

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15921

研究課題名(和文) 胚盤胞補完法と多能性幹細胞を用いたマウス生体内における肺臓器再生技術の研究開発

研究課題名(英文) Generation of lung organs from mouse embryonic stem cells via blastocyst complementation in mice

研究代表者

周 ケイリョウ (Zhou, Qiliang)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10770232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はまずFgf10 Ex1mut/Ex3mut 複合ヘテロマウスを開発し、ホモ欠損と同様に肺及び四肢が欠損することを証明し、簡便かつ高効率なゲノムタイピングすることに成功した。このFgf10 Ex1mut/Ex3mut 複合ヘテロマウス胚盤胞にGFP陽性マウスES細胞をマイクロインジェクションし、本来では肺がないため出産後に生存できないFgf10Ex1mut/Ex3mutマウスがES細胞に補完され、成体まで異常なく発育・成熟した。キメラ産仔及び成体キメラマウスを解析したところ、肺の実質部分(肺胞上皮細胞)のみならず、間質部分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。

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。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り、in vitroでの移植に耐えうる肺臓器の再構築は極めて難しいと考えられる。本研究の胚盤胞補完法を用いるin vivoでの肺再生技術を発展させ、異種間キメラや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、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 apneumic Fgf10 Ex1mut/Ex3mut mice by blastocyst complementation. Complementation with ESCs enables Fgf10-deficient mice to survive to adulthood without abnormalities. Both the generated lung alveolar parenchyma and the interstitial portions, including vascular endothelial cells, vascular and parabronchial smooth muscle cells, and connective tissue, largely originate from the injected ESCs.

Our data suggest that Fgf10 Ex1mut/Ex3mut blastocysts provide an organ niche for lung generation and that blastocyst complementation could be a viable approach for generating whole lungs.

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 ES細胞

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、肺移植が肺不全の治療に対する最後の手段と考えられる。しかし、絶対的なドナー不足が深刻な問題となっている。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。iPS細胞を用いて肺臓器の作成ができれば、上記問題を克服することが可能となり、多能性幹細胞を用いた肺臓器再生に注目が集まっている。iPS細胞から肺上皮細胞への分化誘導は、既に複数の報告があり、その方法は確立しつつある。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の臓器である。その結果、移植に耐える肺臓器再生には、スキャフォールドの作成、大量の細胞培養技術、バイオリアクター装置開発など、ハードルは非常に高い。

(2)胚盤胞補完法を用いて、東京大学の中内博士らの研究グループは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成功し、同様に腎臓の作成にも成功したことが報告されている。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、胚盤胞補完法を用いて ES/iPS 細胞由来の気道や血管を含む肺臓器そのものをマウス個体で作成することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 システムを使って Fgf10 ノックアウトを作成する。

(2) Fgf10 ノックアウトマウス胚盤胞内に GFP 陽性マウス 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 ノックアウトマウス胚盤胞胚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 ES/iPS 細胞由来かを GFP 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。また、キメラマウスは成体まで成長可能か、成長過程に呼吸機能はワイルドマウスと同じく維持されているか、途中で死に至るならその原因は何かを検索する。

4. 研究成果

(1) Fgf10 ホモ欠損の胚盤胞に GFP 陽性マウス ES 細胞を移入することにより生まれたキメラマウスにおいては Fgf10 +/+ の遺伝子を持つ多能性幹細胞が混じり、遺伝子解析上ではホモ欠損の証明が困難であるため、申請者らは Fgf10 Exon1-/+ と Fgf10 Exon3-/+ を交配することにより複合ヘテロマウスを作成し、その複合ヘテロマウスが肺欠損や四肢欠損であることを確認し、ホモ欠損マウスと同じ表現型であることを示した(図1)。Fgf10 エクソン1とエクソン3の複合ヘテロ胚盤胞を用いることにより、キメラマウスが Fgf10 ノックアウトマウス胚盤胞由来であることを簡便に遺伝子解析する方法を開発した。



図1 : Fgf10 複合ヘテロマウス

(2) Fgf10 欠損胚盤胞が ES 細胞により補完されるのかを検証するため、GFP 陽性 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、キメラマウスを作成した。GFP 陽性 ES 細胞を移入した 121 個の Fgf10 Ex1-/+ × Ex3-/+ 胚盤胞胚を偽妊娠マウス子宮に着床させ、43 匹 (36%) の産仔が得られた。新生児期での解析で 20 匹 (47%) の産仔が出生時に GFP 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)。また、成体期での解析では同じく胚盤胞補完法を実施した 638 個の Fgf10 Ex1-/+ × Ex3-/+ 胚盤胞胚から、153 匹 (24%) の産仔が得られた。76 匹 (50%) の産仔が出生時にキメラで、うち 16 匹 (21%) が成体まで異常なく発育した。遺伝子解析の結果、5 匹が Fgf10 複合ヘテロ胚盤胞由来であることを証明した(Table1)。上記結果により胚盤胞補完法を用いてマウスの多能性幹細胞を Fgf10 ノックアウトマウスの胚盤胞に注入することによって肺発生が補完され、出生したキメラマウスは異常なく成体まで発育することは可能であることを示し、再生した肺臓器は機能する成熟臓器であることを証明した。

Table 1. Results of blastocyst complementation for lung generation

Analysis stage	Blastocyst transferred	Neonates	Chimeric fetuses	Chimeras weaned	Genotype			Lung complemented
					wild/wild	Ex1 or Ex3 hetero	compound hetero	
Neonate	121	43 (36%)	20 (47%)	13	2	5	5 (100%)	
Adult	638	153 (24%)	76(50%)	16 (21%)	6	5	5 (100%)	

(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は ES 細胞由来であるか、組織学的に異常ないかを検証するため、蛍光観察、CT 解析、HE 染色等で解析した結果、再生された肺はほとんど GFP 細胞由来で、組織学的にも異常なかったことを示した。

Figure 2.

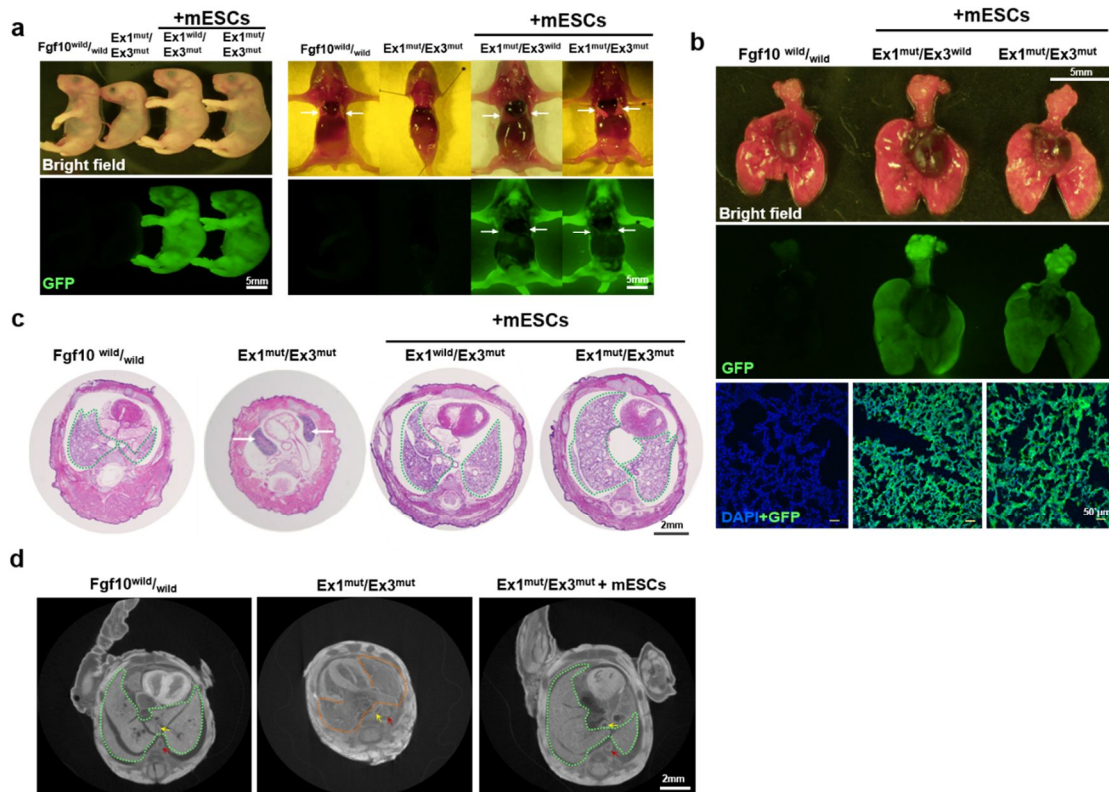


図 2 : Fgf10 欠損マウスにおける ES 細胞由来肺臓器の作出 (新生児期)

(4) 成体の複合ヘテロマウスの肺臓器がどのくらい ES 細胞に由来するか、生物学的に機能されているかを検証するために GFP 蛍光と各種の細胞マーカーを用いて 2 重蛍光染色で詳しく調べた。その結果、肺の実質部分 (胞 型上皮細胞、 型上皮細胞など) のみではなく、間質部分 (血管内皮細胞、平滑筋細胞、結合組織など) も優位に GFP 陽性 ES 細胞に由来することを示した (図 3)。

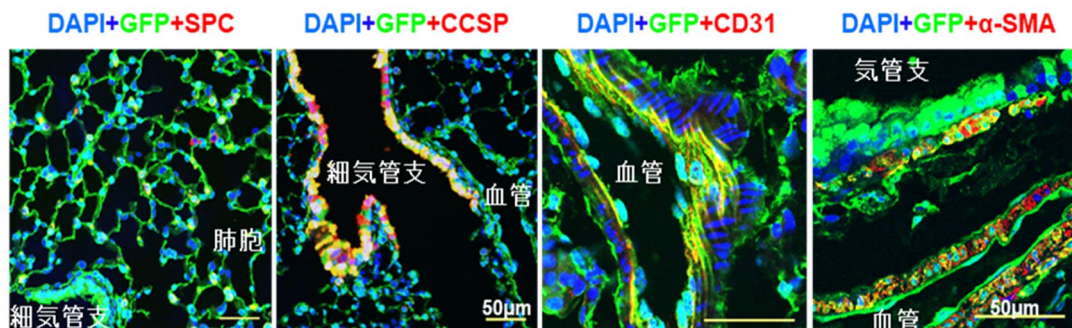


図 3. 同種異系間胚盤胞補完法により作成したマウス ES 細胞由来の肺臓器

SPC: Surfactant Protein C, Ⅱ型肺胞上皮の特異的マーカー

CCSP: Clara cell secretory Protein, クララ細胞のマーカー

CD31: PECAM-1, 血管内皮マーカー

-SMA: α -smooth muscle actin, 血管平滑筋マーカー

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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) https://doi.org/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 Nagai Takahiro, Trakanant Supaluk, Kawasaki Maiko, Kawasaki Katsushige, Yamada Yurie, Watanabe Momoko, Blackburn James, Otsuka Tanaka Yoko, Hishinuma Mitsue, Kitamura Atsushi, Meguro Fumiya, Yamada Akane, Kodama Yasumitsu, Maeda Takeyasu, Zhou Qiliang et al	4. 巻 248
2. 論文標題 MicroRNAs control eyelid development through regulating Wnt signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 201 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.10	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 由慶松, 周啓亮, 北原 哲彦, 叶許緑, 佐々木 健太, 齋木 琢郎, 松本吉史, 森山雅人, 泰江 章博, 笹岡 俊邦, 小田加奈子, 阿部 学, 味岡洋一, 西條康夫
2. 発表標題 胚盤胞補完法とES細胞を用いたマウス生体内における肺臓器再生
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Q Zhou, Q Ran, A Kitahara, X Ye, K Sasaki, Y Matsumoto, M Moriyama, K Oda, T Sasaoka, M Abe, K Sakimura, Y Ajioka, A Yasue, and Y Saijo
2. 発表標題 GENERATION OF LUNG ORGANS FROM MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS VIA BLASTOCYST COMPLEMENTATION IN MICE
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiko Kitahara, Yuki Shimizu, Tatsuya Goto, Seijiro Sato, Terumoto Koike, Masanori Tsuchida
2. 発表標題 Generation of Lung Organs From Embryonic Stem Cells via Blastocyst Complementation in Mice
3. 学会等名 第70回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018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