

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 北原 哲彦  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 964 号  
学位授与の日付 令和2年9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 Lungs by Blastocyst Complementation in Apneumatic Fgf10-Deficient Mice  
(Fgf10 遺伝子欠失マウスに対する胚盤胞補完法を利用した肺再生)

論文審査委員 主査 教授 菊地 利明  
副査 准教授 竹内 新  
副査 講師 上村 顕也

博士論文の要旨

背景と目的

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申請者は考えた。

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。

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。今回遺伝子解析を簡便に行うことを考慮して、遺伝子のホモ変異と同様に機能欠失をもたらす複合ヘテロモデルを作成し利用することとした。Fgf10 遺伝子の Exon1 ヘテロ変異マウスと Exon3 ヘテロ変異マウスから受精卵を作成し複合ヘテロモデルを作出した。この複合ヘテロモデルにおいて肺が無形成あるいは低形成かつ四肢欠損となることを確認した。さらに同様の胚を作出し、胚盤胞期に緑色蛍光タンパク質産生能のある ES 細胞を注入しキメラ胚を作成し産仔を得た。出生時にキメラマウスであるかどうかを緑色蛍光を認めるかどうかにより判定した。キメラマウスを飼育し、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遺伝子型であったことを証明するために遺伝子解析を行った。遺伝子解析の結

果、レシピエントとなった胚の遺伝子型が複合ヘテロであったキメラマウスを犠牲死させ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。

#### 結果

Fgf10Exon1 ヘテロ変異マウスの精子と Exon3 ヘテロ変異マウスの卵子から受精卵を作成し、偽妊娠マウスに導入し産仔を得た。産仔のうち四肢欠損を呈したマウスは肺が無形成あるいは低形成となることを組織切片および造影マイクロ CT (Computed tomography) で確認した。遺伝子型が複合ヘテロとその他で 1:3 の比率となった。続いて同様に作成した受精卵を胚盤胞期まで成長させ、野生型マウス ES 細胞を注入しキメラ胚を作成した。638 個のキメラ胚から 153 匹の産仔を得たが、キメラはそのうち 76 匹であった。36 匹は出生時に死亡したが、それらにも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。出生時に 40 匹のキメラマウスが生存していたがその後 16 匹が離乳後も生存した。遺伝子解析ではそのうち 5 匹の遺伝子型が複合ヘテロであることが判明した。これらのキメラマウスは成育に問題なく、呼吸状態も野生型マウスと変わりなく機能的に正常な肺ができていた。キメラマウスの肺を組織学的に観察し、肺を構成する肺胞上皮細胞やクララ細胞、血管内皮細胞や気管支周囲の平滑筋細胞のいずれも緑色蛍光を示し、ES 細胞由来細胞が大部分を占めていることが判明した。ただし、蛍光を認めない細胞も散見された。

#### 考察

本来肺が無形成あるいは低形成となる遺伝子型をもった Fgf10 遺伝子の複合ヘテロ変異モデルにおいて ES 細胞由来細胞が大部分を占める肺が作成でき、それがマウスの成育において機能的に何ら問題の無い肺であることを示すことができた。マウスモデルにおいて作成できたことを元に、異種間モデルでも作成可能となることや大型動物における臓器作出についても可能性があることを考えた。しかし、本研究においてキメラの作出効率が高いとは言えず、638 個の ES 細胞注入胚から目的とするキメラマウスは 5 匹得られたのみであった。この効率改善は今後の重要な課題と考えた。また、肺を構成する細胞において ES 細胞由来ではない細胞も散見された。Fgf10 遺伝子によりコードされるタンパク質は肺発生において必須のタンパク質であるが、Fgfr2 (Fibroblast growth factor receptor 2) 遺伝子がコードしてできる受容体の存在も重要である。これらの相互作用により肺発生は起きていると考えられている。複合ヘテロモデル胚においても Fgfr2 は機能しており、ES 細胞由来の Fgf10 遺伝子のコードするタンパク質が作用してレシピエント由来の細胞成分も肺内に含まれた可能性が考えられる。よってどちらの遺伝子もノックアウトしたモデルを作成することで 100%ES 細胞由来の肺が作成できる可能性があると考えられる。

#### 結論

肺無形成あるいは低形成となる Fgf10 遺伝子複合ヘテロ変異モデルマウス内に ES 細胞由来の肺を作成した。

#### 審査結果の要旨

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申請者は考えた。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。一方で、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て、本研究に着手した。そして肺無形成あるいは低形成となる Fgf10(Fibroblast growth factor 10)遺伝子複合ヘテロ変異モデルマウス内に ES 細胞由来の肺を作製することに成功した。

胚盤胞を用いることによって、多能性幹細胞から肺を作製できる可能性を示した点において、博士論文としての価値を認める。