

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659751

研究課題名(和文) iPS細胞由来気管上皮の作製と分化機構の解明

研究課題名(英文) Study of the differentiation of respiratory epithelium 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、気管再建後の再生促進を意図し、iPS細胞から気管上皮細胞への分化誘導技術を開発することにある。マウスiPS細胞から分化誘導したところ、気管上皮様組織を構成する基底細胞、線毛細胞の再生を、HE染色と免疫組織学的に確認した。世界に先駆けて、iPS細胞による気管上皮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 to differentiate mouse induced pluripotent stem (iPS) cells to respiratory epithelial tissue and to regenerate tracheal tissue. The presence of respiratory epithelium-like tissue was observed after several days culture by hematoxylin eosin staining and immunohistochemistry. This is the first study to demonstrate the potential of iPS cells for regeneration of the respiratory epithelium.

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 再生医学 気管上皮

1. 研究開始当初の背景

気管上皮は気道の重要な構成要素であるが、iPS細胞の分化誘導で得られた上皮による気管再生に関しては世界的に報告がない。これまで気管欠損部に対して自家組織移植が行われてきたが、侵襲が大きく、機能・美容上の問題がある。多分化能を有するiPS細胞を用いて*in vitro*で質的、量的に気管上皮に近い形で分化誘導が可能となればこの問題を回避できる。

研究代表者らは、*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現在まで10名に臨床応用し良好な結果を得ている（Omori, et al. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008）。

2006年、山中らはマウス人工多能性幹細胞（iPS細胞）を樹立し、2007年にはヒトiPS細胞を樹立した。iPS細胞は、胚性幹細胞（ES細胞）によく似た未分化で多能性を有する細胞で、ES細胞の倫理的問題や拒絶反応の問題が克服されたといえる。既に研究代表者は京都大学iPS細胞研究所の承諾によりマウスiPS細胞の提供を受け、培養技術はすでに確立している状態である。

2. 研究の目的

本研究では、iPS細胞から気管上皮細胞を分化誘導する技術を確立する。さらにそれをスキヤフォールドとともに動物モデルの組織欠損部に移植し、気管上皮組織を再生する技術を確立し、内胚葉由来である気管上皮の分化機構を解明する。

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、上皮再生を行う上で最適な条件を探索する。

（3）分化誘導：気管上皮様細胞へ分化させるためiPS細胞から胚様体を形成させる。まず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96穴プレートに1穴あたり2000細胞になるように播種し、数日間培養し胚様体を形成させる。培地にはKSRを添加したノックアウトD-MEM（無血清培地）を用いる。形成させた胚様体をゼラチンコートした培養皿に移し、接着培養を行う。接着させた胚様体の培養を継続すると気管上皮様細胞が誘導される。また、アクチピンやb-FGFなどの増殖因子や分化誘導培地としてretinoic acidを含むSAGM（small air way growth medium）を使用しiPS細胞の上皮分化を促し、分化誘導方法の再現性を確認する。さらに、*in vitro*において線毛上皮を構成する基底細胞、線毛細胞の再生をHE染色と免疫組織学的に確認する。

（4）気管上皮欠損部への移植による評価：移植に先立って*in vitro*で行った方法で作成した胚様体を包埋させた人工材料をラット気管欠損モデルに移植する方法を検討する。人工材料をコラーゲンゲルでコーティングし、コラーゲンゲル内に胚様体を包埋させる。次に移植の手術手技を検討する。全身麻酔下に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。以上の方法で気管欠損モデル動物を作製し移植実験を行う。

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。作製工程での条件を変え、上皮再生を行う上で最適な条件を探索した。

(3) 分化誘導：気管上皮様細胞へ分化させるため iPS 細胞から胚様体を形成させた。まず 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 96 穴プレートに 1 穴あたり 2000 細胞になるように播種し、数日間培養し胚様体を形成させた。培地には KSR を添加したノックアウト D-MEM(無血清培地)を用いた。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。接着させた胚様体の培養を継続すると気管上皮様細胞が誘導された。また、アクチビンや b-FGF などの増殖因子や分化誘導培地として retinoic acid を含有する SAGM(small air way growth medium)を使用し iPS 細胞の上皮分化を促し、分化誘導方法の再現性を確認した。さらに、*in vitro* において線毛上皮を構成する基底細胞、線毛細胞の再生を HE 染色と免疫組織学的に確認した。

(4) 気管上皮欠損部への移植による評価：移植に先立って *in vitro* で行った方法で作製した胚様体を包埋させた人工材料をラット気管欠損モデルに移植する方法を検討した。人工材料をコラーゲンゲルでコーティングし、コラーゲンゲル内に胚様体を包埋させた。次に移植の手術手技を検討した。全身麻酔下にラットの気管を露出させ、開窓し気管欠損とした。先に作製した移植材料を気管欠損部に固定し閉創した。以上の方法で気管

欠損モデル動物を作製し移植実験を行った。移植材料は気管欠損部に生着し、気管内腔の狭窄を認めなかった。

本研究では、iPS 細胞から誘導した気管上皮様細胞をスキャフォールドに導入して気管上皮組織を再生する点に特色がある。これにより広範囲な気管欠損部にも適応が可能となり、世界に先駆けた気管上皮再生技術の確立が予想される。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クリアできる点で大きな意義があり、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 2 件)

Koshi Otsuki, Koichi Omori, et al. Potential of respiratory epithelium regeneration from induced pluripotent stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 122(1):25-32, 2013.

Koshi Otsuki, Koichi Omori, et al. Effective Embryoid Body Formation From Induced Pluripotent Stem Cells for Regeneration of Respiratory Epithelium. *Laryngoscope* 124:E8-E14, 2014.

[学会発表](計 6 件)

Koshi Otsuki, Koichi Omori, et al. Potential of induced pluripotent stem cells for regeneration of respiratory epithelium: Preliminary study. 14th The Japan-Korea Joint Meeting of Otorhino-laryngology-Head and Neck Surgery.平成 24 年 4 月 12 日~4 月 14 日, Kyoto, JAPAN

Koshi Otsuki, Koichi Omori, et al. Regeneration of induced pluripotent stem cells for regeneration of

respiratory epithelium. 92th The American Broncho-Esophagological Association, 平成 24 年 4 月 18 日 ~ 4 月 19 日, San Diego, CA, USA

Koshi Otsuki, Koichi Omori, et al. Effective Embryoid Body Formation From Induced Pluripotent Stem Cells for Regeneration of Respiratory Epithelium. 134th The American Laryngological Association, 平成 25 年 4 月 10 日 ~ 4 月 11 日, Orlando, FL, USA

Koichi Omori. Regenerative Medicine of the Larynx and Trachea. International Federation of Oto-rhinolaryngological Societies (IFOS) 2013, 平成 25 年 6 月 1 日 ~ 6 月 5 日, Seoul, Korea

大槻好史, 大森孝一, 他. iPS 細胞を利用した気管上皮組織再生. 第 65 回日本気管食道科学会総会, 平成 25 年 10 月 31 日 ~ 11 月 01 日, 東京

大槻好史, 大森孝一, 他. iPS 細胞を用いた気管上皮組織再生の可能性. 第 13 回日本再生医療学会総会, 平成 26 年 3 月 4 日 ~ 3 月 6 日, 京都

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 TATSUO)
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