

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 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659228

研究課題名（和文）ヒト上皮培養細胞を用いた多能性幹細胞の樹立と組織構築の研究

研究課題名（英文）Research for the establishment of pluripotent stem cells from normal human culture cells and tissue engineering

研究代表者

嶋田 裕 (Shimada Yutaka)

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・准教授

研究者番号：30216072

研究成果の概要（和文）：

ヒト正常消化管上皮の培養継代可能なヒト食道上皮細胞株を9株樹立し、ヒト胃上皮細胞の培養では1症例で継代が可能であった。胆嚢上皮細胞では継代可能細胞株1株が作成可能であった。京大にて食道上皮 TYE-1 より iPS 細胞を1株作製したが感染で失った。一方、組織構築のために各種消化管の間質細胞の作成に取り組み、食道線維芽細胞株2株、胃線維芽細胞株2株、胆嚢線維芽細胞1株、胆道線維芽細胞1株、平滑筋腫2株などの樹立に成功した。今後の組織構築に応用予定である。

研究成果の概要（英文）：

We have established 9 human esophageal epithelial cell strains, one human gastric epithelial cell strain and one gall bladder epithelia cell strain. We have established iPS cells from esophageal epithelial cells (TYE-1), however we lost it due to infection. In order to support establishment of tissue structure, we also have established 2 esophageal fibroblast cell strains, 2 gastric esophageal fibroblast cell strains, 1 gallbladder fibroblast cell strain, 1 bile duct fibroblast cell strain, 2 leiomyoma cell strains and so on.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：実験外科学

1. 研究開始当初の背景

① iPS 細胞

研究協力者である山中伸弥は最近、マウス皮

膚由来線維芽細胞に4つの転写因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, myc) を導入することにより ES 細胞に類似した多能性幹細胞である人工多

能性幹細胞（以下 iPS）細胞が樹立されることを明らかとし（Cell 2006）、さらにヒト線維芽細胞でも iPS 細胞の樹立が可能であることを報告した（Cell 2007）。すでに myc を除いた 3 つの転写因子で iPS 細胞が作成出来ることが確認されているが、リプログラミングの機構についてほとんど解っていないことから、安全性についてはまだ解析の端緒にいたばかりである。連携研究者の青井らは 2008 年、繊維芽細胞のみならずマウス胃粘膜細胞からも iPS 細胞の樹立が可能であり、繊維芽細胞に比し上皮細胞由来の iPS 細胞は発癌性が低いことが判明してきた（Science 2008）。また、プラスミドを使用することにより安全に遺伝子導入が可能であることが明らかとされたが、遺伝子導入そのものによる危険性が無くなったわけではない。以上のことから、ヒト細胞において、より質の高い可能性が考えられる上皮細胞からの iPS 細胞樹立と上皮を使う優位性の解析、作成された iPS 細胞の機能解析と組織構築をした場合の iPS 細胞の挙動など、安全性の解析が急務な課題となってきた。

② 導入対象細胞の培養

我々は食道癌細胞株 4 5 株（Cancer1992）、膵癌細胞株 8 株（Cancer 1999）の樹立を行ってきた。しかしながら、背景因子が判明している本邦でのヒト正常上皮細胞の培養は困難であり、特に消化管上皮の培養はほとんど成功してこなかった。これに対して、以前から消化器外科手術の時に発生する切れ端組織を利用してヒト正常食道上皮の培養に取り組み継代可能なヒト食道上皮細胞株を樹立し（Oncogene 2003、Life Science 2004、Int J Cancer 2006）さらにはヒト胃上皮細胞の培養にも取り組んできた。また胆嚢上皮細胞や小腸および大腸上皮細胞の初代培養にも取り組んできた。

③ 組織構築のためのバイオプリンティング技術

近年、色々なバイオマテリアルを使用した組織構築の試みがなされているが、多種細胞による複雑な組織構築は困難であった。連携研究者である中村真人は多種細胞を細胞ごとに計画的に配列するバイオプリンティング技術を開発し（J Biomech Eng 2009）、ナノレベルでの組織構築に取り組んできた。現在まで毛細血管の構築に取り組み成功させてきており、腺組織である消化管の立体構築の取り組みを開始している。

2. 研究の目的

山中伸弥らにより開発された多能性幹細胞（以下 iPS 細胞）は再生医療において多大に期待されているが、通常用いられる線維芽細胞では発癌の危険性があり、乗り越えなければならない障害である。上記のごとく山中研

究室の青井らにより、上皮細胞からの iPS 作成にてマウスでは線維芽細胞に比し発癌性が低下することが判明し、ヒトにおいても上皮細胞からの iPS 細胞が喫緊の課題となってきた。我々は以前から正常消化管上皮の培養に取り組み、一部において培養法を確立しつつある。また組織構築の新しい方法としてバイオプリンターによる組織構築にも取り組んでおり、培養上皮細胞と iPS 細胞からの組織構築モデルを検討している。我々の施設および、京都大学で倫理委員会の承認が得られたことから、本研究では消化管上皮の培養技法の確立とそれを応用した多能性幹細胞 iPS 細胞の発癌性軽減化さらには組織構築に取り組むことを目的とした。

3. 研究の方法

① 消化器悪性腫瘍患者または良性疾患で手術が必要となった患者さんに対し、本研究への資料提供に関する文書による同意を取得する。

② 悪性腫瘍の場合は腫瘍切除術を行い、検体（腫瘍組織、正常組織）を採取し、細胞培養を行うとともに、組織の一部を凍結保存する。良性疾患の場合は必要な手技（患者さんの疾患を治すのに必要な手技）を行い、組織を一部切除しなければならなかった場合に組織を採取し培養および一部を凍結保存する。

③ 検体は個人情報管理者により連結可能匿名化する。腫瘍組織および正常組織は病理検査にて組織を確認診断する。

④ 患者さんの臨床病理学的所見を記録する。

⑤ 切除検体を富山大学にて培養し、培養可能となった正常細胞より京都大学再生医科学研究所青井貴之にて山中 4 因子にて iPS 細胞を作成する。

⑥ 作成された iPS 細胞に対する遺伝子解析では、④ヒト iPS 細胞作成に関係する幹細胞関連遺伝子（oct4/3, Sox2, klf4, Nanog, lin28, Stat3, ERas, beta Catenin, Ecat1, Ecat8, Gdf3, Sox15, Dppa2, Dppa3, Dppa4, Dppa5, Fthl17, Sal14, Rex1, Utf1, Tc11, Fbxo15, Dnmt31, Grb2, その他）、⑤ iPS 細胞確認のための遺伝子発現⑥発癌危険性の解析のための癌関連遺伝子などを主たる解析対象とする。

⑦ 生物学的癌化危険性の解析では、in vitro での分化誘導に対する抵抗性および、in vitro で分化させた細胞の免疫不全マウスでの腫瘍発生の有無の確認を行う

⑧ iPS 細胞の元細胞の遺伝子的背景の解析のために正常部の遺伝子解析を行い、iPS 細胞からの発癌危険性について特定の遺伝子が発癌に関与しているのかどうかを解明するために腫瘍組織の遺伝子解析を施行する。

⑨ 尚、ヒト iPS 細胞を使ったキメラマウス作製実験およびヒト iPS 細胞から生殖細胞への

分化誘導実験は行わない。また、ヒト iPS 細胞の樹立に成功した場合にも、それに由来する細胞を患者に移植することは、本申請の範囲では想定していない。

⑩作成された iPS 細胞を分化誘導し、各段階の細胞による層構造を作成し、立体構造における細胞の挙動を観察するとともに、遺伝子発現変化を解析する。中村らは多重細胞層の構築と増殖因子の濃度勾配が可能な組織構築に成功しており、分化誘導剤の濃度勾配での組織構築も試みる。

4. 研究成果

① ヒト正常消化管上皮の培養では 34 症例に対して食道上皮の培養に取り組み継代可能なヒト食道上皮細胞株を 6 株樹立し、貴重な上皮細胞である Barrett 上皮細胞も現在樹立に向けて培養中である。またヒト胃上皮細胞の培養では 59 症例中 35 例で初代培養は可能であったが、継代可能株の作製は困難であり、培養条件の見直しを行っている。胆嚢上皮細胞では 17 例中 14 症例で初代培養に成功して 1 例で継代可能細胞株が作成可能であった。その他、小腸上皮および大腸上皮の培養ではそれぞれ 1 症例で初代培養が可能であったが、数日でアポトーシスに陥りそれ以上の増殖は得られなかった。現在まで消化管上皮培養ではコラーゲンおよびマトリゲルを基質に使用しているが、正常上皮細胞の継代培養は食道上皮以外は成功しておらず、培養基質の改良が不可欠であると考え、数種類の基質を試用したがまだ絞り込めていない。また培養液は種々の無血清培地を試用したが、ケラチノサイト SFM 以外に適したものがまだ見つかっていない為、今後も改良に取り組む予定である。これらの正常上皮細胞は凍結保存を行った。

②京大にて食道上皮 TYE-1 より iPS 細胞を 1 株作製したが、感染のために廃棄した。その後、食道上皮 TYE-2 および胃上皮からの iPS 細胞樹立を試みたがまだ成功していない。現在、食道上皮 TYE-3 よりの iPS 細胞樹立の準備中である。

③また iPS 関連因子である山中 4 因子と Nanog の各種癌における関与を検討し、これらの因子の破綻が癌細胞の悪性化に繋がることを明らかとした。

④組織構築についてはバイオプリンターによる数層の細胞の立体構築が可能となりつつあるが、正常上皮細胞は単細胞となると増殖が極端に低下することから、細胞集塊による多層の組織構築を試みているが、まだ成功していない。

⑤組織構築のために各種消化管の間質細胞（主に線維芽細胞）の作成では食道線維芽細胞株 2 株、胃線維芽細胞株 2 株、胆嚢線維芽細胞 1 株、胆道線維芽細胞 1 株、平滑筋腫 2

株 (TYLEIO-2, TYLEIO-3) の樹立に成功した。今後の組織構築に応用予定である。

⑥検討が行えていない事項がまだ多く残っており、正常細胞の組織構築の難しさを痛感された。しかしながら、研究目的である iPS 細胞癌化軽減の解析は重要な事項であり、今後も地道に研究を継続する予定である。

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 1 件)

Nagata T, Shimada Y, Sekine S, Osawa S, Hori R, Matsui K, Okumura T, Fukuoka J, Tsukada K. Prognostic significance of NANOG and KLF4 in breast carcinoma patients. *Breast Cancer* 2012, DOI 10.1007/s12282-012-0357-y

(査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

嶋田 裕. 消化器病の生物学的特性解明のための細胞培養を中心とした基礎研究
第 24 回日本消化器病学会甲信越支部教育講演会 2010 年 10 月 23 日 甲府

Shimada Y, Okumura T, Nagata T., Osawa S., Sekine S., Moriyama M., Fukuoka J., Tsukada K. Analysis of iPS inductive gene expression by esophageal cancer tissue array. 12th world congress of the diseases of the esophagus. 2010.9.4 Kagoshima

嶋田 裕, 奥村知之, 大澤宗士, 関根慎一, 森山亮仁, 澤田成朗, 長田拓哉, 福岡順也, 塚田一博. 組織アレイによる消化器癌における iPS 誘導遺伝子の発現解析. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 23 日 大阪

Sekine S, Shimada Y, Okumura T, Osawa S, Moriyama M, Matsui K, Sawada S, Nagata T, Fukuoka J, Tsukada K Expression analysis of iPS inductive gene in gastrointestinal cancer by tissue microarray. AACR 102nd annual meeting 2011, 4, 2-6 Orland

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 裕 (Shimada Yutaka)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・准教授

研究者番号：30216072

(2) 研究分担者

塚田 一博 (Tsukada Kazuhiro)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・

教授

研究者番号：90171967

奥村 知之 (Okumura Tomoyuki)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・

助教

研究者番号：10533523

(3)連携研究者

青井 貴之 (Aoi Takayuki)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：00546997

佐藤 史顕 (Sato Fumiaki)

京都大学・大学院医学研究科・特定講師

研究者番号：20467426

中村 真人 (Nakamura Masato)

富山大学・大学院理工学研究部 (工学)・

教授

研究者番号：90301803