

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 RAN QINGSONG
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 981 号
学位授与の日付 令和3年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Generation of thyroid tissues from embryonic stem cell via blastocyst complementation in vivo.
(胚盤胞補完法と ES 細胞を用いたマウス生体内における甲状腺再生)

論文審査委員 主査 教授 曾根 博仁
副査 教授 堀井 新
副査 特任准教授 藤原 和哉

博士論文の要旨

背景

甲状腺全摘術後などの甲状腺機能低下症の患者に対して甲状腺ホルモン薬の永続的な内服が必要である。甲状腺組織再生及び移植は新しい治療法として期待されている。In vitro で多能性幹細胞から甲状腺濾胞細胞への分化誘導が報告されているが、成熟した濾胞細胞への分化は効率が低く、多くの場合は甲状腺転写因子の導入等の遺伝子操作が必要である。また、未分化な多能性幹細胞による移植後の発がん性問題も残っている。最近、胚盤胞補完法を用いた In vivo での多能性幹細胞による臓器再生が脚光を浴びている。胚盤胞補完法と多能性幹細胞を用いて腎臓、膵臓、血管そして肺臓器の作成がすでに報告されている。Fgf10 (Fibroblast growth factor 10) 遺伝子欠損マウスは甲状腺が欠損或いは低形成であることが報告されており、甲状腺の発生・発育に Fgf10 が重要な役割を担っていることを示されている。

目的

本研究では、胚盤胞補完法を用いて甲状腺が低形成する Fgf10 欠損マウスにおいて ES 細胞由来の成熟した甲状腺組織を作成することを目的とした。

方法

CRISPR/Cas9 システムを用いて Fgf10 Exon1 ヘテロ変異マウスと Exon3 ヘテロ変異マウスを作成した。Exon1 ヘテロ変異マウスと Exon3 ヘテロ変異マウスを掛け合わせるにより Fgf10 複合ヘテロマウスを作成し、甲状腺組織を確認した。さらに体外受精により Fgf10 複合ヘテロ胚を作出し、胚盤胞期に GFP (green fluorescent protein) で標識したマウス ES 細胞 (Embryonic stem cell) をマイクロインジェクションしキメラ胚を作成し、偽妊娠マウスの子宮に移植を行い、産仔を得た。出生後に GFP 発現を確認することによりキメラマウスを同定した。新生児及び離乳まで飼育したマウスから遺伝子解析によりレシピエントとなった胚の遺伝子型が Fgf10 ヘテロ及び複合ヘテロであるマウスを同定した。成獣のキメラマウスの血清を用いて、甲状腺ホルモンレベルを ELISA で調べた。また、キメラマウスを犠牲死させ、マイクロ CT (Computed tomography) 及び甲状腺組織切片を使って組織解析を行った。甲状腺組織の各種マーカーを使い、甲状腺

濾胞組織がどの程度 GFP 陽性の ES 細胞由来する細胞で構成されているか、また、これらの GFP 陽性濾胞細胞が機能的な成熟な濾胞細胞であるかどうかを評価した。

結果

1. Fgf10 Exon1/Exon3 複合ヘテロマウスはホモ欠損と同様に四肢欠損を認めた。複合ヘテロマウスは甲状腺組織が完全欠損ではなく低形成であることを造影マイクロ CT 及び組織染色で確認した。
2. 新生児での解析で、Fgf10 複合ヘテロキメラマウスは野生型マウスと同様に甲状腺組織構造を有し、甲状腺マーカー (TTF1、Thyroglobulin、T3) の発現も同等であった。複合ヘテロキメラマウスの甲状腺濾胞組織は強い GFP 発現を認め、マウス ES 細胞が寄与していることを示した。
3. 成獣の解析で、Fgf10 複合ヘテロキメラマウスの甲状腺組織は野生型マウスと同様な甲状腺組織構造を認めた。野生型マウスの甲状腺組織と比べ、甲状腺濾胞上皮マーカーである TTF1、FOXE1、PAX8、そして甲状腺ホルモン関連マーカーである Thyroglobulin と T3 の発現レベルは同程度であった。複合ヘテロキメラマウスの甲状腺濾胞では 86.4±7.9% の TTF1 陽性濾胞細胞が強い GFP 発現を認め、野生型キメラマウス及びヘテロキメラマウスより優位に ES 細胞由来であることを確認した。
4. ELISA 解析で、成年 Fgf10 複合ヘテロキメラマウスの血清 T3、T4 ホルモンレベルは野生型マウスと比べ有意差を認めなかった。

考察

Fgf10 は主に間葉組織から分泌され、受容体 Fgfr2-IIIb を介して上皮に作用しシグナル伝達を行い、甲状腺の発生・発育にも重要な役割を果たしていると考えられている。申請者らは Fgf10 複合ヘテロマウスにおいて、甲状腺組織が重度な低形成であることを確認した。胚盤胞補完法を用いて、Fgf10 複合ヘテロマウス胚盤胞にマウス ES 細胞を注入することにより、甲状腺の臓器形成がレスキューされ、マウス生体内で ES 細胞由来の甲状腺濾胞を作成することに成功した。ES 細胞由来の甲状腺濾胞は正常な組織構造を持ち、機能を持った成熟な濾胞組織であることを示した。胚盤胞補完法による甲状腺組織再生は甲状腺再生医療の新たな選択肢の一つとして期待できると考える。しかし、本研究においてキメラの作成率は低く、さらなる改良が必要である。また、臨床への応用を目指すためには異種間モデルでの検証や大型動物における甲状腺組織の作出についても検討していく必要がある。

結論

胚盤胞補完法を用いて甲状腺低形成である Fgf10 欠損モデルマウスの生体内に ES 細胞由来の成熟した甲状腺濾胞組織を作成した。

審査結果の要旨

本研究は、胚盤胞補完法を用い、甲状腺低形成の FGF10 欠損マウスにおいて、ES 細胞由来の成熟した甲状腺組織を作成することを目的とした。Exon1 ヘテロ変異マウスと Exon3 ヘテロ変異マウスを掛け合わせるにより FGF10 複合ヘテロマウスを作成し、体外受精により FGF10 複合ヘテロ胚を作成し、胚盤胞期に GFP で標識したマウス ES 細胞をマイクロインジェクションしキメラ胚を作成し、キメラマウスを得た。その成獣血清を用いて、甲状腺ホルモンレベルを ELISA で測定し、さらにマイクロ CT 及び甲状腺組織切片を使って組織解析を行ったところ、FGF10 複合ヘテロキメラマウスは野生型マウスと同様に甲状腺組織構造を有し、甲状腺マーカーの発現も同等であった。また、キメラマウスの甲状腺組織は、野生型マウスと同様な甲状腺組織構造を認め、甲状腺濾胞上皮マーカーの発現レベルも同程度であった。また、血清 T3、T4 ホルモンレベルは野生型マウスと比べ有意差を認めなかった。

以上、胚盤胞補完法を用い、甲状腺低形成の FGF10 欠損モデルマウスの生体内に、ES 細胞由来の成熟した甲状腺濾胞組織を作成し、甲状腺組織再生の新治療法としての可能性を示したもので、学位論文として

の価値を認める。