

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：21601
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22390317
 研究課題名（和文） iPS 細胞を用いた頭頸部臓器再生技術の研究開発
 研究課題名（英文） Study of the head and neck organ regeneration technology using iPS cells
 研究代表者 大森 孝一（OMORI KOICHI）
 福島県立医科大学・医学部・教授
 研究者番号：10233272

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、頭頸部臓器を再生するためにマウス iPS 細胞から頭頸部組織に分化誘導する技術を確立することにある。iPS 細胞から分化誘導した軟骨細胞をスキャフォールドに導入し、動物モデルの気管欠損部に移植したところ、軟骨様組織の再生が認められた。また iPS 細胞から胚様体を介して上皮様組織の再生が認められた。世界に先駆けて iPS 細胞による頭頸部臓器再生の第一歩となる技術が得られた。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to establish a technique for differentiation from iPS cells into head and neck tissues in order to regenerate head and neck organs. The scaffold involving chondrogenic cells which were differentiated from iPS cells was implanted into the tracheal defect of animal models. Regeneration of the cartilage tissue was histologically recognized. Regeneration of the epithelial-like tissue was also recognized through embryoid bodies from iPS cells. This is the first study to demonstrate the potential of iPS cells for the regeneration of the head and neck tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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：頭頸部外科学 再生医学 iPS 細胞

1. 研究開始当初の背景

頭頸部の臓器は呼吸、嚥下、発声、構音という生命維持に必須の機能に寄与している。口腔、咽頭、鼻腔、喉頭、気管などが癌や炎症で侵された場合、病変切除後に患者自身の他の部位の組織を移植する再建方法があるが、複数部位、複数回の手術を要し、侵襲は増加し、機能障害なく再建することは難しい。

研究代表者らは、ポリプロピレンメッシュとコラーゲンスポンジのハイブリッド構造からなる再生誘導型の人工材料を開発した。しかしながら頸部気管、輪状軟骨弓部の欠損が現時点での適応で、声帯、甲状軟骨、咽頭など他の頭頸部の組織再生については、臨床応用できる医療技術レベルには到達していない。

2006年、山中らは人工多能性幹細胞(induced Pluripotent Stem Cell: iPS細胞)を樹立した。iPS細胞によりES細胞における倫理的問題や拒絶反応の問題が克服されたといえる。本研究ではiPS細胞の分化誘導技術を確立し、その細胞を移植することで頭頸部領域の組織再生に活用する。

2. 研究の目的

本研究ではiPS細胞を各種の細胞に分化誘導する効率的な技術を確立し、その細胞をスキャフォールドとともに動物モデルの組織欠損部に移植して、組織学および機能的再生の効果と安全性を検証し、頭頸部領域における再生医療基盤技術の研究開発を行う。

3. 研究の方法

(1) iPS細胞の培養技術の確立

マウス iPS 細胞の培養には、フィーダー細胞として SNL 細胞(SNL 76/7)を使用する。SNL 細胞にマイトマイシン C を作用させ、増殖を止めた後回収し、ゲラチン処理したディッシュに播種し、1日培養する。液体窒素で凍結保存されたマウス iPS 細胞を融解して回収し、puromycin を添加した iPS 細胞用培地に懸濁する。SNL 細胞の入ったディッシュに iPS 細胞を播種し、培養を行う。得られた iPS 細胞のコロニーについて、未分化性の検証をアルカリフォスファターゼ染色にて評価する。このようにして未分化な iPS 細胞を十分に得る。

(2) iPS細胞の分化誘導技術の確立

[気道上皮への分化誘導]

ディッシュに純化した iPS 細胞を播種する。分化誘導因子としてケラチノサイト増殖因子やレチノイン酸を培養液に添加する。酵素処理にて細胞を回収し、多孔性膜上に細胞を播種して Air-Liquid Interface の環境下でさらに培養を行い、気管上皮様組織を得る。

[軟骨への分化誘導]

ディッシュに純化した iPS 細胞を播種し単層培養を行う。分化誘導因子として bone morphogenetic protein 2(BMP-2) や TGF- β 3 や分化誘導培地を用いて培養を行う。スキャフォールドとして I 型コラーゲン溶液を凍結乾燥させてスポンジを作製し、分化誘導した細胞を播種する。一方でコラーゲンゲルに分化誘導した細胞を包埋する。それぞれの分化誘導因子を添加した培地を用いて三次元培養を行い軟骨様組織を得る。

(3) 分化誘導した細胞を層ごとに組み込んだスキュフォールドの作製と移植

[iPS 細胞由来の遺伝子解析]

頭頸部領域に移植され、形成された組織を Laser Microdissection のテクニックを用いて採取する。採取された組織が iPS 細胞由来であるかを PCR の手法を用いて GFP 遺伝子の有無により遺伝子レベルで解析する。

[層ごとに細胞を組み込んだ移植材料の作製]

I 型コラーゲンを凍結乾燥させてコラーゲンスポンジとし、再生を目的とする頭頸部臓器に合わせてさまざまな形状のスキュフォールドを作製する。上皮層の再生に活用するため SD 系ラットの真皮から線維芽細胞を、また脂肪組織から脂肪組織由来幹細胞を得る。スキュフォールド内で iPS 細胞由来の軟骨細胞を培養してコラーゲンを重層し、さらに iPS 細胞由来の気管上皮様組織を得て、スキュフォールド内に導入し、培養組織(ハイブリッド材料)を作製する。

[動物への移植]

全身麻酔下にヌードラットの気管を露出させ開窓し気管欠損とする。先に作製した移植材料を気管欠損部に固定し閉創する。一定の観察期間の後、気管を採取して組織学的に評価する。

[再生組織の評価]

上皮層の評価には、線毛細胞、杯細胞、基底細胞に特異的なタンパク質の局在を免疫組織化学的手法で観察し、発現量を real-time PCR で測定する。基底膜形成の評価には、上皮層-上皮層をサイトケラチン AE1/3、および線毛特異的のマーカである β -チューブリン IV、Foxj1 の抗体による免疫組織化学的手法で観察する。軟骨の評価は HE 染色、アルシアンブルー染色で行い、免疫組織化学的手法を用いて軟骨器質特異的蛋白

type II collagen の発現を確認する。

4. 研究成果

(1) iPS 細胞の培養技術の確立

マウス iPS 細胞の培養には、フィーダー細胞として SNL 細胞 (SNL 76/7) を使用した。SNL 細胞にマイトマイシン C を作用させ、増殖を止めた後回収し、ゲラチン処理したディッシュに播種し、1 日培養した。液体窒素で凍結保存されたマウス iPS 細胞を融解して回収し、puromycin を添加した iPS 細胞用培地に懸濁した。SNL 細胞の入ったディッシュに iPS 細胞を播種し、培養を行った。複数回の継代を経たマウス iPS 細胞をアルカリフォスファターゼ染色にて未分化能を保持していることを確認した。

(2) iPS 細胞の分化誘導技術の確立

[気道上皮への分化誘導]

iPS 細胞とフィーダー細胞を分離し、得られた iPS 細胞を低接着性のプレートに播種し、数日間培養し胚様体を形成させた。胚様体をゼラチンコートした培養皿に移し、接着培養を行った。培地にアクチビンや b-FGF などの増殖因子を加え培養を継続すると気管上皮様細胞が誘導された。通常の光学顕微鏡のほか、H-E 染色、免疫染色にて評価し組織学的に線毛様細胞の存在を確認した。

[軟骨への分化誘導]

ディッシュに純化した iPS 細胞を播種し単層培養を行った。分化誘導因子として bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) や TGF- β 3 や分化誘導培地を用いて培養を行った。スキュフォールドとして I 型コラーゲン溶液を凍結乾燥させてスポンジを作製し、分化誘導した細胞を播種した。一方でコラーゲンゲルに分化誘導した細胞を包埋した。それぞれの分化誘導因子を添加した培地を用いて三次元培

養を行った結果、H-E 染色、アルシアンブルー染色により軟骨基質の存在が確認された。また、RT-PCR により、軟骨特異的遺伝子である II 型コラーゲンの発現が認められた。

(3) 分化誘導した細胞を層ごとに組み込んだ
スキャフォールドの作製と移植
[iPS 細胞由来の遺伝子解析]

頭頸部領域に移植され、形成された組織がマウス iPS 細胞由来であることを Laser Microdissection(LMD)を用いて遺伝子レベルで解析した。パラフィン切片上の軟骨組織、腫瘍、ラット前頸筋サンプルを LMD にて採取し、PCR、電気泳動を行った。GFP 遺伝子は、iPS 細胞、腫瘍、軟骨組織において認められ、再生した軟骨組織がマウス iPS 細胞由来であることを証明した。

[層ごとに細胞を組み込んだ移植材料の作製]

I 型コラーゲンを凍結乾燥させてコラーゲンスポンジとし、再生を目的とする頭頸部臓器に合わせた形状のスキャフォールドを作製した。ラットの真皮から線維芽細胞を、脂肪組織から脂肪組織由来幹細胞を得て、スキャフォールド内で両細胞を包埋したコラーゲンゲルを重層したところ、成熟した上皮再生が早期に得られた。iPS 細胞由来の気管上皮細胞や軟骨細胞については、層ごとに細胞を組み込んだ培養組織を作製するには量的に不十分であった。

[動物への移植]

全身麻酔下にヌードラットの気管を開窓し気管欠損モデルを作った。先に作製しておいた移植材料を気管欠損部に固定して再建し閉創した。一定の観察期間の後、気管を採取して組織学的に評価した。

[再生組織の評価]

上皮層の評価には、線毛細胞、杯細胞、

基底細胞に特異的なタンパク質の局在を免疫組織化学的手法で観察した。基底膜形成の評価には、上皮-上皮層をサイトケラチンAE1/3、および線毛特異的マーカーである β -チューブリンIV、Foxj1 の抗体による免疫組織化学的手法で観察した。軟骨の評価は HE 染色、アルシアンブルー染色で行い、免疫組織化学的手法を用いて軟骨器質特異的蛋白 type II collagen の発現を確認した。

本研究により、世界に先駆けた iPS 細胞による頭頸部組織再生の第一歩となる技術が得られた。臨床応用を目指した場合、再生した組織の安定化、欠損部全体にわたる十分な量の組織を得ることなど、解決すべき課題は多い。しかしながら、iPS 細胞は自己組織から作製が可能で、倫理的問題と拒絶反応を軽減できる点で優れており、今後の研究展開が期待される。

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 3 件)

① Mitsuyoshi Imaizumi, Koichi Omori, et al. Potential of induced pluripotent stem cells for the regeneration of the tracheal wall. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2010; 119:697-703.

② Mitsuyoshi Imaizumi, Koichi Omori, et al, Evaluation of the Use of Induced Pluripotent Stem Cells(iPSCs) for the Regeneration of Tracheal Cartilage: Cell Transplant 2013;22:341-353.

③ Mitsuyoshi Imaizumi, Koichi Omori, et al, Implantation site-dependent differences for tracheal regeneration with induced pluripotent stem cells

(iPSCells):ActaOto-Laryngol2013;133:4
05-411

④ Koshi Otsuki, Koichi Omori, et al,
Potential for Respiratory Epithelium
Regeneration From Induced Pluripotent
Stem Cells: Ann Otol Rhinol Laryngol:
2013;122:25-32

〔学会発表〕(計8件)

① Koichi Omori, Regenerative Medicine
of the Cricoid and Trachea, The 4th World
Voice Congress, 平成22年9月9日, Seoul

② 今泉光雅、大森孝一、他、iPS細胞を利用
した軟骨組織再生:気管組織再生の試み、
第62回日本気管食道科学会、平成22年11
月5日、別府

③ 今泉光雅、大森孝一、他、iPS細胞移植
による気管欠損部の組織再生:フローサイ
トメーター (FACS) による細胞解析と奇
形腫形成、第23回日本喉頭科学会総会・
学術講演会、平成23年4月10日、旭川

④ Mitsuyoshi Imaizumi, Koichi Omori,
et al, Implantation site dependent
differences for tracheal regeneration
with iPS cells, The 114th Annual
Meeting of Triological society 平成23
年4月29日、Chicago

⑤ 今泉光雅、大森孝一、他、マウスiPS細胞
を利用した気管軟骨組織再生:レーザー
マイクロダイセクションによる移植細胞の
DNA解析、第112回日本耳鼻咽喉科学会
総会・学術講演会、平成23年5月20日京
都

⑥ Koichi Omori, Mitsuyoshi Imaizumi, et
al. Potential of induced pluripotent stem
cells for regeneration of the tracheal wall.

COLLEGIUM

OTO-RHINO-LARYNGOLOGICUM

AMICITIAE SACRUM

平成23年8月26日～平成23年8月29
日, Rome

⑦ Koshi Otsuki, Koichi Omori, et al.
Regeneration of respiratory
epithelium-like tissue from induced
pluripotent stem cells,

The 92nd Annual Meeting of the
American Broncho-Esophagological
Association, 平成24年4月18日～平成
24年4月19日 San Diego

⑧ 大森孝一、気管の再生医療、日本臨床
麻酔学会第32回大会、平成24年11月
1日～平成24年11月3日、郡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大森 孝一 (OMORI KOICHI)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10233272

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中村 達雄 (NAKAMURA TATUO)
京都大学再生医科学研究所・准教授
研究者番号: 70227908

和田 郁夫 (WADA IKUO)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40182969