

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20216

研究課題名(和文) 気管欠損モデルにおけるiPS細胞を用いた組織再生研究

研究課題名(英文) Regeneration of tracheal epithelium using induced pluripotent stem cells

研究代表者

池田 雅一 (Ikeda, Masakazu)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：40707486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は人工材料を用いた気管欠損部位の再建術において、人工材料内腔面上皮形成期間の短縮を目的としている。in vivoにて生体中でiPS細胞由来の気管上皮組織が腫瘍化することなく生着できることを明らかにした。iPS細胞由来の気管上皮組織が人工材料と共に移植することで上皮形成期間の短縮を実現できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is shortening of the epithelialization period of inner side of artificial materials in the reconstruction of the trachea defect using the artificial materials. It was demonstrated that tracheal epithelium derived from induced pluripotent stem cells could survive without a becoming a tumor in nude rats in vivo. Because a tracheal epithelium derived from induced pluripotent stem cells implanted it to artificial materials and an attendant, the possibility that we could realize shortening of the epithelialization period was demonstrated.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：iPS細胞

1. 研究当初の背景

これまで広範囲な気管欠損部に対しては、自家組織移植が行われてきたが、侵襲が大きい上、機能・美容上の問題がある。1995 年以降、中村、大森は体内で組織再生を誘導する *in situ* Tissue Engineering の手法で、ポリプロピレンメッシュにコラーゲンスポンジを付加した人工材料を開発し、これを足場（スキヤフォールド）として動物実験で気管の再生を実現した。2002 年より本技術を用いて臨床応用し良好な結果を得ている（Omori K, et al. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008）。しかし、臨床応用での課題は気管内腔面の上皮形成に 2 カ月を要することが問題とされており、感染などのリスクを減らすために上皮形成期間の短縮を課題と位置付けてきた。

近年、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を用いた再生医療を実現すべく様々な領域で研究が進められている。iPS 細胞は胚性幹細胞（ES 細胞）と同じく多能性を有する幹細胞であり、ES 細胞の倫理的問題や拒絶反応の問題が回避できる。本講座でも *in vitro* においてマウス iPS 細胞から気管上皮組織への分化誘導を報告している（Otsuki K, et al. *Laryngoscope* 2013）。しかし、今後の臨床応用へ向けて本手法で分化誘導した気管上皮組織が生体に生着させるための手法や移植に適した組織であるかの評価を行う必要があった。多分化能を有する iPS 細胞から分化誘導した気管上皮組織が人工材料と共に生体へ移植することが可能となれば、人工材料内腔面の上皮形成期間を著しく短縮できる可能性が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は *in vitro* でマウス iPS 細胞から気管上皮組織への分化誘導した手法（Otsuki K, et al. *Laryngoscope* 2013）を用いて、気管上皮組織への分化誘導の過程を継時的に検証し、移植に適した成熟した気管上皮組織であるかを検証する。また、気管上皮組織を人工材料と共にヌードラットへ移植し組織学的に評価を行う。

3. 研究の方法

マウス iPS 細胞の培養

京都大学より使用承諾を受け理化学研究所バイオリソースセンターより購入したマウス線維芽細胞由来 iPS 細胞（iPS-MEF-Ng-20D-17）をフィーダー細胞上で培養し、十分量の iPS 細胞を確保する。

分化誘導

トリプシン処理を行い、iPS 細胞を単離させる。iPS 細胞は Knockout Serum Replacement (KSR) を 10% 濃度で含有した無血清培地中で 1000 個の細胞数で浮遊培養させることで胚様体を形成した。iPS 細胞から形成した胚様体を activin A(100ng/ml)と b-FGF (100ng/ml)を含有した無血清培地中で 5 日間接着培養し、その後 Air liquid interface（以下 ALI）環境下で接着培養を継続することで気管上皮組織への分化誘導を行った（Otsuki K, et al. *Laryngoscope* 2013）。

継時的評価

組織学的評価：分化誘導した気道上皮組織が移植に適する成熟した組織であるかを、ALI 環境下で培養中の胚様体を継時的に評価することで検討した。接着培養開始後 12 日目、19 日目、26 日目、33 日目の胚様体を Hematoxylin & Eosin(H . E .) 染色による組織学的所見で線毛上皮構造が出現しているかを評価した。さらに蛍光免疫染色によって線毛構造に α -tubulin IV の発現と上皮間に ZO-1 の発現を評価した。

遺伝子学的評価：リアルタイム PCR 法にて線毛上皮のマーカーである α -tubulin IV と FoxJ1、iPS 細胞のマーカーである GFP と nanog について評価した。

iPS 細胞から分化誘導した気管組織の移植 ALI 環境下で接着培養を行い気管上皮組織への分化を確認した胚様体が包埋された人工材料を移植したものを「ALI model」とした。比較対象は ALI 環境下で接着培養を開始する前の状態の胚様体をコラーゲンゲルに包埋した「without ALI model」、胚様体を包埋していないコラーゲンゲルのみを塗布された「control model」とした。

移植材料の作成：医療用ポリプロピレン製メッシュの内側及び外側にブタ由来アテロコラーゲンを真空凍結乾燥法により付加しコラーゲンスポンジの層を形成させる。型コラーゲンゲルを人工材料の片側に塗布する。

iPS 細胞由来気管上皮組織の人工材料への包埋：人工材料に塗布されたコラーゲンゲル内に iPS 細胞由来の気管上皮組織を胚様体の形態で 1 つの人工材料につき 12 個包埋させた。

気管欠損モデル作成：全身麻酔下に 7-9 週齢免疫不全ラット（F344/NJcl-rnu/rnu）の気管を露出させ、気管欠損モデルを作製した。前頸部皮膚を縦切開し、前頸筋を白線で分けると気管壁に到達し、第 2・3 気管軟骨前部を切除し開窓した（開窓部は 1.5 × 2.5 mm とする）。人工材料のコラーゲンゲル塗布面を気管内腔面となるように気管開窓

部を覆った。人工材料と気管壁は縫合せず、前頸筋で被覆し固定し、皮下組織・皮膚を縫合した。1週間後に気管欠損部位の再生組織を人工材料と供に摘出した。

蛍光蛋白標識された iPS 細胞を用いた in vivo での調査

iPS 細胞に蛍光蛋白である tdTomato を遺伝子導入し、これを同様の方法で気管上皮組織へ分化誘導させて移植することで、生体中での移植した iPS 細胞由来組織の影響を検討した。

4. 研究成果

In vitro

継時的組織学的評価

胚様体の組織学的評価は H.E. 染色ですべての評価段階において上皮細胞様細胞が管腔構造を形成していた。線毛様構造は 26 日目以降の胚様体中に確認できた。蛍光免疫染色では線毛様構造に tubulin IV の発現が認められ、上皮様細胞の細胞間にはタイトジャンクションのマーカである ZO-1 の発現が認められた。接着培養開始後 26 日程度で線毛構造が出現し上皮組織としての成熟が得られると判断した。

iPS 細胞から分化誘導した気管上皮組織を人工材料とともにヌードラットへ移植するタイミングは接着培養開始後 26 日目の胚様体とした。

real time PCR

評価する対象はコントロールとして未分化な iPS 細胞と、接着培養開始前の胚様体、ALI 培養前の胚様体、線毛構造が組織学的に認められた接着培養開始後 26 日目の胚様体について比較した。線毛上皮マーカーである tubulin IV と FoxJ1 は 26 日目において高値であり、未分化マーカーである GFP と Nanog は継時的に減少していた。接着培養 26 日目の胚様体において、iPS 細胞から気管上皮組織へ分化誘導されていることが定量的も確認された。

In vivo

移植標本の組織学的評価

iPS 細胞由来の組織を含有する ALI モデルと without ALI モデルは気管欠損部の 2-3 層の細胞からなる上皮形成を認めたが、control モデルは気管欠損部には明らかな上皮形成を認めなかった。ALI モデルにおいて気管欠損部周囲の再生組織中に iPS 細胞由来組織と考えられる線毛構造を有した管腔状の上皮様構造が生着していた。Without ALI モデルでは気管欠損部周囲の再生組織中に腫瘍化した iPS 細胞由来組織が確認された。control

モデルの再生組織中には iPS 細胞を移植したモデルのような組織は認めなかった。ALI モデルとして移植された 26 日間接着培養を行った iPS 細胞は ALI 環境下で維持培養を継続されたことにより分化が進行し腫瘍化を来すことなく生着できたと判断された。これは in vitro の結果と矛盾しないと考えられた。蛍光免疫染色では ALI モデルにおいて線毛様構造に α -tubulin IV の発現と、上皮構造の細胞間に ZO-1 の発現を認められ、上皮構造がバリアとして働く機能を有していることが推測された。

tdTomato 標識 iPS 細胞の移植

tdTomato で標識した iPS 細胞をこれまでと同様の方法で気管上皮組織へ分化誘導した。蛍光抗体法を用いた免疫染色で tdTomato の発現を確認すると移植したヌードラットの再生組織中で一塊となって存在していることが明らかになった。気管欠損部の再生上皮中には tdTomato を発現する細胞は認めなかった。

これらの結果より iPS 細胞由来の気管上皮組織は本手法によって気管欠損部位への上皮配置には至らなかったものの、上皮として成熟した構造を有したまま生体に生着できる可能性が期待できるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Masakazu Ikeda, Koichi Omori, et al. Regeneration of tracheal epithelium using mouse induced pluripotent stem cells. Acta Otolaryngol. 136(4):373-8, 2016

〔学会発表〕(計 4 件)

Masakazu Ikeda, Koichi Omori, et al. Differentiation of induced pluripotent stem cell for regeneration of tracheal epithelial cells. 136th The Annual Meeting of the American Laryngological Association 平成 26 年 4 月 22 日 ~ 4 月 23 日, Boston, MA, USA

Masakazu Ikeda, Koichi Omori, et al. Implantation of tracheal epithelium using mouse induced pluripotent stem cells. 137th The Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association 平成 27 年 4 月 26 日 ~ 4 月 27 日, Chicago, IL, USA

Masakazu Ikeda, Koichi Omori, et al. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cell towards tracheal epithelial cells. 13th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology

-Head and Neck Suregery 平成 26 年 12 月 3 日
~ 12 月 4 日 東京

池田雅一, 大森孝一, 他. マウス iPS 細胞を用いた気管上皮組織の再生研究. 第 14 回日本再生医療学会総会 平成 26 年 3 月 19 日~3 月 21 日 横浜

6.研究組織

(1)研究代表者

池田 雅一 (Ikeda Masakazu)
福島県立医科大学 医学部 助手
研究者番号 40707486

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし