

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H01180

研究課題名(和文) 器官形成運命の転換による革新的器官誘導の基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of innovative technologies toward organ regeneration by control of organ fate

研究代表者

辻 孝(Tsuji, Takashi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50339131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、器官運命決定メカニズムの解明と、器官運命転換によって多様な器官を再生するDirect reprogramming organogenesisの実証を目的に、マウス顎下腺、臼歯、体毛毛包の器官運命決定に関わる候補転写因子を同定した。また、唾液腺誘導因子(Sox9, Foxc1)による成体毛包幹細胞の運命転換を試みたが、成体幹細胞の運命転換には至らなかった。一方、唾液腺誘導因子の強制発現により、胎児および新生児の口腔粘膜、および胎児皮膚組織から唾液腺原基の誘導と、同所性移植による機能的唾液腺再生が可能であった。以上の結果から、器官運命転換による器官再生の原理検証がなされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、外胚葉性器官の運命決定に関わる分子メカニズムの一端が明らかとなった。さらに、器官発生運命を人為的に制御することによって本来の発生時期、発生場所に縛られずに、器官形成を誘導することが可能であることが示された。これらの結果は、発生学の長年の問題である器官運命決定メカニズムの解明につながるるとともに、これまで胎児期の器官誘導能のある幹細胞や多能性幹細胞でしかなしえなかった器官再生に新機軸を開拓する革新的概念の確立とその応用に大きなブレークスルーをもたらし、学術のみならず応用面においても革新的基盤技術となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we aimed to identify the mechanism of organ fate determination and to prove the concept of direct reprogramming organogenesis, which could regenerate various organs by modifying organ fate. To this end, we identified candidate transcription factors involved in organ fate determination of the submandibular gland, molars, and hair follicles of mice. Using salivary gland-inducing factors, we attempted to change the fate of adult hair follicle stem cells and found no positive sign of salivary gland organogenesis. On the other hand, the forced expression of salivary gland-inducing factors enabled the induction of salivary gland primordia not only from the oral mucosa of fetal and neonatal mice, but also from neonatal skin tissue. Orthotopic transplantation of these primordia resulted in the functional regeneration of salivary gland. These results proved the concept of organ regeneration by changing the fate of organs.

研究分野：再生工学、発生生物学

キーワード：器官発生 器官運命決定 成体幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

発生・再生医学の原理解明と、その応用によるの次世代再生医療として、「器官再生医療」が期待されている。これまで本研究グループはこれまで本研究グループは、三次元的な細胞操作技術である「器官原基法」を開発し、歯や毛包などの幅広い器官再生医療の実現可能性を実証してきた。また、世界的なトレンドであるオルガノイド研究はほとんどすべての器官の構造と機能の一部を再現できることを示した。しかしながら、これらの方法には様々な制限が存在し、外胚葉性器官以外の機能的な器官再生は達成されておらず、器官再生医療の実現に向けた新たなアプローチ、ブレークスルーが待ち望まれていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、外胚葉期間をモデルに器官運命決定メカニズムを解明し、その運命決定を制御することにより多様な器官を再生させる、革新的な器官再生の基盤技術の開発を目的とし、1) 器官発生運命決定メカニズムの解明、2) 成体幹細胞の Direct Reprogramming による多様な器官再生誘導の実証、3) Direct Reprogramming Organogenesis による新規器官再生方法の概念実証を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 器官発生の運命決定メカニズムの解明に向け、胎児期の様々な発生時期において、歯(臼歯)、毛包(体毛)、唾液腺(顎下腺)の器官原基から間葉組織を取得し、網羅的遺伝子発現解析によって各器官の発生過程における遺伝子発現プロファイルを取得するとともに、各器官において発現プロファイルが大きく変動する、すなわち器官形成が開始する前後で、それぞれの器官特異的に発現変動する遺伝子の探索を行った。さらに、各器官特異的な遺伝子変動を引き起こす転写因子群を推定するため、in silico による上流解析を行った。

(2) 成体幹細胞の Direct Reprogramming による多様な器官再生誘導の実証に向け、哺乳類成体において唯一器官誘導能を有する幹細胞である毛包上皮幹細胞を用いて、毛包上皮性幹細胞の発生運命転換が可能か明らかにするため、多様な上皮組織の運命転換が可能な胎児唾液腺間葉との再構成実験を行った。また、Direct Reprogramming による器官運命転換の可能性を明らかにするため、唾液腺器官誘導遺伝子である Sox9 および Foxc1 を培養毛包上皮細胞において強制発現させ、毛乳頭細胞、胎児唾液腺間葉、胎児口腔粘膜間葉とともに再生器官原基を作成し、生体外で培養後に組織学的評価を行った。

(3) Direct Reprogramming Organogenesis による新規器官再生方法の概念実証に向け、器官発生運命の転換が可能であるか明らかにするため、胎児、新生児、および成体の外胚葉組織(口腔粘膜、皮膚)の上皮と胎児唾液腺間葉から再生器官原基を作成し、生体外で培養後組織学的解析を行った。また、Direct Reprogramming Organogenesis の可能性を明らかにするため、上記の組織において唾液腺器官誘導遺伝子を強制発現させ、生体外で培養後に組織学的評価を行った。さらに、器官運命転換によって誘導された唾液腺器官原基を唾液腺欠損モデルマウスに移植し、組織学的および機能解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 器官発生運命決定メカニズムの解明

器官固有の器官運命決定メカニズムを明らかにするため、マウス臼歯、唾液腺、体毛毛包において器官誘導能を示す発生段階(器官原基)およびその前の段階(前プラコード、プラコード)の上皮および間葉組織を単離し、RNA-Seq による網羅的遺伝子発現解析を実施した(Fig. 1a)。クラスタリング解析から、各器官において、前プラコードからプラコードにかけて遺伝子プロファイルが変化することが明らかとなった(Fig. 1b)。さらに、前プラコードにおいて、器官間で発現プロファイル

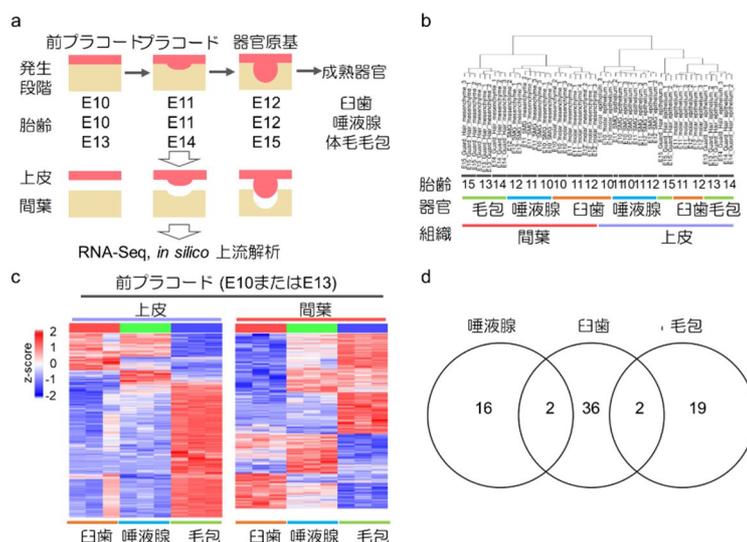
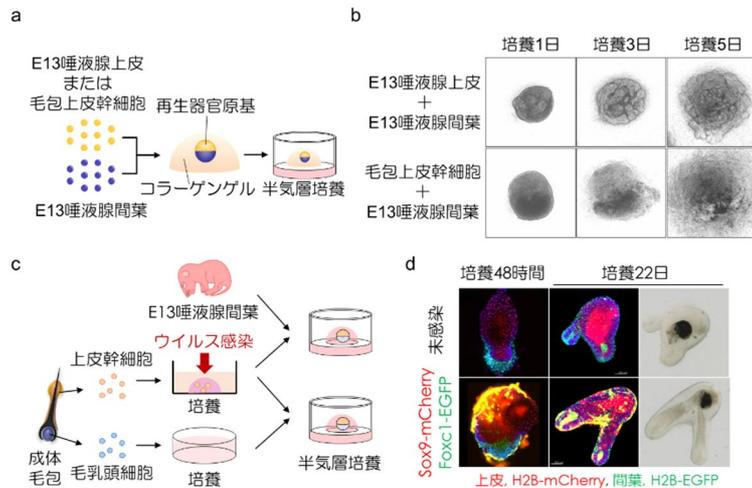


Fig. 1 器官運命決定因子の同定

に明確な差異が認められることから、器官運命決定は前プラコードより前の発生段階で行われていることが予想された (Fig. 1c)。そこで、前プラコードにおける各器官固有の変動遺伝子について *in silico* 上流解析を行ったところ、それぞれの器官固有の複数の転写因子候補が見いだされた (Fig. 3c)。これらの結果から、マウス外胚葉性器官の運命は前プラコード期またはそれ以前に決定されることが示唆された。

### (2) 成体幹細胞の Direct Reprogramming による多様な器官再生誘導の実証

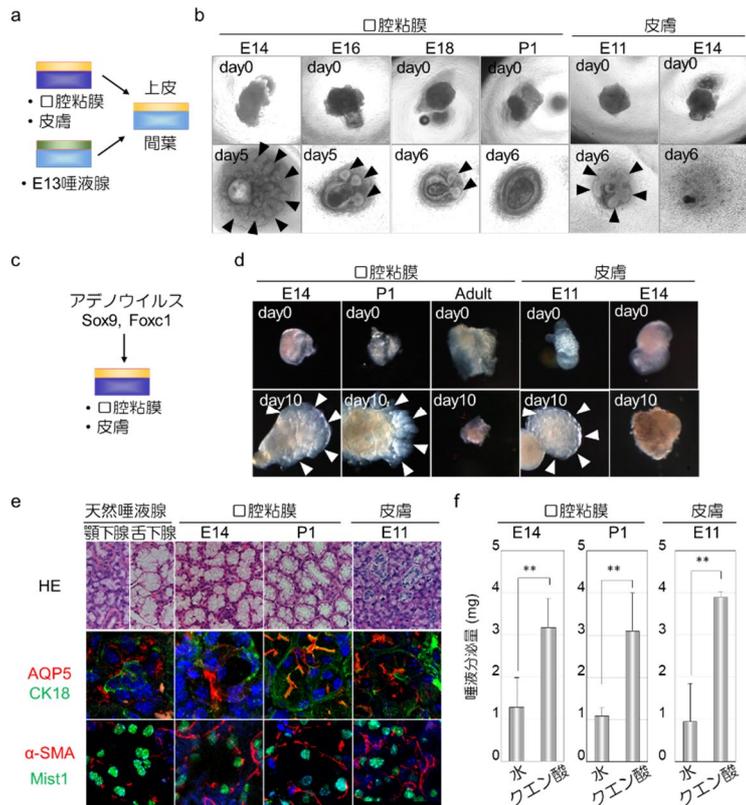
私たちの研究グループはこれまでに、哺乳類の成体において唯一器官形成能を有する毛包上皮性幹細胞を、器官誘導能を維持したまま生体外増幅する技術を確立している。先行研究から、器官運命は間葉組織の由来に従うことが示されており、例えば胎児唾液腺間葉と他の組織の上皮を張り合わせることで、その発生運命が転換され唾液腺が誘導される。そこで、本来は毛包器官を作り出す毛包上皮性幹細胞の器官運命を変更することにより、他の器官の再生が可能であるか明らかにするため、マウス成体ヒゲ毛包由来の毛包上皮性幹細胞を含む培養上皮細胞と、天然唾液腺原基由来の間葉細胞を用いて再構成原基を作成した (Fig. 2a)。5日間の生体外培養において、唾液腺上皮と間葉による再生器官原基からは、天然唾液腺様の分岐構造が発生したのに対し、培養毛包上皮細胞を用いた場合は明確な唾液腺様構造の発生は認められなかった (Fig. 2b)。また、既知の唾液腺誘導因子である Sox9 と Foxc1 をウイルス感染により強制発現させた培養毛包上皮細胞と、毛乳頭細胞または胎児唾液腺間葉を用いて作成した再生器官原基の長期間培養においても、明確な唾液腺様構造の発生は認められなかった (Fig. 2c and d)。これらの結果は、成体幹細胞の運命転換には毛包上皮性幹細胞のポピュレーションの分離や多様な誘導因子の解析など、さらなる最適化の検討が必要であることを示している。



**Fig. 2** 成体幹細胞の運命転換による他器官再生の検討

### (3) Direct Reprogramming Organogenesis による新規器官再生方法の概念実証

器官運命転換による新規器官再生方法の概念実証のため、胎児および新生児由来の口腔粘膜組織、および胎児由来皮膚組織由来の上皮組織と胎児唾液腺間葉組織の張り替え実験を行った (Fig. 3a)。その結果、唾液腺と同じ口腔領域である口腔粘膜上皮は発生率が低下し、誘導までの日数が増加するものの、胎齢 18 日 (E18) までは器官運命転換可能であった。一方、皮膚領域である胎児皮膚においては胎齢 11 日 (E11) において唾液腺様構造の発



**Fig. 3** 運命転換による新規器官再生の概念実証

生が認められるが、口腔粘膜において唾液腺の誘導が認められた胎齢 14 日 (E14) では認められなかった (Fig. 3b)。

一方、間葉の貼り換えは行わず、口腔粘膜組織または皮膚組織において唾液腺誘導因子である Sox9 と Foxc1 をウイルス感染により強制発現させ、FGF7/10 を含む培地で培養を行った場合は、出生 1 日目 (P1) の新生児口腔粘膜組織からも唾液腺様構造の発生が認められた (Fig. 3c and d)。誘導された唾液腺原基を、唾液腺欠損モデルマウスへ同所的に移植することにより、天然唾液腺と同様の組織学的特徴をもち、唾液腺分泌に必要な水チャンネルである AQP5 や分化した腺房マーカーである Mist1 などの唾液腺マーカーを発現する唾液腺への成長および成熟が認められた (Fig. 3e)。さらに、誘導唾液腺原基を移植した唾液腺欠損モデルマウスにおいて、味覚刺激に反応した唾液腺の分泌が認められた (Fig. 3f)。これらの結果は、通常唾液腺の発生がみられない発生段階および領域において器官誘導因子の導入による機能的な器官再生が可能であることを示しており、新規器官再生方法の概念が実証された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takeo Makoto, Asakawa Kyosuke, Toyoshima Koh-ei, Ogawa Miho, Tong JingJing, Irie Tarou, Yanagisawa Masayuki, Sato Akio, Tsuji Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Expansion and characterization of epithelial stem cells with potential for cyclical hair regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80624-3	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 Masato Nakagawa, Makoto Takeo, Miho Ogawa, Yohei Yuge, Masato Yasukawa, Tomomi Tokita, Kentaro Ishida, Etsuko Ikeda, Tadaaki Kirita, and Takashi Tsuji	4. 巻 18
2. 論文標題 Identification of Novel Genes Related to Tooth Morphogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Tissue Engineering	6. 最初と最後の頁 41-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Etsuko Ikeda, Masato Nakagawa, Miho Ogawa, MakotoTakeo and Takashi Tsuji	4. 巻 6
2. 論文標題 Functional Tooth Regeneration as a Next-Generation Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Dent & Oral Disord,	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Ikeda Etsuko, Ogawa Miho, Takeo Makoto, Tsuji Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Functional ectodermal organ regeneration as the next generation of organ replacement therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Open Biology	6. 最初と最後の頁 190010 ~ 190010
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsob.190010	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 Kato Mayu, Tanaka Junichi, Aizawa Ryo, Yajima-Himuro Sara, Seki Tatsuaki, Tanaka Keisuke, Yamada Atsushi, Ogawa Miho, Kamiyo Ryutaro, Tsuji Takashi, Mishima Kenji, Yamamoto Matsuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Visualization of junctional epithelial cell replacement by oral gingival epithelial cells over a life time and after gingivectomy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44065-x	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5件(うち招待講演 5件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 1. 辻 孝
2. 発表標題 次世代器官再生医療としての毛包再生医療の実現に向けて
3. 学会等名 第63回日本形成外科学会総会・学術総会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻 孝
2. 発表標題 次世代器官再生の実現を目指して -QOL医療としての毛包再生-
3. 学会等名 公益財団法人神戸医療産業都市推進機構 産業再生医療産業化フォーラム2020(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻 孝
2. 発表標題 幹細胞の自己組織化による器官再生 -基礎研究から臨床応用に向けて-
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム2020(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻 孝
2. 発表標題 次世代医療としての器官再生の実現を目指して
3. 学会等名 大曲仙北医師会、第32回日本医師会生涯教育講座、第58回秋田県医師会医学講座、第55回秋田県救急医療研修会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻 孝
2. 発表標題 次世代器官再生としての口腔器官の機能再生を目指して
3. 学会等名 第52回新潟歯学会総会（招待講演）
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	池田 悦子 (Ikeda Etsuko)  (20509012)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・客員研究員  (82401)	
研究分担者	田中 準一 (Tanaka Junichi)  (40710166)	昭和大学・歯学部・講師  (32622)	
研究分担者	美島 健二 (Mishima Kenji)  (50275343)	昭和大学・歯学部・教授  (32622)	

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	武尾 真  (Takeo Makoto)  (50782116)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・上級研究員    (82401)	
研究分担者	渡辺 亮  (Watanabe Akira)  (60506765)	京都大学・医学研究科・特定准教授    (14301)	
研究分担者	桐田 忠昭  (Kirita Tadaaki)  (70201465)	奈良県立医科大学・医学部・教授    (24601)	
研究分担者	竹内 昌治  (Takeuchi Syouji)  (90343110)	東京大学・大学院情報理工学系研究科・教授    (12601)	

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