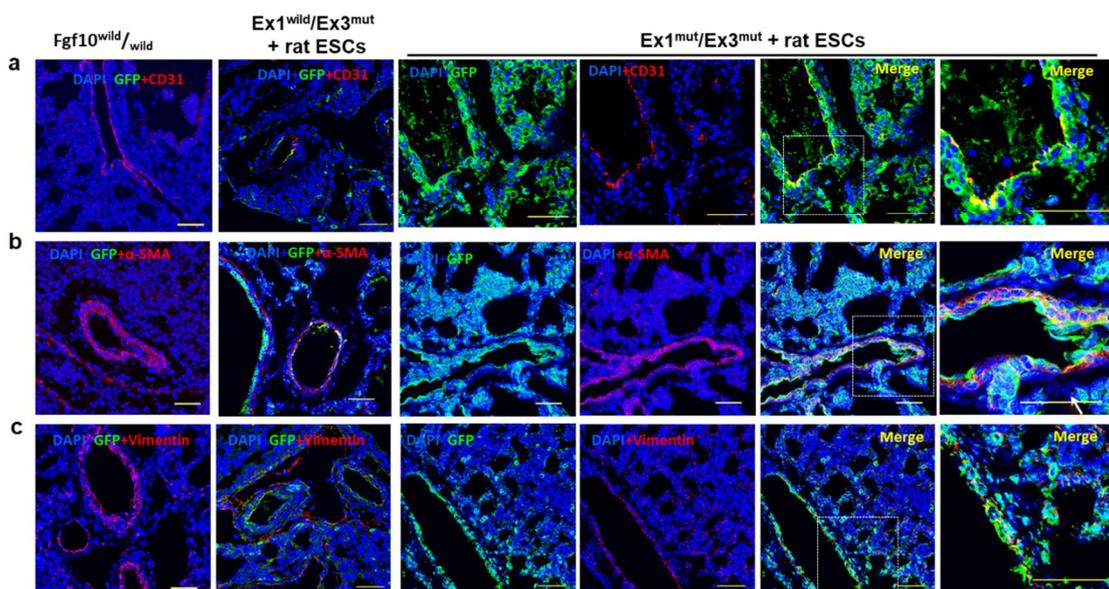


Figure 5.



これらの結果から、Fgf10 複合ヘテロ胚盤胞由来のキメラマウスにおいて、レスキューは不十分ではあるが、優位にラット ES 細胞由来の肺臓器の作出したことを示した。また Fgf10 複合ヘテロ胚盤胞におけるラット ES 細胞によるキメラマウス作成の効率が低く、さらなる改良が必要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ran Qingsong, Zhou Qiliang, Oda Kanako, Yasue Akihiro, Abe Manabu, Ye Xulu, Li Yingchun, Sasaoka Toshikuni, Sakimura Kenji, Ajioka Yoichi, Saijo Yasuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Generation of Thyroid Tissues From Embryonic Stem Cells via Blastocyst Complementation In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	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） 10.3389/fendo.2020.609697	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 Kitahara Akihiko, Ran Qingsong, Oda Kanako, Yasue Akihiro, Abe Manabu, Ye Xulu, Sasaoka Toshikuni, Tsuchida Masanori, Sakimura Kenji, Ajioka Yoichi, Saijo Yasuo, Zhou Qiliang	4. 巻 31
2. 論文標題 Generation of Lungs by Blastocyst Complementation in Apneumic Fgf10-Deficient Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107626 - 107626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.107626	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 冉慶松, 周啓亮, 小田加奈子, 泰江彰浩, 阿部学, 笹岡俊邦, 崎村健司, 味岡洋一, 西條康夫
2. 発表標題 胚盤胞補完法とES細胞を用いた甲状腺再生
3. 学会等名 日本再生医療学会総会(Web)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Qiliang Zhou and Yasuo Saijo.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 432
3. 書名 iPSCs in Tissue Engineering.	

〔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
研究分担者	笹岡 俊邦 (Sasaoka Toshikuni) (50222005)	新潟大学・脳研究所・教授 (13101)	
研究分担者	土田 正則 (Tsuchida Masanori) (60293221)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	小田 佳奈子 (Oda Kanako) (60708212)	新潟大学・脳研究所・助教 (13101)	
研究分担者	中務 胞 (Nakatsukasa Ena) (60641579)	新潟大学・脳研究所・助教 (13101)	削除：2021年3月24日
研究分担者	泰江 章博 (Yasue Akihiro) (80380046)	徳島大学・病院・講師 (16101)	削除：2021年2月4日

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