

令和 4 年 10 月 26 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19923

研究課題名（和文）肺組織再生のための新規遺伝子治療技術の開発

研究課題名（英文）A novel gene therapy method for the lung regeneration

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）：肺前駆細胞の評価とスクリーニング目的で、肺前駆細胞特異的GFPレポーターマウスを作製した。また、現行の方法で作製した肺前駆細胞様細胞の性状を向上させるため、肺特異的な追加因子の探索を進行中である。一方、作製した肺前駆細胞を安定して増殖培養させるための特異的増殖培地や肺前駆細胞の分化能を評価するための分化方法については最適化の目途が立ちつつある。今後、肺前駆細胞を作製するための最適化した因子の組合せを同定し、有効な肺組織再生方法の構築を目指したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、難治性肺疾患の組織を再生させるため、様々な肺の機能性の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やその増殖、分化方法を検討した。これまでのところ、作製した肺前駆細胞に類似の細胞の分化能は高くはないが、現在進行中の追加因子を同定することにより、将来的に組織の再生に寄与する細胞を作製する新たな方法を構築できると期待される。

研究成果の概要（英文）：For the evaluation of lung progenitor cells, a lung progenitor cell-specific GFP-reporter mouse line was generated. By using this system, additional lung-specific factors are currently under screening to improve the properties of the lung progenitor cell-like cells produced by this method. On the other hand, the specific growth culture medium for the propagation of lung progenitor cells and the differentiation method to evaluate the differentiation ability of the lung progenitor cells are getting optimized. In future, we would like to identify optimized factors for producing lung progenitor cells for an effective lung tissue regeneration method.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：肺 分化 幹細胞 遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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あり、日本では死因で第 7 位、世界では年間 300 万人が死亡する。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のが現状である。

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、分化効率が非常に高いわけではなく、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と考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、様々な肺の機能性の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、上記のような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パ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 13 種類の遺伝子を特定し、マウス線維芽細胞に遺伝子導入して、肺前駆細胞マーカーや上皮細胞マーカーの発現を指標に検討を行った結果、5 つの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。本研究では、このようにして作製した肺前駆細胞様の細胞の機能を検証し、さらにその作製効率の向上の検討を行った。

4. 研究成果

これまでのところ、このように作製された肺前駆細胞は長期に培養することが容易ではなく、徐々に死滅すること、分化能も十分強力なものではないことから、必要因子の組合せが最適化されていない可能性が考えられた。そこで、新たな遺伝子の組合せを探索するため、本研究では有効な追加因子のスクリーニング系を構築した。この目的のため、肺前駆細胞特異的 GFP レポーターマウスを作製した。さらにこのマウスから作製したレポーター線維芽細胞を材料に、肺前駆細胞を作製するための追加因子を探索した。

1. 肺前駆細胞特異的 GFP レポーターマウスの作製

肺前駆細胞特異的マーカーのひとつである Nkx2.1 の C 末端に 2A ペプチドを介して GFP を挿入したレポーターマウスを奈良先端大の動物実験施設で作製した。C57BL6 マウス由来 ES 細胞に Cas9/CRISPR 法で Nkx2.1 の C 末端に特異的なガイド RNA、Nkx2.1 の C 末端付近の相同配列のアームを接続した 2A-GFP、Cas9 発現ベクターをトランスフェクションし、相同組換えにより Nkx2.1-2A-GFP となるようにインフレイムで挿入された ES 細胞のクローンをゲノム PCR スクリーニングにより取得した(図 1)。この ES 細胞を ICR マウスの胚盤胞に注入し、ICR マウスの卵管に移植してキメラマウスを作製した(図 2)。これらのキメラマウスを交配し、肺前駆細胞特異的 GFP レポーターマウスのラインを樹立した。

2. 肺前駆細胞特異的 GFP レポーター線維芽細胞を用いた肺前駆細胞作製の評価

上記 1 で作製したマウスの肺の凍結組織切片を作製し、GFP 蛍光を確認したところ、予想に反してかなり弱い蛍光が観察された。免疫蛍光染色で成体の肺組織において Nkx2.1 は十分検出できることから、これらのマウスにおける GFP の発現レベルが当初予想したほど高くないと考えられた。また、これらのノックインマウスの皮膚から線維芽細胞を調製し、5 つの遺伝子を導入したところ、やはり GFP の蛍光はほとんど観察できなかった。従って、このスクリーニング系はあまり感度が高くない可能性が考えられた。

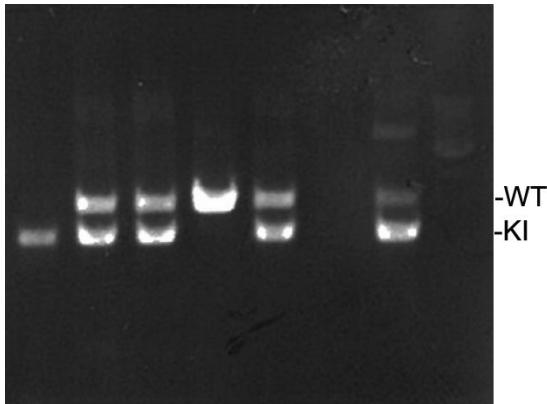


図1．ゲノム PCR スクリーニングの結果



図2．作製したキメラマウスと仮親

3．追加因子の探索

上記の5つの遺伝子では肺前駆細胞の作製に十分ではない可能性が考えられたため、文献やデータベースを調査し、発生期の肺前駆細胞に特異的に発現する追加因子の候補を探索した。その結果、約20個の新たな追加因子を発生期の肺前駆細胞特異的追加因子候補として選択し、その肺前駆細胞作製効果を現在検討中である。

4．肺前駆細胞特異的増殖培地と分化方法の最適化

これまでのところ5つの遺伝子でマウス線維芽細胞から作製した肺前駆細胞様細胞は増殖能が限定的であり、分化能も強力ではないことから、肺前駆細胞特異的増殖培地と分化培地の最適化が必要であると考え、既存の文献方法を参考に培養条件の検討を行っている。ポジティブコントロールとしてマウス胎児の肺組織を酵素消化して解離させ、上皮細胞と間葉細胞に分離し、上皮細胞のみを増殖させる培地を検討した。その結果、既存文献の方法のひとつでマウス肺前駆細胞を安定して継代し増殖できる培地を確認した。また、さらに別の文献をもとに2次元や3次元培養方法により細胞分化条件を検討したところ、複数種類の肺上皮細胞を分化誘導できることがわかってきており、肺上皮細胞の分化培養条件を最適化できつつある。現在、様々な肺上皮細胞特異的マーカーで qRT-PCR や免疫蛍光染色による細胞分化の評価を行っているところである。

以上、本研究では肺前駆細胞の評価とスクリーニング目的で、肺前駆細胞特異的 GFP レポーターマウスを作製した。また、現在の作製方法である5つの遺伝子による肺前駆細胞様細胞の性状を向上させるため、肺特異的な追加因子の探索を進めている。一方、作製した肺前駆細胞を安定して増殖培養させるための特異的増殖培地や肺前駆細胞の分化能を評価するための分化方法については最適化の目途が立ちつつある。今後、肺前駆細胞を作製するための最適化した因子の組合せを同定し、本方法による肺組織再生の検討へと研究を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 濱田歩花, 坂田優理子, 深津由衣, 栗崎 晃
2. 発表標題 アデノウイルスを用いた間葉系細胞への遺伝子導入方法の最適化条件の検討
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
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
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
---------	---------