

令和 2 年 6 月 19 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：18K16414

研究課題名（和文）胚盤胞補完法を利用したマウス多能性幹細胞を用いた肺再生

研究課題名（英文）Generation of Lung Organs From Embryonic Stem Cells via Blastocyst Complementation in Mice

研究代表者

北原 哲彦 (Kitahara, Akihiko)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：40812152

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：肺形成に関与するFgf10遺伝子を変異させたマウスは肺が無形成あるいは低形成となる。遺伝子操作によって肺無形成あるいは低形成のモデルマウスを作出した。そのモデルマウスは出生と同時に呼吸ができないため死亡するが、胚盤胞期に至った受精卵にES細胞を注入してES細胞由来の肺を作成した。ES細胞を注入した受精卵から得られた産仔を解析し、ES細胞注入前の受精卵のFgf10遺伝子を変異していたことを証明するとともに、肺がES細胞が分化してできた肺であることを証明した。これら2つの証明からES細胞から肺が作れることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多能性幹細胞であるES細胞を利用し、ES細胞由来の肺を肺欠損マウスモデル内において作成した。多能性幹細胞は多くの研究に用いられているが、実質臓器の作成に関してはまだ確立していない面もある。特に肺は構成する細胞の種類が多いため作成は難しいとされていたが、今回の研究を介して作成可能なことが証明された。本研究を土台として今後はiPS細胞を用いた肺作製や異種間での肺作製が期待される。特に異種間での肺作製が可能となった場合、移植手術に耐えうる臓器作出に糸口が見えてくる。結果的に移植用臓器作出が可能となり、移植医療におけるドナー不足解消に寄与する。本研究はその基礎として必要不可欠な研究となった。

研究成果の概要（英文）：Fgf10 is a regulator gene of lung development. The absence of Fgf10 in mice results in lung deficiency, causing perinatal lethality. We made lung deficiency mice model by genetic manipulation of Fgf10. Then we injected ES cells into the blastocyst of those mice model. The blastocysts injected ES cells had implanted into pseudopregnant mice, chimeric neonates were obtained. We investigated that lungs of chimeric mice is originated ES cells and Fgf10 mutation existed chimeric mice before injection of ES cells. We generated lungs originated from ES cells via blastocyst complementation in lung deficiency mice model.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：胚盤胞補完法 ES細胞 肺作製 複合ヘテロ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

呼吸器疾患の終末像を呈する症例に対して、肺移植が最終的な治療の選択肢となっている。その需要は高まる一方であるが、ドナー不足は深刻である。また、移植後の拒絶反応や免疫抑制剤の投薬に伴う易感染性や悪性腫瘍の発生、臓器障害も無視できない問題である。このような課題が山積する肺移植医療において、移植可能な肺を多能性幹細胞から作出することができれば問題解決に一石を投じることができると我々は考えた。

2. 研究の目的

多能性幹細胞から試験管内で三次元的な臓器を作出する方法は確立されていない。ある臓器を欠損する受精卵の胚盤胞期に野生型の多能性幹細胞を注入する胚盤胞補完法を利用した臓器作出についての研究が進んでいる。同法を利用したマウスの膵臓や腎臓の作出についてはすでに報告されている。申請者らは肺欠損マウスを作成し、その胚盤胞(レシピエント)に対してES細胞(Embryonic stem cell)を注入し、ES細胞由来の肺作出をすることを目的とした。

3. 研究の方法

Fgf10(Fibroblast growth factor 10)遺伝子は肺発生と四肢発生に関与することが報告されており、この遺伝子の機能が欠失したマウスは四肢欠損と肺欠損あるいは低形成といった表現型を示す。Fgf10 遺伝子の Exon1 あるいは Exon3 に対してホモ変異を導入した胚は先述の表現型を持った産仔となる。この Fgf10 遺伝子の Exon1 ヘテロ変異マウスから受精卵を作成した。受精卵を偽妊娠マウスに導入し、四肢欠損マウス胎仔を得た。四肢欠損マウスにおいて肺欠損あるいは低形成であることを組織切片及び造影マイクロ CT(computed tomography)で確認した。同様の受精卵を再度作成し、この受精卵に緑色蛍光タンパク質を産生する野生型マウス ES 細胞を胚盤胞期に注入した。注入した胚を偽妊娠マウスに導入し、キメラマウスを得た。出生時にキメラマウスであるかどうかを緑色蛍光の有無で判定した。キメラマウスのうち出生時に死亡したマウス胎仔に関して組織切片および造影マイクロ CT で肺が形成されていることを確認した。生存した胎仔を飼育し、成育可能な個体であるかどうかを観察した。本来肺無形成あるいは低形成となる Exon1 ホモ変異胚であったことを証明するために遺伝子解析を行った。遺伝子解析はキメラマウスを犠牲死させ緑色蛍光を発しない肝細胞を選別・収集して行った。また同時にそのキメラマウスの肺の組織切片を作成し、肺実質および間質を構成する細胞が ES 細胞由来の細胞により構成されているかどうかを観察した。遺伝子解析を行うにあたり、緑色蛍光を発しない細胞の選別・収集は実験に時間を要し、且つ煩雑であるため簡便化することを考慮した。Fgf10 遺伝子の機能欠失は Exon1 あるいは Exon3 をホモ変異させることでなし得るが、同一胚において Exon1 と Exon3 のそれぞれをヘテロ変異させた複合ヘテロでもなし得ると考えた。そこで複合ヘテロモデルを作成し、同様に四肢欠損マウスが得られることを確認した。同じく、肺欠損あるいは低形成となることも確認した。続いてこの複合ヘテロ胚に対しても野生型マウス ES 細胞を胚盤胞期に注入し、偽妊娠マウスに導入してキメラマウスを得た。前述と同様の解析を行い、複合ヘテロモデル胚においても ES 細胞由来の肺が作成されているかを確認した。

4. 研究成果

Fgf10Exon1 ホモ変異胚を作成し、偽妊娠マウスに導入して四肢欠損マウスができることを確認した。四肢欠損マウスは肺欠損あるいは低形成となるため出生時に死亡した。死亡した産仔を造影マイクロ CT で撮影し、肺欠損あるいは低形成であることを確認した。連続する組織切片でも確認を行った。ホモ変異胚に対して野生型マウス ES 細胞を導入し、キメラマウスを作出し

た．出生時死亡したキメラマウスにおいては肺が形成されていることを組織切片および造影マイクロCTで確認した．死亡しなかったキメラマウスを飼育したが，呼吸状態に異常をきたした個体は認めず，機能的に問題の無い肺が形成されていることを確認した．成育を確認したところでキメラマウスを犠牲死させ遺伝子解析を行ったが，その中にレシピエントとなった胚の遺伝子型がホモ変異しているものがあり尚且つそのキメラマウスの肺が緑色蛍光を放つ細胞により構成されていることを組織切片で確認した．これによりES細胞由来の肺が作成されたことを証明した．この実験系統については第118回日本外科学会定期学術集会で報告し，Young investigator's awardを受賞するに至った．

さらに複合ヘテロモデル胚も作成し，同様の解析を行った．遺伝子解析は簡便化した．またこの実験系統においてもES細胞由来の肺が作成できたことを確認した．複合ヘテロモデル胚を使用した実験系統はこれまでの報告にない画期的方法となった．複合ヘテロモデル胚を使用した実験系統については2020年5月12日にCell Reports 31巻において論文として掲載されるに至った．

キメラマウスの作出効率やFgf10遺伝子のコードするタンパク質および受容体との相互作用に関する様々な課題が明らかとなり今後の本研究方法におけるさらなる改善の余地があることも分かった．またマウスにおけるES細胞由来の肺作製が可能となったため，マウスとラットなどの異種間における多能性幹細胞を用いた臓器作成についての見通しも出てきた．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 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 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
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 -

〔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 北原 哲彦, 周 啓亮, 冉 慶松, 叶 許縁, 小田 佳奈子, 笹岡 俊邦, 阿部 学, 崎村 建司, 味岡 洋一, 泰江 章博, 土田 正則, 西條 康夫
2. 発表標題 胚盤胞補完法を利用したマウスES細胞による肺再生
3. 学会等名 第118回日本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