

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293291

研究課題名(和文) iPS腸管作製技術を応用した難治性腸疾患に対する新たな腸管再生・移植医療への挑戦

研究課題名(英文) Challenge of iPS-induced gut (iGut) regeneration and transplantation as a novel treatment strategy against inflammatory bowel diseases

研究代表者

中島 祥介 (Nakajima, Yoshiyuki)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00142381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスiPS細胞から腸管(iGut)を分化誘導した実績をもとに、ヒトiGutの誘導に必要な培養環境の改良に取り組んだ。細胞分散に耐える細胞死抑制因子と、non-feeder培養法により、ヒトiPS細胞を大量に維持培養することが可能となった。また、新たな三次元培養により、胚葉体を安定して作製することができた。一定の温度・湿度・CO2管理下に経時観察し、培養効率が著明に改善することを確認した。異種のiPS細胞/iGutの培養環境の特異性を明らかにした本研究成果は、ヒトiGutの臨床応用実現に向けて大変有意義であり、国内外に広く発表していくとともに、本研究をさらに継続・展開していきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We succeeded organ regeneration of iGut from mouse iPS cells and challenged the improvement of environment of culture to induce human iGut from human iPS cells. Firstly, we introduced apoptosis inhibitory factor and non-feeder culture system to maintain a large amount of human iPS cells. Secondly, we succeeded to induce efficiently stable embryoid bodies by using a novel three-dimensional culture system. These findings have proved the specific environment of culture characteristic to different species of iPS cell/iGut, and proposed significant way to the clinical application. We will present widely our powerful results and develop our works as a novel treatment strategy against inflammatory bowel diseases in the future.

研究分野：消化器外科

キーワード：iPS細胞 再生医療 移植医療 難治性腸疾患 臓器再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 臓器移植医療において、ドナーの不足は深刻な問題であり、新たな移植法が熱望されている。再生医療において細胞供給源として様々な幹細胞を用いて特異的な細胞に分化誘導する研究が多数試みられている。

これまで我々は胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞による臓器分化誘導に関する研究を行ってきた。ES 細胞を含む培養液を dish の蓋に吊り下げて行う懸垂培養 hanging drop culture によって、ES 細胞は重力の影響で滴状培養液の先端に凝集し胚様体を形成する。この胚様体を用いて付着培養したところ、微絨毛を有する腸管粘膜細胞、平滑筋、腸管運動の pacemaker cell (Cajal 間質細胞)、腸管神経細胞など腸管に特異的な三胚葉系の全ての細胞で構成される「管腔状構造の蠕動運動する機能的な腸管」の臓器分化誘導に世界で初めて成功した (Stem Cells, 2002)。また、近年、皮膚線維芽細胞に初期化に関与する転写因子を遺伝子導入することにより多分化能を有する iPS 細胞が開発されている (Cell, 2007)。一方、我々は前述の ES 細胞の腸管への臓器分化誘導法を用いて、iPS 細胞から腸管特異的な細胞で構成される機能的な iPS 腸管 (iGut) を臓器として分化誘導することに世界で初めて成功した (Biochem Biophys Res Commun, 2010)。この iPS 腸管に関する研究成果は NHK サイエンス・ゼロでも取り上げられ 2010 年に注目された科学ニュースの第 4 位に選ばれ、我々の iGut 臓器再生研究に対する関心の高さと今後の研究の発展に対する期待が高い。

(2) さらに、当教室では、1979 年から現在まで、厚生労働省の「難治性炎症性腸疾患障害に関する研究調査」などをはじめ多くの研究を行ってきた。この 30 数年間で炎症性腸疾患の診断や治療においては大きく進歩したものの発症機序は未だ不明で、原因究明とそれに基づく新たな治療法の開発が熱望さ

れる。我々の iPS 腸管 (iGut) の作製技術は、現状では有効な治療法がない原因不明の難病である、腸管粘膜の強い炎症を伴う炎症性腸疾患 (クローン病、潰瘍性大腸炎) だけでなく、腸管神経節の欠損と運動機能低下から巨大結腸症をきたす Hirschsprung 病などの先天性腸疾患においても、疾患特異的あるいは患者特異的 iPS 細胞を用いることで、疾患発症の機序解明や治療法としての新薬開発に大いに役立つものと期待できる。さらに、患者自身の細胞を用いて腸管神経を作製し移植できれば、Hirschsprung 病に対する新たな治療法として期待できるとともに、ドナー不足の問題もなく、免疫抑制剤による副作用や拒絶反応の心配がない安全な再生・移植医療につながることを期待される。しかしながら、移植および疾患モデルとして用いるには、安全で効率のよい作製法が望まれ、現在のところ iPS 腸管の分化誘導効率は十分とはいえない。

2. 研究の目的

そこで、iPS 腸管の構成細胞の中でもとくに粘膜や神経の分化誘導効率を高めるために、微小重力環境の臓器分化誘導に及ぼす影響に着目し、iGut を微小重力模擬装置を用いて、中胚葉系への分化を抑制し、相対的に内胚葉系 (腸管粘膜) および外胚葉系 (腸管神経) へ選択的に分化誘導し移植するという難治性腸疾患に対する全く新しい臓器再生・移植医療を実現するために本研究を計画した。

3. 研究の方法

マウス iPS 細胞から蠕動運動する iPS 腸管 (iGut) を臓器分化誘導した実績をもとに、本研究ではヒト iGut を作製することが最終目的であることから、マウス iGut で実績のある三次元培養システムである懸垂培養 hanging drop culture を用いて、ヒト iPS 細胞を様々な培養環境下で培養し、ヒト iGut の分化誘導能を評価した。

4. 研究成果

(1) マウス iPS 細胞を三次元培養システムである懸垂培養 hanging drop culture を用いて培養したところ、腸管に特異的な三胚葉系の全ての細胞で構成される「管腔状構造の蠕動運動する機能的な腸管」iPS 腸管 (iGut) を高効率に再現することができた。一方、マウス iGut を誘導した従来法をヒト iPS 細胞に応用すると、拍動する心筋組織 (iHeart) や形態的な腸管様構造を分化誘導することはできたものの、蠕動運動能を有する機能的な腸管に分化誘導することはできなかった。また、ヒト iGut の分化誘導効率はマウス iGut に比べて、著明に低いことがわかった。本研究の目的は、ヒト iGut から腸管粘膜と腸管神経を分化誘導することであるが、腸管神経の分化誘導能の評価として、蠕動運動能が大変重要である。このことから、蠕動運動する機能的なヒト iGut を高効率に分化誘導するために、ヒト iPS 細胞の維持培養およびヒト iGut の分化誘導に必要な胚葉体の培養条件・環境の改良を行った。

(2) まず、マウス iPS 細胞は single cell にしてから懸垂培養 hanging drop culture にて胚葉体を作製するという方法を確立していたが、ヒト iPS 細胞では single cell にすると多くの細胞が死滅してしまうため、cluster の状態で懸垂培養を行うため、安定した胚葉体の形成が困難であった。そこで、ヒト iPS 細胞を single cell で維持培養するため、細胞分散に耐える細胞死抑制因子を添加したところ、ヒト iPS 細胞を single cell の状態を経たとしても大量に維持培養することが可能となった。さらに、細胞死抑制因子を用いることにより、feeder cell である線維芽細胞と共培養しなくても未分化能が維持されるため、線維芽細胞の contamination (混入) を防ぐことが可能になった。この non-feeder 培養法の導入により、純化したヒト iPS 細胞を大量に維持培養することが可能となった。

(3) さらに、懸垂培養 hanging drop culture にかわる新たな三次元培養法の導入により、ヒト iPS 細胞由来の胚葉体を安定して大量に作製することができた。

(4) 顕微鏡培養システムを用いて、一定の温度・湿度・CO₂ 管理下に経時的に観察したところ、培養効率が著明に改善することを確認することができた。

(5) 本研究では、微小重力模擬装置を用いた検討までは至らなかったものの、本研究成果は、マウスとヒトの iPS 細胞では、維持培養において培養条件が異なり、iGut の分化誘導においても、高効率に分化誘導する条件や期間は種によって異なることを示すことができた。iPS 細胞を用いて、in vitro で臓器分化誘導を行い移植用臓器を作製するという新しい臓器再生移植医療を目指して、異種 iPS 細胞の維持培養および iGut の培養環境の特異性を明らかにした本研究成果は、臨床応用にとって大変有意義であるため、国内外に発表していくとともに、本研究をさらに継続・展開していきたいと考えている。

< 引用文献 >

Yamada T, Yoshikawa M, Takaki M, et al. In vitro functional gut-like organ formation from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 20, 2002, 41-49

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131, 2007, 861-872.

Ueda T, Yamada T, Hokuto D, et al. Generation of functional gut-like organ from mouse induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 391, 2010, 38-42.

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5件)

山田高嗣、植田剛、中島祥介、iPS細胞と腸疾患 臓器としての腸管の再生 G.I. Research、査読無、Vol. 24, No. 2、2016、pp.48-55

山田高嗣、中島祥介、iPS細胞技術による消化管臓器の作製、G.I. Research、査読無、Vol. 22、No. 2、2014、pp.73-80

山田高嗣、中島祥介、iPS細胞による消化管再生医療、G.I. Research、査読無、Vol. 22、No. 5、2014、pp.35-41

山田高嗣、中島祥介、消化管領域におけるiPS細胞の応用、Annual Review 消化器、査読無、2013、22巻、2014、pp.7-1

山田高嗣、植田剛、中島祥介、腸管再生医療 iPS細胞から腸管の臓器再生 G.I. Research、査読無、Vol. 21, No. 2、2013、pp.70-74

〔学会発表〕(計5件)

山田高嗣、植田剛、中本貴透、Gordon Weir、中島祥介、iPS細胞/リプログラミング技術を応用した臓器再生医療 - 新しい外科学の創造 - 【シンポジウム】新しい外科学の価値の創造 - 再生医療、第116回日本外科学会定期学術集会 2016年4月15日 大阪国際会議場 (大阪)

Yamada T、Ueda T、Nakamoto T、Zhou Q、Gordon Weir、Nakajima Y、Organ regenerative medicine of "iGut" from iPS cells and "new islets" using reprogramming technology. 【selected speaker】Center for iPS Cell Research and Application (CiRA) /International Society for Stem Cell Research (ISSCR) International Symposium 2016. March 24th, 2016. Kyoto University Clock Tower Centennial Hall (Kyoto).

Yamada T、Ueda T、Nakamoto T、Nakajima Y、Organ regeneration of functional gut (iGut) from mouse iPS cells. The 12th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR). June 19th, 2014. Vancouver, BC (Canada).

中島祥介、iPS細胞からの臓器分化誘導、第10回日本消化管学会総会学術集会、2014年2月14日 福島ビューホテル (福島)

中島祥介、植田剛、山田高嗣、iPS細胞からのiGutの作製、第100回日本消化器病学会総会、2014年4月23日 東京国際フォーラム (東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 祥介 (NAKAJIMA, Yoshiyuki)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：00142381

(2) 研究分担者

山田 高嗣 (YAMADA, Takatsugu)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：20316061

植田 剛 (UEDA, Takeshi)

奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：40526810

(3) 研究協力者

中本 貴透 (NAKAMOTO, Takayuki)