

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02923

研究課題名(和文)100%多能性幹細胞由来の肺臓器創出

研究課題名(英文)Generation of purely pluripotent stem cell derived lung organ

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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウスES細胞を3次元培養し、疑似胚の作製を試みた。ESLIF培地で培養されたES細胞を96well plateで培養を開始し、Chironを含むN2B27mediumに変え培養を継続し、ガストロイドの発生分化を促した。様々な条件を試した結果、ES細胞は凝集し、個体を形成した。組織学的には、原腸や肺芽の発生は確認できなかった。また遺伝子解析においても、肺発生に関わる遺伝子の発現は確認できなかった。胚盤補完法による肺再生研究も継続した。ラットES細胞を肺欠損マウスに移入することにより、5匹であるが肺再生に成功した。解析を進めた結果、ラットES細胞由来の肺創出を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植に適した肺は数が少なく、多くの待機患者さんがいます。この移植可能な肺臓器を作ることを最終目標としています。胚性幹細胞から肺臓器を作成する方法として、肺が欠損した動物内で作る胚盤胞補完法と、胚性幹細胞から疑似胚を作成して肺を作る方法について研究を継続してきています。では小動物ですが、成功しています。一方の方法では現在の技術では困難であり、研究の進歩が必要です。今後も研究を継続し、移植可能な肺再生につなげていきたいと考えています。

研究成果の概要(英文)：This study aims to ultimately create lungs derived 100% from embryonic stem cells. Mouse ES cells were cultured in three dimensions to attempt the creation of pseudo-embryos. ES cells cultured in ESLIF medium were started in a 96 well plate, and the culture was continued with a change to N2B27 medium containing Chiron, promoting the development and differentiation of gastruloids. As a result of trying various conditions, the ES cells aggregated and formed an individual entity. Histologically, the development of the primitive gut or lung buds was not confirmed. Also, genetic analysis did not confirm the expression of genes involved in lung development. In addition, research on lung regeneration by blastocyst complementation method was continued. By transplanting rat ES cells into mice with lung deficiencies, lung regeneration was successful in five cases. Further analysis confirmed the creation of lungs derived from rat ES cells

研究分野：再生医学

キーワード：肺再生 ES細胞 ガストロイド 胚盤胞補完法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞による肺再生研究: ES 細胞や iPS 細胞から 2 次元プロセスでの肺胞上皮細胞や気道上皮細胞への分化誘導法 (Nature Biotechnology 32:84, 2013; Stem Cell Reports 6:1-8 2016) や肺オルガノイドの作製方法も確立しつつある (eLife 24:4, 2015; Nature Methods 14:1097, 2017)。一方、移植可能な臓器レベルでは、バイオリアクター装置を用いた脱細胞化スキャフォールドによる肺臓器再生が報告され (Science 329:538, 2010; Nat Med 16:927, 2010; J Tissue Eng Regen Med 12:e1623, 2017; Sci Transl Med 10: eaao3926, 2018) だが、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ていた。胚盤胞補完法は、特定の細胞を作る能力を欠損した動物の胚盤胞に正常な多能性幹細胞を注入することで、欠損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、既に脾臓 (Cell 142:787, 2010; Nature 542:191, 2017) や腎臓 (Am J Pathol 180:2417, 2012; Nat Commun 10:451, 2019) で報告されている。胚盤胞補完法を用いた肺臓器再生について我々を含む 3 グループで相次いで報告された (Nature Med 25:169, 2019; Cell Reports 31:107626, 2020; Am J Respir Crit Care Med, Online ahead of prints 2020)。今後は、異種間キメラや大型動物を用いた研究が進むものと期待されている。しかしながら、いずれの報告でも、肺臓器は多能性幹細胞とレシピエント由来細胞がモザイク状になっており、臨床応用する前に解決しなければならない大きな課題である。上図は、肺組織が GFP 陽性 ES 細胞と陰性レシピエント由来細胞のモザイクであること示している。今後、いかに ES 細胞由来の細胞を増やすかが、今後の課題である。

多能性幹細胞由来疑似胚 (ガストロイド): 受精卵から胚が発生・増殖分化し個体が発生する。多能性幹細胞は、以前より 2 次培養で胚に似た構造をとることが知られており、embryoid body (胚様体) として知られていた。近年、成長因子やその阻害剤を加えた培養条件で Blastoid (胚盤胞に似た構造物) (Nature 557:106, 2018) やガストロイド (原腸胚に似た構造物) まで分化発生が可能であることが、マウス (Nature 562:272, 2018) およびヒト (Nature 582:410 2020) で報告された。これらの報告によれば、ガストロイドには、神経提、中胚葉、内胚葉へ分化しており、体軸の形成も確認されている。また各部位の遺伝子発現パターンも胚の遺伝子パターンと類似していたと報告された。一方、各組織への分化は確認されておらず、このガストロイドが更に分化して各臓器が形成されるかは今後の課題である。

肺発生解析: 初期胚における肺発生の分子機構には、様々な遺伝子関わっていることが明らかとなっている。特に、Wnt, FGF10, Nkx2.1 の解析が行われ、肺発生に必要な不可欠な遺伝子であることが明らかとなっている。初期胚においては、肺は前腸における胚内内胚葉と臓側中胚葉の細胞が共同して、発生分化が開始される。マウス胚において E9.5 に Sox2lo/Nkx2.1lo の前腸細胞が、胚芽となり肺への分化を開始する (Nature Comm 11:458, 2020)。その後、FGF10 が肺葉形成に重要な分子として機能する。

2. 研究の目的

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。我々は、肺欠損マウスに胚盤胞補完法を用いて、マウス ES 細胞を移入し、ES 細胞由来肺臓器を報告した。しかし、作出した肺臓器は ES 細胞とレシピエント由来細胞のモザイクを呈しており、ヒトへの移植を考えるうえで大きな課題となっている。そこで、多能性幹細胞のみで作出可能なガストロイドを使うことによって、3 胚葉から分化を進め、「多能性幹細胞のみで構成する機能的な肺が作出可能か」の「問い」について可能性を検証する。「可能性」が「はい」であれば、ガストロイドの発生分化を継続させるか、途中でマウス子宮に移入させるかの方法で、肺臓器の作出を試みる。

また、胚盤胞補完法を更に進め、異種間キメラ法を用いて、肺欠損マウス胚盤胞にラット ES 細胞を注入し、ラット ES 細胞由来の肺臓器再生をめざすことを目的とする。

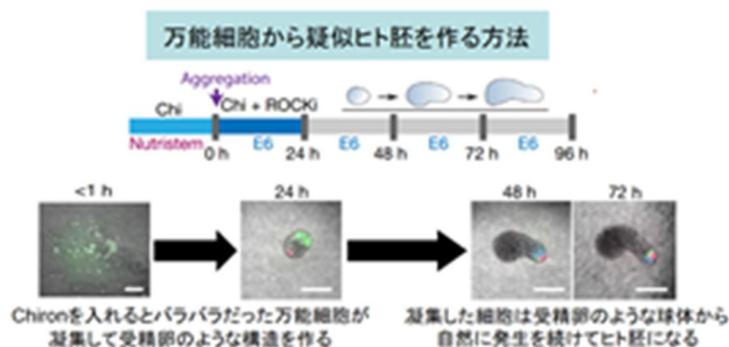
3. 研究の方法

ガストロイド実験

1) マウス ES 細胞による ガストロイドの作成

マウス ES 細胞を既報 (Nature 562:272, 2018) に従い、適切な培養条件下で培養することにより、ガストロイドに分化させる。詳細なプロトコールは、Research Square (DOI

10.1038/proext.2018.094) で発表されているので、これを元にガストロイド作成を試みる。具体的には、ESLIF medium で培養された ES 細胞を 96 well plate で培養を開始し、48 時間後に Chiron を含む N2B27medium に変えて、72 時間後、N2B27 medium 単独に変え培養を継続する。120 時間後は、shaking しながら培養を行いガストロイドの発生分化を促す。右図は、マウスではなくヒトガストロイドの作成の模式図であるが、マウスもほぼ同様の方法でガストロイドを作成する。

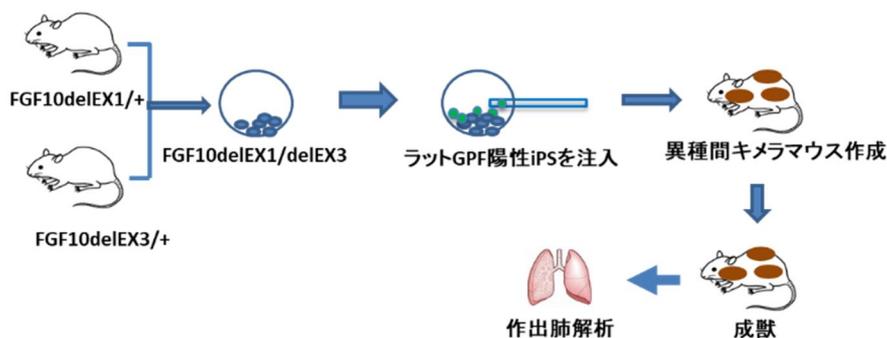


2) マウスガストロイドにおける肺発生に関わる各遺伝子発現解析

1) で作成したガストロイドにおける部位、特に肺の発生に重要な胚体内胚葉に重要な遺伝子である Sox17 や Foxa2, また肺芽に重要な Nkx2.1, Wnt2/2b の発現を、FISH 法、PCR, 蛍光免疫染色法で遺伝子レベルと蛋白レベルで解析する。168 時間培養は E9.5 に相当すると報告されている。E9.5 は、内胚葉内に肺前駆細胞ができる時期であり、Nkx2.1 や Wnt2/2b が発現している可能性がある。FISH 法では、ガストロイド全体における遺伝子発現状況を解析可能である。一方、PCR は定量化、免疫蛍光染色では、どの細胞が発現しているかを知ることが可能である。

異種間キメラと胚盤胞補完法を用いた肺創出

1) FGF10 エクソン 1 欠損ヘテロマウス (FGF10delEX1/+) と FGF10 エクソン 3 欠損ヘテロマウス (FGF10delEX3/+) を交配させて作成した複合ヘテロの胚盤胞にラット ES 細胞を注入し、偽妊娠マウス子宮に移入する。出生したキメラマウス直後または成獣に成長したマウスの肺を解析する。特に肺を構成する各種細胞が、ラット ES 細胞由来かどうか詳細に検討する



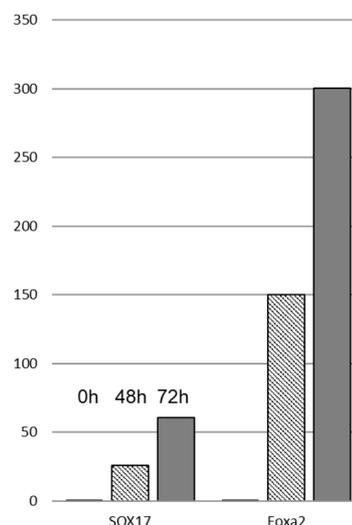
4. 研究成果

ガストロイド実験

疑似胚作製の培地および因子を加えて、48時間、72時間の後、SOX17 と Foxa2 の発現を RTPCR で確認した。右図の通り、両遺伝子ともに発現が上昇し、内胚葉への分化が確認された。

しかしながら、それ以上培養を継続しても 3 次元構造物を持つ疑似胚の生成には至らなかった。培養プレートを攪拌する方法も種々試みたが、組織学的に原腸様の組織を確認できず、TTF-1 や FGF10 の発現上昇も確認できなかった。

今後は、培養技術を向上させ、既報にあるような原腸様組織を持つガストロイド作成をまず成功させる必要がある。



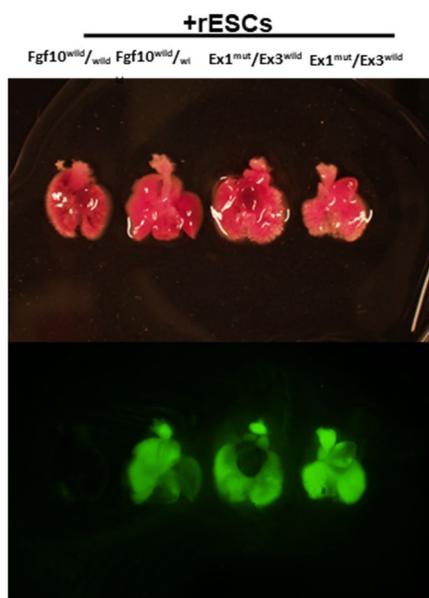
異種間キメラと胚盤胞補完法を用いた肺創出

以下の表に示すように、1123 個の胚盤胞 (FGF10delEx1/Ex3 の確率は 1/4) にラット ES 細胞を移入し、偽妊娠マウスに移植したところ、246 匹の産仔を得、13 匹がキメラマウスあった(1.2%)。13 匹中、wt/wt が 3 匹、delEx1/+ または delEx3/+ が 5 匹、5 匹が複合ヘテロである FGF10delEx1/Ex3 の遺伝子型を示した。5 匹全てに肺の創出が確認された。

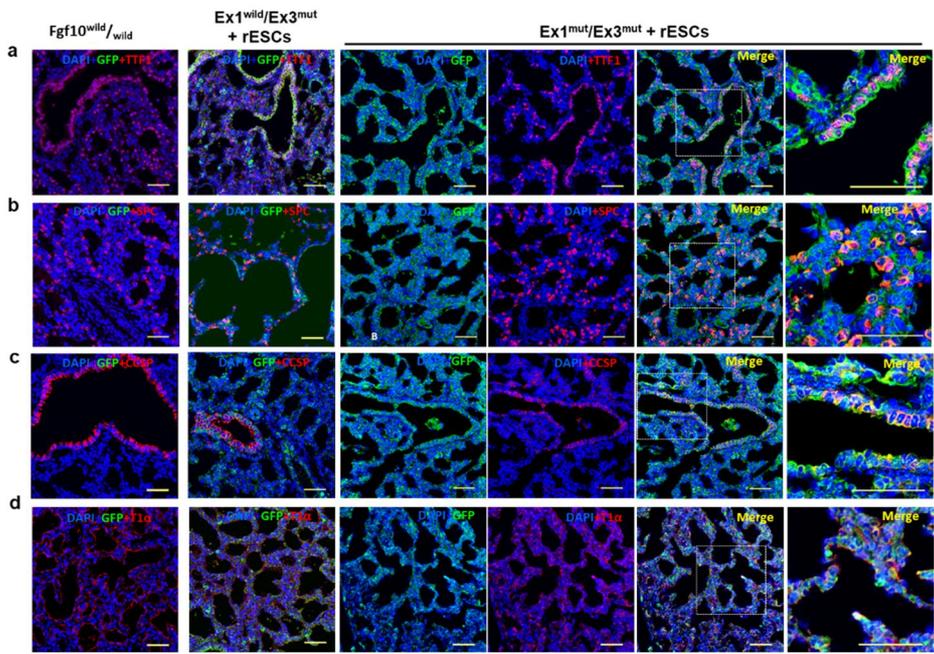
1-12groups blastocyst complementation for lung generation

Analysis stage	Blastocyst transferred	Neonates	Chimeric fetuses	Genotype			Lung complemented
				wild/wild	Ex1 or Ex3 hetero	compound hetero	
Neonate	1123	246 (21.9%)	13 (5.3%)	3	5	5	5 (100%)

複合ヘテロから作出された肺をほかのキメラコントロールに比べると、肺の発生は肉眼的に正常であり、GFP の発現が強かった (下図)



さらに、この肺の詳細な組織学的解析の結果、肺は正常な組織構築を示した。肺上皮細胞を含む多様な細胞に GFP 陽性ラット細胞を認めた。GFP 陽性はラット ES 細胞を示す。



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sawamura Seishiro, Ogata Genki, Asai Kai, Razvina Olga, Ota Takeru, Zhang Qi, Madhurantakam Sasya, Akiyama Koei, Ino Daisuke, Kanzaki Sho, Saiki Takuro, Matsumoto Yoshifumi, Moriyama Masato, Saijo Yasuo, Horii Arata, Einaga Yasuaki, Hibino Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Analysis of Pharmacokinetics in the Cochlea of the Inner Ear	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2021.633505	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 -

1. 著者名 Nakano Mae, Shimada Yoshifumi, Matsumoto Yoshifumi, Saiki Takuro, Zhou Qiliang, Sasaki Kenta, Moriyama Masato, Yoshihara Kosuke, Natsumeda Manabu, Kuriyama Yoko, Takii Yasumasa, Watanabe Gen, Umezu Hajime, Okuda Shujiro, Ikeuchi Takeshi, Wakai Toshifumi, Saijo Yasuo	4. 巻 15
2. 論文標題 Efficacy of BRAF inhibitor and anti-EGFR antibody in colorectal neuroendocrine carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 413 ~ 418
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12328-022-01599-4	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 -

1. 著者名 Matsumoto Yoshifumi, Higuchi Akito, Shiba Marika, Sasaki Kenta, Saiki Takuro, Honma Yujiro, Kimura Kazuyoshi, Zhou Qiliang, Saijo Yasuo	4. 巻 4
2. 論文標題 Termination of Palliative Chemotherapy Near the End of Life: A Retrospective Study of Gastrointestinal Cancer Patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Palliative Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 169 ~ 174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/pmr.2023.0027	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 -

1. 著者名 Sasaki Kenta, Kanda Tatsuo, Matsumoto Yoshifumi, Ishikawa Takashi, Hirota Seiichi, Saijo Yasuo	4. 巻 53
2. 論文標題 Sunitinib therapy for imatinib-resistant and/or intolerant gastrointestinal stromal tumors: comparison of safety and efficacy between standard and reduced dosage regimens	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 297 ~ 303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyac202	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 -

1. 著者名 Saiki Takuro, Ogata Genki, Zhang Qi, Akiyama Koei, Madhurantakam Sasya, Ahmad Norzahirah Binti, Ino Daisuke, Nashimoto Haruma, Matsumoto Yoshifumi, Moriyama Masato, Horii Arata, Kondo Chie, Ochiai Ryosuke, Kusahara Hiroyuki, Saijo Yasuo, Einaga Yasuaki, Hibino Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 A strategy for low-cost portable monitoring of plasma drug concentrations using a sustainable boron-doped-diamond chip	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e15963 ~ e15963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2023.e15963	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0件

〔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	阿部 学 (ABE MANABU) (10334674)	新潟大学・脳研究所・准教授 (13101)	
研究分担者	周 ケイリョウ (SHU KEIRYO) (10770232)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究分担者	笹岡 俊邦 (SASAOKA TOSHIKUNI) (50222005)	新潟大学・脳研究所・教授 (13101)	
研究分担者	小田 佳奈子 (ODA KANAKO) (60708212)	新潟大学・脳研究所・助教 (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