

令和 4 年 10 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310139

研究課題名(和文) 特異的前駆細胞移植による肺再生法の構築

研究課題名(英文) Development of a lung regeneration method with lung precursor cells

研究代表者

栗崎 晃 (Kurisaki, Akira)

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究チーム長

研究者番号：60346616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、特に肺の組織にのみ分化する肺の前駆細胞を安定的に調製する方法に関して研究を行った。肺の前駆細胞を作製するために使用する因子群については、発生期の肺の組織サンプルで特異的に発現する因子をマイクロアレイ解析とバイオインフォマティクス解析により絞り込むとともに、既に論文等で報告されている重要因子を候補に利用した。これらの候補因子を混合してマウス細胞に導入したところ、肺前駆細胞マーカーの発現の上昇が確認された。現在さらに、肺前駆細胞マーカーの発現を指標に因子の絞り込みを行っており、その性状の解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成体の肺組織はほとんど増殖していない組織であるが、傷害を受けて破壊されると組織の再生が行われる。しかし慢性的な損傷が繰り返されると、やがて組織の再生が困難となる。本研究では、肺組織のもととなる肺前駆細胞を作製する新たな方法を検討し、有望と思われる新規因子を同定した。現在、それらの因子を用いて作製した前駆細胞の有効性を検証しているところであり、肺組織再生技術への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have investigated a novel differentiation method of lung progenitor cells. We surveyed lung progenitor-specific genes and the novel factors have been selected with bioinformatic analysis of microarray data obtained from mouse embryonic organs and information previously published in the literatures. With the combination of these factors, we observed increased expression of some lung-progenitor specific marker genes. We are further selecting the factors and validating their characters from the view point of lung-specific marker gene expression.

研究分野：複合新領域

キーワード：再生医学 幹細胞 呼吸器 肺 前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

2006年にマウスの分化した細胞から多分化能を持つ未分化ES細胞様の細胞(iPS細胞)を作製することが可能であることが報告され、翌年にはヒト細胞でもiPS細胞が作製可能であることが確認された。iPS細胞の発明は、ES細胞が抱えていた倫理的問題や再生医療に応用する際に直面する移植時の免疫拒絶の問題を解決し、大きな研究の進展が成し遂げられた。しかし、実際にはこのようなiPS細胞を材料にしても、未だ分化のしくみが十分解明されていない多くの分化段階を試行錯誤でコントロールしながら目的細胞を作製するのは容易なことではない。特定の細胞について初期胚から成体までの発生段階を試験管内で再現しつつ、多段階の分化制御を完全にコントロールし定量的な分化細胞を調製するのは現状では困難な作業である。とりわけ、リーズナブルなコストと十分な完成度で目的分化細胞を調製するには、現時点では多くの技術的課題を解決する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

そもそも成体の細胞を発生過程の最も初期の状態にあるiPS細胞へわざわざ初期化して、再びそれをゼロから慎重に分化させて目的細胞へと戻す方法は、考えてみると非常に遠回りな方法に思われる。その代替案として、本研究では目的組織にのみに分化する組織前駆細胞を作製する新たな作製方法について検討する。特に、本課題では、肺組織細胞を例に開発を試みる。本研究で肺の組織にのみに分化する肺の前駆細胞が安定的に調製できるようになれば、多くの技術的問題を迂回して、再生医療や創薬応用可能になるかもしれない。

3. 研究の方法

本研究では特に肺の前駆細胞を用いた組織再生をモデルに研究を行う。肺の前駆細胞を

構築する因子群については、発生期の肺の組織サンプルを材料にしてマイクロアレイ解析とパイオインフォマティクス解析により特異的因子候補を絞り込む。また、既に論文等で報告されている重要因子についても、適宜候補因子として取り込む。これらの因子を発現ベクターにサブクローニングし、マウス細胞に導入して肺前駆細胞マーカーの発現を上昇させることができるか検討を行った。特に、定量的RT-PCRや免疫染色により様々な組み合わせで検討を行い、比較定量的ことで必要な因子を絞り込んだ。これら因子を導入後、肺前駆細胞と思われる細胞を分離し、マイクロアレイ解析でその分化程度を網羅的に検討するとともに、各組織のマーカー遺伝子発現についてもその特異性を検討した。また、さらに終末肺組織へと分化する能力があるかについても *in vitro* および *in vivo* 実験により検討した。

4. 研究成果

マウス E11.5 日胚を材料に実体顕微鏡下で解剖し、消化管ごと取り出して、食道、胃、肺、腸の4つの部分を分離し回収した。精製した Total RNA を元に Agilent 社のマウス whole genome マイクロアレイを用いて各組織の遺伝子発現を網羅的に解析し、肺特異的に発現する遺伝子を絞り込んだ。この過程で、臓器形成期の胃特異的な遺伝子発現も解析し、新たな表面マーカーも同定した。また、肺癌マーカーとなりうるものがあるかについても検討も行った。上記肺特異的遺伝子に加えて、文献上、肺組織形成に重要と考えられているいくつかの因子を加えた合計 13 種類の遺伝子を元に研究をスタートさせた。マウス体細胞にこれら 13 種類の遺伝子を導入したところ、しばらくすると上皮細胞様の細胞集団が観察された。3週間後に Total RNA を回収し、肺前駆細胞マーカーの発現を指標に定量的 RT-PCR で解析したところ、13 種類の遺伝子

を導入すると、肺前駆細胞マーカーの発現が上昇する様子が観察された。そこで、13種類の遺伝子から肺前駆細胞の発現を指標に必須の因子の絞り込みを行い検討したところ、重要因子として6つの遺伝子を絞り込んだ。これらの6つの遺伝子を用いて作製した肺前駆細胞様細胞を培養したところ、*in vitro*でMuc5Ac陽性の粘液分泌細胞やAQP5陽性の肺胞上皮I型細胞へと分化した。また、腎皮膜下に移植してもAQP5陽性の肺胞上皮I型細胞へと分化する様子が確認された。現在、本6因子を用いて他のロットの細胞からも肺前駆細胞を作製可能か、検証を進めるとともに、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析や他の組織特異的マーカーを利用して、本当に肺前駆細胞を作製することができたのか、また、更なる遺伝子の組合せが可能かどうかについても検証を進めているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Novel cell surface genes expressed in the stomach primordium during gastrointestinal morphogenesis of mouse embryos. Noguchi TA, Ishimine H, Nakajima Y, Watanabe-Susaki K, Shigeta N, Yamakawa N, Wang PC, Asashima M, Kurisasi A. *Gene Expr Patterns*. 2012, 12(3-4): 154-163.

BMP signaling regulates the differentiation of mouse embryonic stem cells into lung epithelial cell lineages. Ninomiya N, Michiue T, Asashima M, Kurisasi A. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2013, 49(3):230-237.

Lipase member H is a novel secreted protein selectively upregulated in human lung adenocarcinomas and bronchioloalveolar carcinomas. Seki Y, Yoshida Y, Ishimine H, Shinozaki-Ushiku A, Ito Y, Sumitomo K, Nakajima J, Fukayama M, Michiue T, Asashima M, Kurisasi A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014, 443(4):1141-1147.

Prohibitin 2 regulates the proliferation and lineage-specific differentiation of mouse embryonic stem cells in mitochondria. Kowno M, Watanabe-Susaki K, Ishimine H, Komazaki S, Enomoto K, Seki Y, Wang YY, Ishigaki Y, Ninomiya N, Noguchi TA, Kokubu Y, Ohnishi K, Nakajima Y, Kato K, Intoh A, Takada H, Yamakawa N, Wang PC, Asashima M, Kurisasi A. *PLoS One*. 2014, 9(4):e81552.

[学会発表](計4件)

抑制型 Smad タンパク質は、マウス ES 細胞から脳室上皮繊毛細胞への分化を促進する

二宮 直登、西村 佑介、栗崎 晃、中西 未央、大沼 清、駒崎 伸二、石浦 章一、浅島 誠
平成 24 年産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会 2012 年 1 月 31 日 産総研中央講堂(茨城)

Regulatory factors for the differentiation of ciliated cells from mouse embryonic stem cells. Naoto Ninomiya, Yusuke Nishimura, Shinji Komazaki, Shoichi Ishiura, Makoto Asashima, Akira Kurisasi
10th annual meeting of International Society for Stem Cell Research, 2012 年 6 月 15 日 パシフィコ横浜(横浜)

BMP signaling regulates the differentiation of mouse embryonic stem

cells into lung epithelial cell lineages.

Naoto Ninomiya, Tatsuo Michiue, Makoto Asashima, Akira Kurisaki. 11th annual meeting of International Society for Stem Cell Research, 2013 年 6 月 14 日 Boston Convention and Exhibition Center (ボストン)

肺細胞の分化誘導法の構築

高田仁実、二宮直登、浅島 誠、栗崎 晃
平成 26 年産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会 2014 年 2 月 18 日 産総研中央講堂(茨城)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：肺前駆細胞の作製方法

発明者：二宮直登、浅島 誠、栗崎 晃

権利者：独立行政法人 産業技術総合研究所

種類：特許願

番号：特願 2014-103934

出願年月日：2014 年 5 月 20 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/scrc/ci/teams/temcell/index.html>

<http://tsukuba-organdev.sub.jp/index.php?FrontPage>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

栗崎 晃 (Akira Kurisaki)

産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究チーム長

研究者番号：60346616

(2)研究分担者

高田仁実 (Hitomi Takada)

産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究員

研究者番号：80641068

中島由郎 (Yoshiro Nakajima)

産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・特別研究員

研究者番号：30455430

(3)連携研究者

橋本 統 (Osamu Hashimoto)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：90317058