

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02817

研究課題名(和文)異種動物間キメラを用いた多能性幹細胞による肺臓器創出

研究課題名(英文)Generation of lung organ derived from rat ES cells in FGF10 deficient mice

研究代表者

西條 康夫 (Saijo, Yasuo)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：10270828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：FGF10遺伝子変異複合ヘテロマウスにマウスES細胞を移入したキメラマスを成獣まで飼育したマウス肺を解析した。得られた肺上皮細胞の80%以上はES細胞由来であった。一方、間質細胞は50%前後がES細胞由来であった。これらの研究成果はCell Rep. (2020 ;31:107626)に発表した。またFGF10遺伝子変異複合ヘテロマウスにラットES細胞を移入したキメラマスを作出した。キメラ率は低い、肺の発生が確認され、ラットES細胞により、肺発生が回復することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植の最大の課題は、提供臓器が足りないことである。多能性幹細胞由来の肺を作ることが出来れば、この課題は解決可能である。肺を欠損するマウスの発生初期の胚盤胞に、正常なES細胞を注入してマウス産仔を得た。このマウスには正常の肺が発生しており、肺細胞の大部分はES細胞由来であった。また、このマウスは成獣まで生きることが出来た。この研究は、肺を欠損する動物において多能性幹細胞由来の肺を作り出すことができることを示した研究成果である。この研究を更にすすめ大型動物でヒト多能性幹細胞由来の肺をくつことが理論上可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Blastocyst complementation enables the generation of transplantable organs from pluripotent stem cells (PSCs) in animal models. Pancreases and kidneys have been generated from PSCs via blastocyst complementation in rodent models. Here, we report the generation of lungs using mouse embryonic stem cells (ESCs) in aFgf10 Ex1mut/Ex3mut mice via blastocyst complementation. Complementation with ESCs enabled Fgf10-deficient mice to survive to adulthood without abnormalities. Not only the generated lung alveolar parenchyma, but also the interstitial portions including vascular endothelial cells, vascular and parabrachial smooth muscle cells, and connective tissues were largely originated from the injected ESCs. These data indicated that Fgf10 Ex1mut/Ex3mut blastocysts may provide an organ niche for lung generation, and blastocyst complementation could be applied as a viable approach to generating whole lungs.

研究分野：呼吸内科

キーワード：肺再生 胚盤胞補完法 ES細胞 異種間キメラ

## 1. 研究開始当初の背景

新たな治療法が必要な肺機能低下患者: 肺機能の著しい低下は生命危機に直結する。根本的治療として、肺移植しか救命の道がないが、脳死肺移植ではそのドナー不足は著しく、移植待機患者の約6割が待機中に死亡に至っている。また、生体肺移植ではドナーへの負担が非常に重い。

多能性幹細胞による肺上皮分化研究と肺再生: 多能性幹細胞であるES細胞やiPS細胞を用いた肺再生研究の一環として、2次元プロセスでES/iPS細胞から肺胞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(Stem Cell Reports 3:394-40 2014, 6:1-8 2016)。しかし、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る。その結果、移植に耐える肺臓器再生には、スキューフォールドの作成、大量の細胞培養技術、バイオリクター装置開発など、ハードルは非常に高い。ラット肺スキューフォールドにバイオリクターで肺上皮細胞を生着させ移植したと報告された(Nature Medicine 16:927-933, 2010)。また、ラット・ヒト肺スキューフォールドの血管に血管内皮細胞を移植生着させ、血管の再構築を示しているが(Nature Biotech 33:1097-1102, 2015)、移植に耐えるヒト肺の再構築には、超大量の細胞培養など様々な壁が存在する。

胚盤胞補完法を用いた in vivo 臓器再生: 胚盤胞補完法とは、特定の細胞を作る能力を欠損している動物の胚盤胞に正常な動物由来の多能性幹細胞を注入すると、欠損した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、中内博士のグループは遺伝的に膵臓を欠損するマウスの胚盤胞に、ラット iPS 細胞を注入することによって、マウスの生体内でラットの膵臓を作ること成功した(Cell 142:787, 2010)。更にこの研究を進展させ、ラット体内で作成されたマウス膵臓を糖尿病マウスに移植し、糖尿病の改善を報告し(Nature 542, :191-196, 2017)、ヒトへの応用を目指して、膵臓欠損ブタを作成している(PNAS 110: 4557-4562, 2013)。

### 研究課題の核心をなす学術的「問い」

本研究課題の最終目標は、ヒトに移植可能な成熟した肺臓器をヒト多能性幹細胞から作出することが可能かを検討することにある。既報に従い、肺欠損マウスに胚盤胞補完法を用いてラットの多能性幹細胞を移入し、ラット由来肺臓器が作出可能か、明らかにする。また、ラット由来肺臓器が、成熟する過程でマウスの免疫機構の攻撃を受ける可能性を解析する。この「異種動物間キメラによる肺臓器作出が可能か」の「問い」が「はい」であれば、今後大型動物への研究につながり、やがては、ヒト多能性幹細胞で作出した臓器を移植医療に応用可能となる。我々は既に Fgf10 の Exon1 を欠損するマウスを作成しており、この肺を欠損するホモ欠損マウスの胚盤胞に正常 Fgf10 遺伝子を持つマウス GFP 陽性 ES 細胞を移入することにより、ES 細胞由来の肺の作出に成功している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、3次元構造を有する機能的な臓器を胚盤胞補完法と異種動物間キメラ法で作出することである。本研究では、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集法で、短期間で肺を特異的に欠損した遺伝子改変マウスを作成した。この遺伝子改変マウスの胚盤胞に正常マウスES/iPS細胞を注入することにより、機能的肺を創出することにほぼ成功している。本研究では、ラットES細胞を導入してラット由来肺組織の作出に挑戦する。ラットES細胞で肺の作出が困難な場合、免疫不全マウスを使用する。3年間で、移植可能な成熟したラット肺臓器の創出を達成する。結果、以下の2点について、肺再生技術問題の克服に貢献し、かつ肺以外の大型臓器の再生技術の進歩に寄与することが期待される。

### ・移植可能な機能的肺臓器を創出できる

血液循環やガス交換が機能する肺臓器を、2次元培養細胞を基にしたバイオリクターで作出することや、臓器原基移植法で創出することは、これまで発表された研究成果を鑑みて、ほぼ不可能である。本研究で用いる胚盤胞補完法により、気管および大血管を有し、呼吸・循環機能をもつ移植可能な臓器としての肺を創出することが可能であることが証明できる。この技術を大型動物に応用することで、ヒトに移植可能なサイズの肺を創出する技術基盤が確立される。

### ・胚盤胞補完法と異種動物間キメラ法を用いたヒト臓器作出法の基盤技術の確立

本研究では、Fgf10 遺伝子変異肺欠損動物(Scientific Reports 4:5705, 2014)の胚を用いて胚盤胞補完法によりES/iPS細胞より肺組織を作成する。マウス/マウスのキメラでは細胞性免

疫は考慮しなくて良いが、ヒトを含め他の動物種の ES/iPS 細胞を導入するためには、細胞性免疫不全のマウスを使うことを検討する必要がある。事実、ラット体内におけるマウス肺の解析では免疫反応が報告されている。そこで本研究では、当該機能を担う遺伝子も遺伝子編集の技術を用いて同時に欠損させた胚を利用する。免疫不全と各組織を欠損させる遺伝子欠損と組み合わせることにより、様々な臓器や細胞をマウスで作出することが可能になる。したがって、本研究で確立を目指す技術基盤は、ヒト iPS 細胞を用いた移植研究に大きなブレークスルーをもたらせる。

### 3. 研究の方法

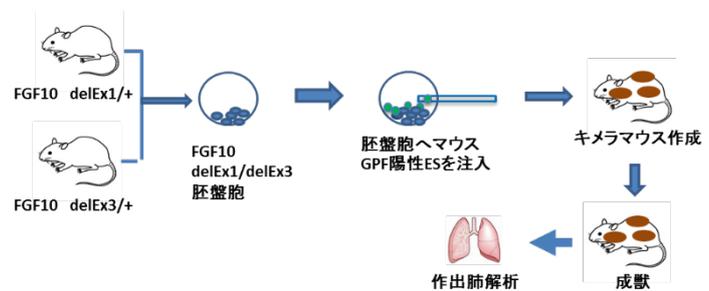
#### (1) Fgf10Ex1mut/Ex3mut 複合ヘテロマウスの作出

CRISPR/Cas9 法を用いて FGF10 エクソン 1 のヘテロマウス (FGF10Ex1mt/wt) とエクソン 3 のヘテロマウス (FGF10Ex3mt/wt) をライン化し、掛け合わせることで Fgf10Ex1mut/Ex3mut 複合ヘテロマウスを作出する。この複合ヘテロマウスの組織を解析し、肺が欠損していることを確認する。

#### (2) Fgf10Ex1mut/Ex3mut 複合ヘテロマウスにおけるマウス ES 細胞由来肺の作出

Fgf10 (delEx1) ヘテロ同士を交配して得られた Fgf10 ホモ欠失胚盤胞に、ES 細胞を注入しキメラを作成した。その結果、GFP 陽性産仔は全て四肢が存在し、病理所見より、肺の存在も確認され、胚盤胞補完法が機能していることが強く示唆された。その解析ゲノム解析の過程で、野生型 ES 細胞の混入より、Fgf10 がホモ欠失であることの証明に困難を生じた。

そこで、我々は、更に、Exon3 のヘテロ欠損マウスをライン化し、その複合ヘテロマウス Fgf10(delEx1)(delEx3) がホモ欠損マウスと同様に肺が欠損していることを確認した。これにより、キメラマウスが複合ヘテロマウス (肺欠損) であるかの確認は、Surveyor 法で、Exon1 と Exon3 領域の遺伝子変異の有無を確認することにより、容易に鑑別可能である。



そこで、この複合ヘテロマウス胚にマウス ES/iPS 細胞を注入し、肺の作出を確認する。

#### (3) Fgf10(delEx1)/(delEx3) 複合ヘテロマウスにおけるラット ES 細胞由来肺の作出

複合ヘテロマウス Fgf10(delEx1)(delEx3) に 1) と同様の手法を用い、GFP 陽性ラット ES 細胞を胚盤胞に移入し、異種動物間キメラを作成する。GFP 陽性ラット ES 細胞は研究指導している脳研究所崎村博士より供与される。移入細胞数や時期等の条件を検索し、至的条件を決める。

#### (4) 胚盤胞補完法による ES/iPS 細胞由来肺の解析

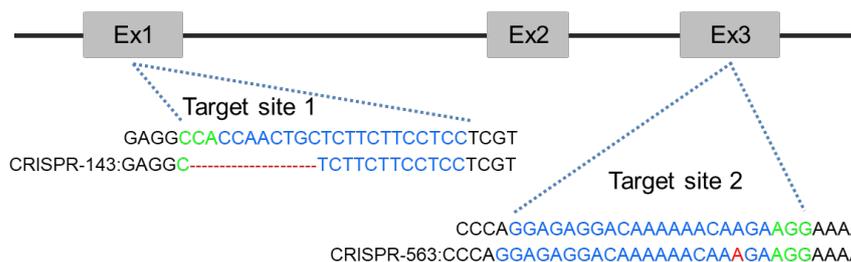
(1) および (2) の実験で作出したマウスを飼育し以下の小項目について検討する。

- ① 出生時肺は臓器として発生しているか、正常な肺組織であるかを組織学的に評価する。
- ② 臓器肺の各構造や各細胞はドナーの ES/iPS 細胞由来か、レシピエントマウス由来か、GFP を指標として詳細な病理学的解析を行う。右図は Fgf10 ホモ欠損マウスで作出したマウス GFP 陽性 ES 細胞由来肺であり、肺上皮細胞は全て GFP 陽性である。

### 4. 研究成果

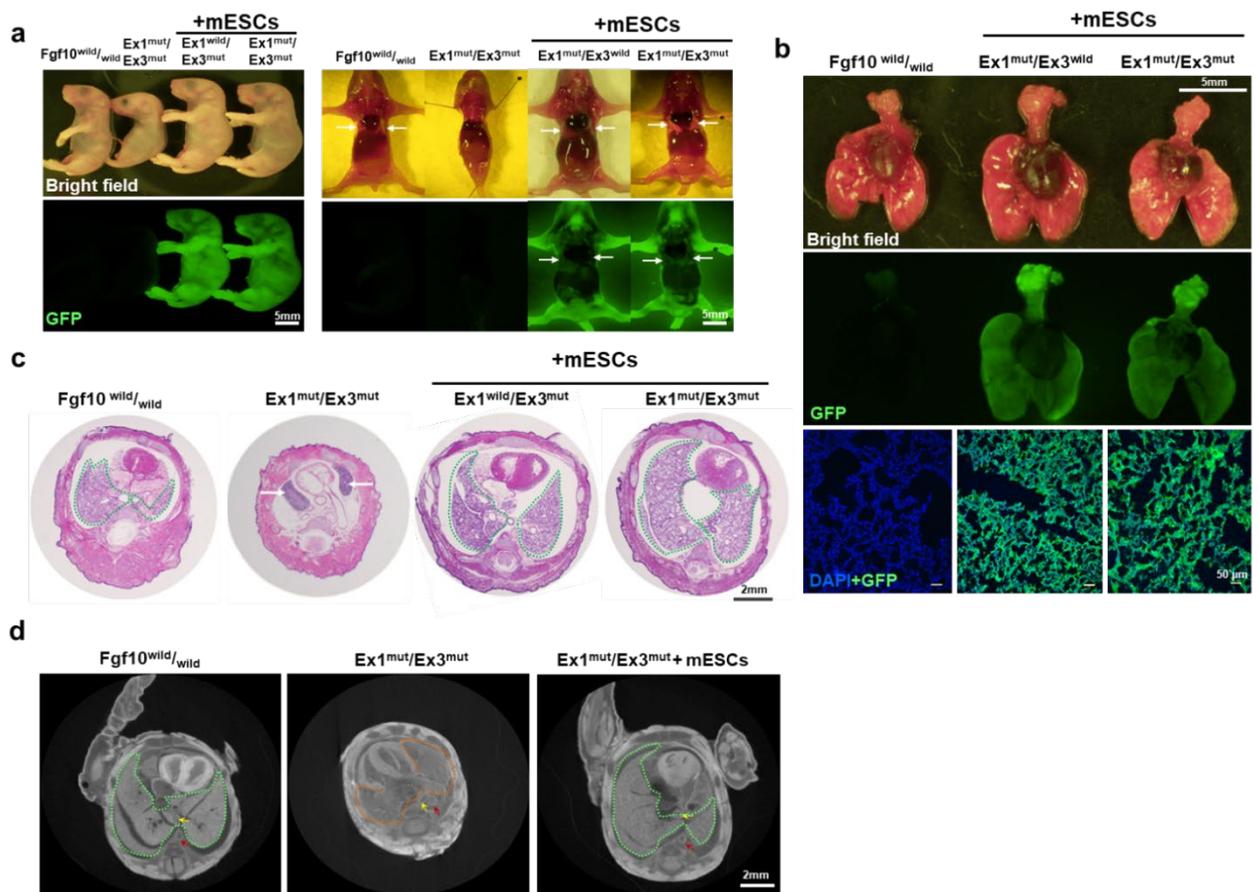
#### (1) Fgf10Ex1mut/Ex3mut 複合ヘテロマウスの作出

CRISPR/Cas9 法を用いて下図のように、Ex1 と Ex3 に遺伝子変異を導入し、それぞれのヘテロマウスをライン化した。

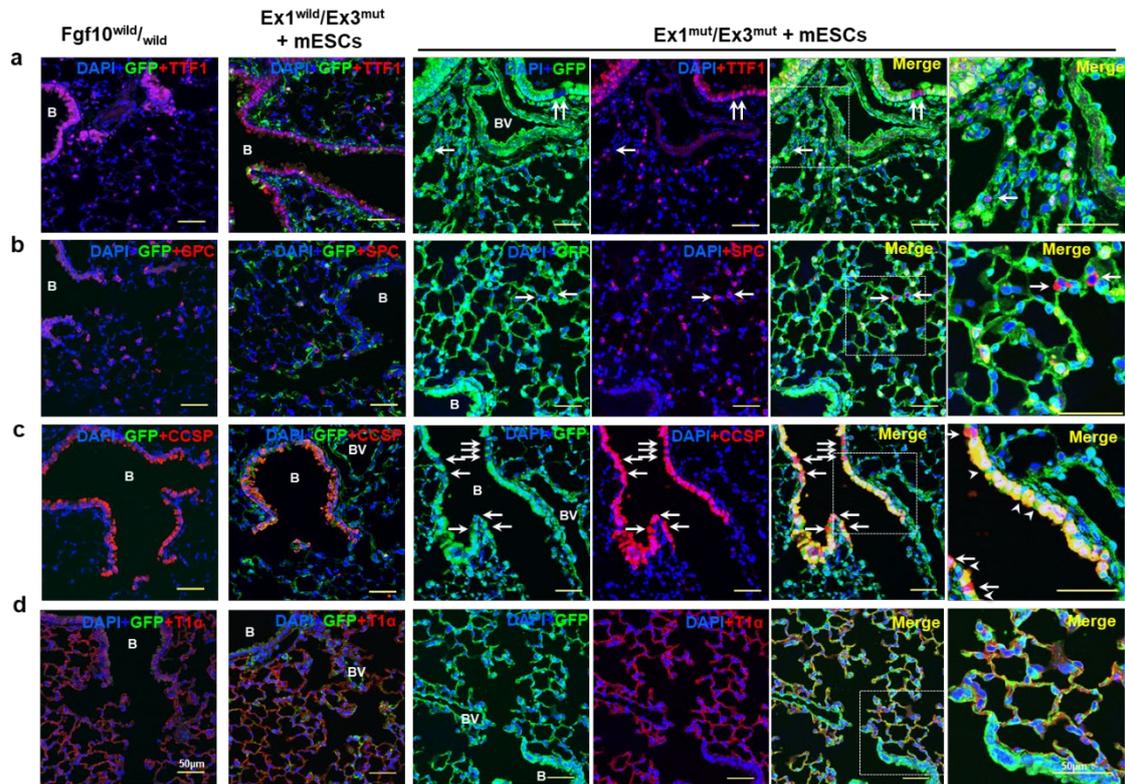


このヘテロマウスをかけわけて複合ヘテロマウス (Fgf10Ex1mt/Ex3mt) の産仔を得た。複合ヘテロマウスは四肢が欠損し (b)、CT (c) および肉眼 (d) と組織所見 (e) で肺欠損が確認された。生まれた産仔の各ゲノムタイプを検討すると、下表のように、メンデルの法則従い、25%が複合ヘテロであった。

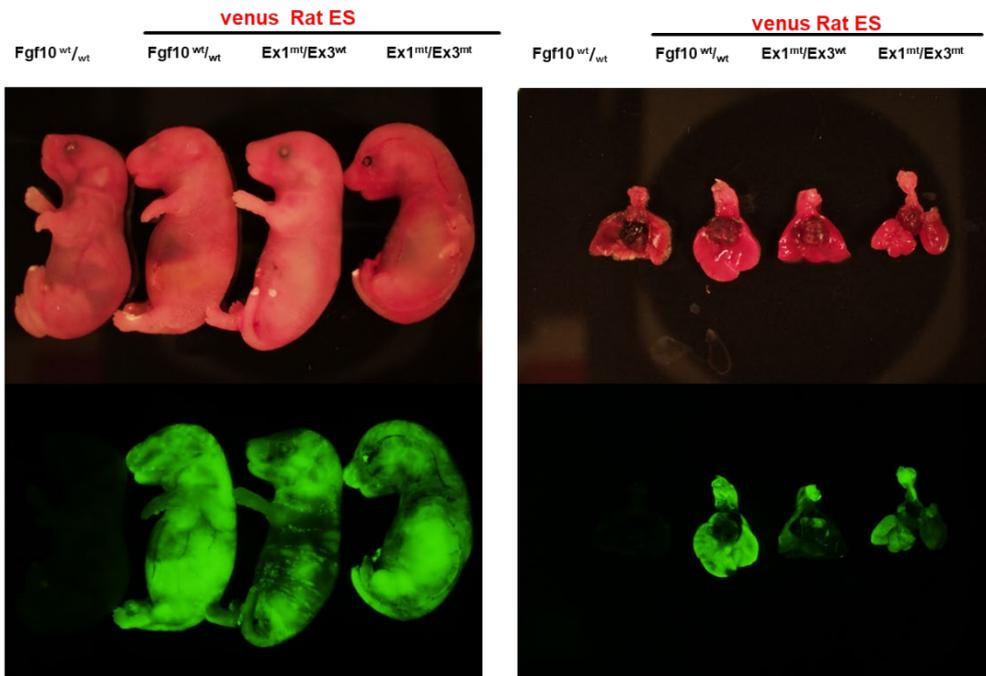
(2) FGF10Ex1mut/Ex3mut 複合ヘテロマウスにおけるマウス ES 細胞由来肺の作出  
 FGF10Ex1mt/wt 卵子と FGF10Ex3mt/wt 精子を人工授精させたあと、培養を継続し胚盤胞期に野生型マウス ES 細胞を移入した。その後偽妊娠マウス子宮に移植して産仔を得た。出生直後に安楽死させて、解析した。  
 GFP 陽性の有無でキメラを判定した。121 個胚盤胞を子宮に移植して、43 匹 (36%) の産仔を得た。43 匹中 20 匹 (47%) がキメラだった。20 匹中、5 匹が複合ヘテロマウスであり、メンデルの法則に従っていた。  
 複合ヘテロキメラマウスにおいて、コントロールマウスと同様に正常が肺の発生が確認された。肺組織において、多くの細胞が GFP 陽性であり、ES 細胞由来であることが示唆された。複合ヘテロキメラマウス 5 匹全てにおいて、肺の発生が確認された。



(3) 成獣になった Fgf10Ex1mut/Ex3mut 複合ヘテロキメラマウスにおける肺の解析  
 肺作出実験を 8 回行った。得られた産仔 153 匹中 96 匹が生きており、96 匹中 76 匹が GFP 陽性のキメラマウスであった。しかしながら、キメラマウス 76 匹中、成獣まで生き残ったのは 17 匹に過ぎなかった。この 17 匹中、5 匹が複合ヘテロマウスのキメラであった。  
 次に肺を摘出して、解析を行った。5 匹全て、肺は正常に発達していた。肺上皮マーカーで調べた結果、80%以上が GFP 陽性の ES 細胞由来であった。間葉系細胞においては約 50%が GFP 陽性 ES 細胞由来であった。特徴的なのは、血管内皮細胞は全て GFP 陽性の ES 細胞由来であった。



(4)  $Fgf10(\text{delEx1})/(\text{delEx3})$  複合ヘテロマウスにおけるラット ES 細胞由来肺の作出  
 マウス ES 細胞を用いた実験と同様に、胚盤胞に GFP 陽性ラット ES 細胞を注入し、偽妊娠マウスに移入して、産仔を得た。現在まで、6 回実験を行った。7 匹のキメラが得られ、このうち 2 匹が複合ヘテロマウスのキメラであった。得られ産仔の肺は、野生型に比べ、やや小さいが、肺の発生が確認された。今後詳細な解析を行う予定である。



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 Akihiko Kitahara, Qingsong Ran, Kanako Oda, Akihiro Yasue, Manabu Abe, Xulu Ye, Toshikuni Sasaoka, Masanori Tsuchida, Kenji Sakimura, Yoichi Ajioka, Yasuo Saijo, and Qiliang Zhou	4. 巻 31
2. 論文標題 Generation of lungs via blastocyst complementation in apneumatic Fgf10-deficient mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell reprints	6. 最初と最後の頁 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 -

1. 著者名 Ran Q, Zhou Z, Oda K, Yasue A, Abe M, Ye X, Li Y, Sasaoka T, Sakimura K, Ajioka Y, Saijo Y	4. 巻 14
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, section Thyroid Endocrinology	6. 最初と最後の頁 609697
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 -

〔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 由慶松、周啓亮、西條康夫
2. 発表標題 胚盤胞補完法とES細胞を用いたマウス生体内にける肺臓器再生
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019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
研究 分 担 者	笹岡 俊邦  (Sasaoka Toshikuni)  (50222005)	新潟大学・脳研究所・教授    (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	味岡 洋一  (Ajioka Yoichi)  (80222610)	新潟大学・医歯学系・教授     (13101)	

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