

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21894

研究課題名（和文）肺組織分化技術の効率化と遺伝子治療技術の開発

研究課題名（英文）Improvement of the lung tissue differentiation method and development of the gene therapy technology

研究代表者

栗崎 晃（Kurisaki, Akira）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：60346616

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、肺前駆細胞を作製する新たな方法を開発することで、再生困難な肺組織を作り出す前駆細胞材料の新たな調製方法を検討した。まず肺前駆細胞の生成を蛍光で確認するための改良版 Nkx2.1-Venus レポーターマウスを作製した。次に、このマウスから調製した線維芽細胞を用いて肺前駆細胞の作製条件を改善した。さらに、肺前駆細胞の作製効率を向上させる追加因子についても検索し、その効果の再現性を検証中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺気腫や慢性気管支炎などの慢性閉塞性肺疾患(COPD)はタバコの煙などの有害物質を長期に吸入することで発症する肺の炎症性疾患であり、咳や喀痰、息切れなどで慢性呼吸不全を伴いQOLが低下する難治疾患で、世界では年間300万人以上が死亡する。現在、本疾患には、気管支拡張剤や去痰剤の対症療法、酸素吸入による延命措置以外の方法はなく、増悪を防ぐ予防的対処法に頼るしかない不治の病である。本研究では、このような再生困難な肺組織を治療するための新しい細胞材料調製の基盤技術を開発しており、本方法を元に将来肺組織の再生技術へと発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated a new method of preparing cellular material to produce lung tissue. First, Nkx2.1-Venus reporter mice were generated to monitor the generation of lung progenitor cells by fluorescence. Next, we improved the culture conditions for the preparation of lung progenitor cells using fibroblasts prepared from these mice. We are also screening additional factors that improve the efficiency of lung progenitor cell production. We are currently validating the reproducibility of these effects in vitro.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：肺 遺伝子 分化

1. 研究開始当初の背景

肺がんや近年増加中の肺結核の後遺症に苦しむ患者は多く、死因の10%が肺疾患である。特に、肺気腫や慢性気管支炎などの慢性閉塞性肺疾患(COPD)はタバコの煙などの有害物質を長期に吸入することで発症する肺の炎症性疾患であり、咳や喀痰、息切れなどで慢性呼吸不全を伴いQOLが低下する難治疾患で、世界では年間300万人以上が死亡する。現在、本疾患には、気管支拡張剤や去痰剤の対症療法、酸素吸入による延命措置以外の方法はなく、増悪を防ぐ予防的対処法に頼るしかない不治の病である。

肺は毛細血管や平滑筋に加えて気管支上皮細胞や肺胞上皮細胞などの様々な細胞集団が組み合わされて構成された複雑な臓器であり、これら多様な細胞群を成体の肺組織と同レベルで作製できる方法はこれまでのところ存在しない。そもそも肺は自己再生能力が低く、自然治癒能力にも限りがあることが知られている。骨髄幹細胞の投与による肺再生も検討されているが効果は限定的であり、現在のところ上記肺疾患に対する有効な治療法は存在しない。これまでにES細胞やiPS細胞等の多能性幹細胞を用いて肺組織細胞を作製しようとする検討が行われているが、分化効率が十分高いわけではなく、また、肺組織は様々な細胞が存在することから、それらを作り分けることも容易ではない。

2. 研究の目的

本研究では、様々な肺の機能性上皮細胞の元となる肺の前駆細胞を作製する新たな方法を開発することで、再生困難な肺組織を作り出す細胞材料の新たな調製方法を検討した。

3. 研究の方法

我々はこれまでにマウス初期発生期の胚組織を材料にしてマイクロアレイ解析やバイオインフォマティクス解析を行い、発生期の肺前駆細胞で発現する5つの転写因子が肺前駆細胞マーカーの発現誘導に有効であることを見出している。また、このようにして作製した肺前駆細胞様の細胞は弱いながらも分化能を示すことを確認している。これまでに、より分化能が高い肺前駆細胞を作製するため、肺前駆細胞マーカーであるNkx2.1が発現するとEGFPが発現するNkx2.1-2A-EGFPレポーターマウスを作製したが、EGFPの蛍光強度が弱く、レポーターとして使用できないことが判明した。そこで本研究では、Nkx2.1の発現をモニターできる改良版レポーターマウスを作製し、新規追加因子の探索を検討した。

4. 研究成果

改良型のNkx2.1レポーターマウスは、Cas9でES細胞のNkx2.1のストップコドン付近を切断し、Nkx2.1のATG下流に核移行シグナル配列を付加したVenusを挿入する発現ユニットを相同組換えで導入した。

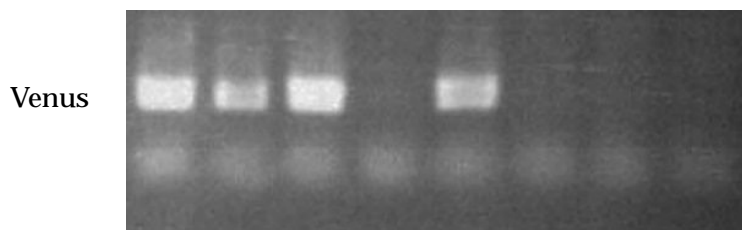


図1. 作製したNkx2.1レポーターキメラマウスのgenotyping結果(上)。

図2. 作製したNkx2.1レポーターのキメラマウスと仮親ICRマウス(右)。



作製したES細胞をpuromycinで選択し、Venus陽性クローンをを用いてキメラマウスを作製した。Venus特異的プライマーでgenotypingしてNkx2.1-Venusレポーターの存在を確認した(図1、図2)。

また、交配して作製した成体 Nkx2.1 レポーターマウスから肺を採取し、凍結組織切片を作製して Venus の発現を確認したところ、図 3 に示すように、肺胞上皮 II 型細胞と気管支上皮で緑色の蛍光を観察した。

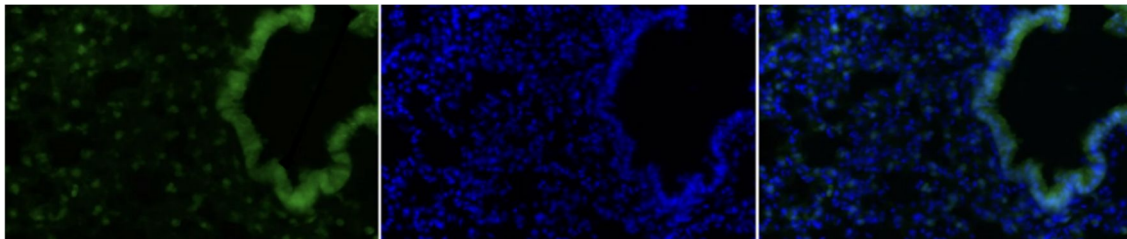


図 3 . 作製した Nkx2.1 レポーターマウスの肺組織切片の Venus の発現。DAPI (青) で核を染色。

このマウスから採取したレポーター線維芽細胞を用いて培養条件の再検討等を行った。線維芽細胞の種類について成体皮膚由来と新生児皮膚由来のものについて検討したところ、新生児皮膚の線維芽細胞は増殖が非常に良好であるものの、5 因子を導入しても肺前駆細胞マーカーの上昇はほとんど見られず、不定形の細胞塊を形成することが確認された。また、培地条件についても検討したところ、これまで添加していた p38 阻害剤を添加しない方が肺前駆細胞マーカーの発現が高いことが確認された。さらに、肺前駆細胞マーカーの発現を上昇させる新たな細胞増殖因子や低分子化合物を見出した。

次に、マウス胎児から採取した肺上皮細胞と線維芽細胞から作製した肺前駆細胞様の細胞の遺伝子発現を比較し、発現量が大きく異なる遺伝子群を検索した。これら因子の発現ベクターを作製し、上述の 5 因子に加えて新規追加因子候補の影響を検討した。現在肺前駆細胞作製促進効果が見られたいくつかの因子について促進効果の再現性を確認中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	高田 仁実 (Takada Hitomi) (80641068)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	

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