

機関番号：21601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890207

研究課題名（和文）iPS細胞を用いた喉頭及び気管軟骨の分化誘導に関する研究

研究課題名（英文）Potential of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells for the Regeneration of the Tracheal Wall

研究代表者

今泉 光雅 (IMAIZUMI MITSUYOSHI)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：30554422

研究成果の概要（和文）：iPS細胞をコラーゲンゲルに包埋し、さらに足場となるコラーゲンスポンジに浸透させることにより、足場内での培養に成功した。軟骨分化誘導培地を使用し、軟骨形成を図った結果、軟骨様組織が得られた。得られた組織片の組織像、蛋白質や遺伝子の発現に関して評価を行い、軟骨への分化が確認された。得られた軟骨組織片を含む足場材料の移植を免疫不全ラットの気管欠損部に行った。iPS細胞由来の軟骨様組織の形成が認められ、iPS細胞を利用した軟骨組織の再生が示された。

研究成果の概要（英文）：Our study demonstrated that iPS cells have the potency to differentiate into chondrogenic cells, as shown by the appearance of Alcian blue-stained colonies and expression of a cartilage-associated gene of collagen type II in vitro. Implanted iPS cells were confirmed to exist in the 3D scaffold in vivo. Cartilage-like tissue was regenerated in tracheal defect using iPS cells. Our results suggest the potential of iPS cells for the regeneration of the tracheal wall.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,040,000	312,000	1,352,000
2010年度	940,000	282,000	1,222,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,980,000	594,000	2,574,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：iPS細胞、軟骨分化誘導、気管再生

1. 研究開始当初の背景

- (1) 臨床において癌や外傷、炎症、先天性奇形などにより喉頭や気管といった

気道の一部を切除せざるを得ない場合があり、代替となる気道再建材料の開発は急務である。

- (2) 動物実験レベルでの cell source に関して、同種あるいは他種由来の再生軟骨を喉頭や気管などの気道の骨格として利用することは長期安定性において非常に難しいとされてきたが、自己由来 iPS 細胞から得られた軟骨組織は、移植後体内での長期安定性が得られる可能性がある。
- (3) これまで我々が扱ってきた人工気管の骨格はポリプロピレンを物性的に気道に適合するように加工しており、長期間安定していることが証明されている半面、人工材料の半永久的な体内留置が避けられず、また成長期にある小児に対しては気道の成長に対する影響を考慮し、この人工気管による気道再建の適応外とされている。
- (4) 適切な足場材料と分化誘導で得られた軟骨細胞を組み合わせて得られた再生軟骨組織を気道の骨格として利用できれば、人工材料の長期留置からの脱却を図れるとともに、小児への適応可能な人工気管の開発に道を開く可能性がある。更に多分化能を有する iPS 細胞を用いて、in vitro で質的、量的に気管軟骨に近い形で分化誘導が可能となれば、人工材料の体内留置を避け得る可能性も有している。

2. 研究の目的

気道の軟骨再生に最適な足場材料の開発、マウス線維芽細胞由来 iPS 細胞の軟骨細胞への分化誘導技術の開発、およびこの両者を組み合わせて得られた軟骨組織に関して動物への移植実験等により気道の骨格としての有効性、長期安定性などについての検証を行い、気道の内腔保持を担う骨格として利用可能な軟骨組織の作製手法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 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、十分量のストックを確保する。

(2) 足場材料の開発：

アテロコラーゲンに凍結乾燥を施し、コラーゲンスポンジを作製する。作製工程での条件を変え、軟骨再生を行う上で最適な条件を探索していく。

(3) iPS 細胞の軟骨への分化誘導技術の開発：

培養過程で使用していたフィーダー細胞を分離し、マウス iPS 細胞を純化する。三次元培養方法として、iPS 細胞をコラーゲンゲルに包埋しさらに足場となるコラーゲンスポンジ浸透させる。軟骨分化誘導培地を使用し、軟骨への分化誘導を試みる。得られた軟骨組織片の組織像、蛋白質や遺伝子の発現に関して評価を行う。

(4) 喉頭気管軟骨欠損部への移植：

全身麻酔下に免疫不全ラットの気管を露出させ、気管軟骨部分欠損モデルを作成する。前項で得られた細胞と足場材料を欠損にあわせて加工し、移植を行う。観察期間ののちに安楽死を施し、喉頭または気管を摘出する。気管軟骨の再建部位の組織像、蛋白質や遺伝子の発現に関して評価を行う。

(5) 評価：

標本作製：凍結切片及びパラフィン切片の双方を作製。必要に応じ各種染色（免疫染色を含む）を行う。組織学的評価：通常の光学顕微鏡のほか、蛍光顕微鏡を用いて各細胞モデルについて気管の再生部位の組織学的変化を観察・評価する。観察項目としては、軟骨形成の有無、形態。周囲組織との適

合性の確認 (H-E 染色)。軟骨細胞の
形質—コラーゲンタイプ II (免疫染色)
を行う。

4. 研究成果

(1) 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、十分量のストッ
クを確保することに成功した。

(2) 足場材料の開発 :

アテロコラーゲンに凍結乾燥を施し、
コラーゲンスポンジを作製した。

(3) iPS 細胞の軟骨への分化誘導技術の開 発 :

培養過程で使用していたフィーダー
細胞を分離し、マウス iPS 細胞を純化
し、iPS 細胞をコラーゲングルに包埋
し、さらに足場となるコラーゲンスポ
ンジ浸透させることにより、足場内
での培養に成功した。

(4) 軟骨分化誘導培地の使用し、iPS 細胞 の軟骨分化を誘導し、軟骨形成を 図った結果、軟骨様組織が得られた。 得られた軟骨組織片の組織像、蛋白質 や遺伝子の発現に関して評価を行い、 軟骨関連蛋白や遺伝子の発現が確認 された。

(5) 喉頭気管軟骨欠損部への移植による 評価 :

全身麻酔下に免疫不全ラットの気管
を露出させ、気管軟骨部分欠損モデル
を作成した。上記により、得られた軟
骨組織片を含む足場材料を欠損にあ
わせて加工し、移植を行った。4 週間
の観察期間ののちに安楽死を施し、

iPS 細胞を含有した足場材料を、気管
と共に一塊として摘出した。その後、
気管軟骨の再建部位の組織像に関し
て評価を行った。全例ではないが、足
場材料内に iPS 細胞由来の軟骨様組織
の形成が認められ、気管欠損部におけ
る、iPS 細胞を利用した軟骨組織の再
生が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Mitsuyoshi Imaizumi, Yukio
Nomoto, Takashi Sugino,
Masao Miyake, Ikuo Wada,
Tatsuo Nakamura, Koichi
Omori.
Potential of Induced
Pluripotent Stem (iPS) Cells
for the Regeneration of the
Tracheal Wall.
Annals of Otology, Rhinology
& Laryngology. Oct;119
(10):697-703, 2010.
(査読有り)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 今泉光雅、第 7 回信越セミナー、
「iPS 細胞を利用した軟骨組織再
生：気管組織再生の試み」、2011
年 3 月 5 日 (長野)
- ② 今泉光雅、第 62 回日本気管食道科
学会総会ならびに学術講演会、「iPS
細胞を利用した軟骨組織再生：気管
組織再生の試み」、2010 年 11 月 5
日 (別府)
- ③ Mitsuyoshi Imaizumi
Variation of safety for tracheal

regeneration with iPS cells.
The 114th Annual Meeting & OTO
EXPO American Academy of
Otolaryngology – Head and Neck
Surgery, Boston, September 28,
2010.

- ④ Mitsuyoshi Imaizumi.
Tracheal regeneration with iPS
cells.
Phonosurgery Symposium in
Kyoto, Kyoto, September 11, 2010.
- ⑤ 今泉光雅、 第 59 回 日本耳鼻咽喉科学会・東北地方部会連合学術講演会、「気管欠損部における iPS 細胞を利用した軟骨組織再生の試み」、2010 年 7 月 24 日（秋田）
- ⑥ 今泉光雅、 第 111 回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、「気管欠損部における iPS 細胞を利用した組織再生の可能性」、2010 年 5 月 20 日（仙台）
- ⑦ Mitsuyoshi Imaizumi The 90th Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association, “Potential of IPS Cells for the Regeneration of the Tracheal Wall”, Las Vegas, April 28, 2010.
- ⑧ 今泉光雅、 第 9 回 日本再生医療学会総会、「IPS 細胞移植における奇形腫形成：気管と腹部への移植において」、2010 年 3 月 18 日（広島）
- ⑨ 今泉光雅、 第 22 回 日本喉頭科学会、「気管欠損への iPS 細胞含有人

工材料移植の試み」 2010 年 3 月 5
日（下関）

[その他]
ホームページ等
<http://ameblo.jp/regenerative-kyoto/entry-10708008469.html>
<http://www.ips-tokku.cira.kyoto-u.ac.jp/thesis/archives/201011/19-094057.html>
http://www.ips-network.mext.go.jp/open/2010/10/potential_of_induced_pluripotent_stem_cells_for_the_regeneration_of_the_tracheal_wall.html
<http://www.minpo.jp/view.php?pageId=4107&blockId=9794853&newsMode=article>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今泉 光雅 (IMAIZUMI MITSUYOSHI)
福島県立医科大学・医学部・助手
研究者番号：30554422

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし