

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462782

研究課題名(和文)再生医療による人工腸管の開発 - iPS細胞を用いた人工腸管作成のための基礎研究

研究課題名(英文)Initial research for tissue engineering intestine using iPS cells

研究代表者

吉田 篤史 (Yoshida, Atsushi)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10363219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：人工腸管を目指し、その基礎研究としてマウスiPS細胞を用いて腸管様構造物の誘導を行った。本研究では細胞培養液の成分に着目し、その配合・構成について検討した。現時点での結果は、1)ウシ胎仔血清に代わる代替血清の使用には併用する成長因子が重要で、腸管分化に効率的なウシ胎仔血清に含まれる因子の詳細な検討が必要である。2)過去の腸管分化に有効とされた成長因子7つを付加投与したが、腸管様構造物の誘導に有効ではなかった。腸管様構造物の再現性は極めて低く、有効な液体成分を評価するだけの十分な結果が得られなかったが、今後も細胞培養条件の詳細な検討が、将来腸管分化誘導のブレークスルーにつながると確信している。

研究成果の概要(英文)：As an initial research toward making artificial gut, we have induced a gut like structure using tissue engineering technique in vitro. Thanks to this fund, we could brush up the induction technique, but the regeneration efficiency of the gut like structure is still low in spite of an innovation of additional culture medium and growth factors. It may be possible to extend the application of this technique to the gut like structure over clinical intestinal incompetence in the future.

研究分野：腸管の再生医療

キーワード：再生医療 腸管分化誘導 iPS細胞 胚様体 人工腸管

1. 研究開始当初の背景

先天性疾患、クローン病、外傷などで多量に腸を失うと短腸症候群となり、消化吸収不良となってしまうため、経口摂取だけでは不十分である。この治療はこれまで対症療法的に経静脈栄養が主に行われているおり、長期的治療の結果としてカテーテル感染あるいは肝障害を生じ、多くの症例が死亡してしまう。現在唯一の根本的治療法としては小腸移植が行われているが、小腸が免疫拒絶の強い臓器であるため、術後の短期的成績はよくなってきたが、依然長期的予後が改善されず、他の臓器と違い、未だに一般的な治療法とはなっていないことが問題である。

再生医療における消化管分野について目を向けてみると、腸管が三胚葉由来であることによる発生学的複雑さが原因で、臨床的に使用できる人工小腸（腸管）の再生は未だ世界で誰も成功していないことはもとより、臨床応用に繋ぐ前段階までも程遠い。しかし、まったく手が付けられてないわけではなく腸管粘膜の再生などに関しては徐々に進んできている。さらなる進歩としては、奈良県立医大外科の山田らグループが、2002年にES細胞（胚性幹細胞）を、2010年にはiPS細胞を用いることで、腸管様の構造物をin vitroで作ることに成功している。未分化な細胞からできたこの構造物は、腸管構造として必要な三胚葉成分である、腸管粘膜、平滑筋、神経を含んでおり、画期的なものである。しかし残念ながら、この構造物の作成方法に関して2002年から全く改善方法が提示されておらず、限られた条件のみでしか起こらないようなもので、しかも再生効率は極めて低いのが問題点である。臨床的に使用するまでには、それ以外にもこの構造物では脈管系

が存在しないことなど、克服すべきポイントがまだまだ多く存在する。

我々は2008年よりマウスiPS細胞を用いて腸管再生の研究を開始し、前段階として腸管蠕動をする平滑筋シートの作成を約50%の確率で成功した。このとき、細胞の培養方法は、旧方法のハンギングドロップ法ではなく、低接着96ウェルプレートを使用することで、有効な細胞数、培養期間について検討してきた。腸管の再生医療は極めて立ち後れ、基礎的研究の域を脱していないが、万能性のあるiPS細胞の導入により人工腸管を作成できる環境が整いつつある。

2. 研究の目的

今回の研究課題は、山田らの作成した腸管様構造物で、その作成条件の中から、最重要と推察される培養培養の液体成分について着目した。分化誘導の各過程での液体成分の配合・構成を明らかにすることで腸管様構造物の量産化、臨床化への道筋を作成したい。

胚様体形成時、あるいはその後も含めて、各分化誘導過程に成長因子を添加し、成長因子の有効な濃度、タイミングなどを比較することで、分化誘導の至適条件を一つずつ検討していく。結果、腸管様構造物が量産化できれば、人工腸管作成への糸口となりうる。

3. 研究の方法

本研究は大きく主に4つのステップで構成されている。(1)未分化で分化多能性を保った良好なiPS細胞の単離、(2)分化の初段階である腸管分化に有効な胚様体の量産、(3)腸管分化に効率のよい細胞培養条件の探索として、各過程での液体成分の配合・構成に着目し、代替血清有効性、これまでに有効性が報告さ

れたことのある、Activin A, bFGF, DMSO, BDNF など成長因子の至適濃度の検討、(4)完成した腸管様構造物の客観的評価から構成されている。

4. 研究成果

腸管の再生医療分野は極めて立ち遅れており、この報告時点でも人工腸管の作成は未だ世界で誰も成功していない。本研究では万能細胞である iPS 細胞を用いて臨床応用が可能な人工腸管の作成を目指し、まず基礎研究として、過去に報告された腸管様構造物の再生効率上昇を目指した。この3年間は、具体的には細胞培養条件の中から最も重要である細胞培養の液体成分に着目し、各分化誘導過程での液体成分の配合・構成を明らかにすることで効率的な作製方法の確立をめざした。

結果として、最初の2つのステップは順調であった。未分化で分化多能性を保った良好な iPS 細胞の単離作業は順調で、過去の方法ではマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) 上で維持するのが一般的であったが、未分化で均一な iPS 細胞の細胞だけの集団を作る必要があり [(2',3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime] を用いることで、フィーダーフリーの環境で、純度の高い未分化な iPS 細胞の単離が効率的にできるようになった。

胚様体の量産方法としては、最初に企画した低接着性 96 ウェルプレートを用いた方法からさらに進化させ、マイクロアレイプレートを導入することで、過去に行われていた懸垂培養のおよそ 10 倍以上の胚様体を一度に作成できるようになった。しかし、それ以降は思い通りの結果が得られなかった。腸管分化に効率のよい細胞培養条件の探索として、(1)ウシ胎仔血清(FBS)に代わり、成分が明確な代替血清への変更を試みたが、FBS を使用群の方が明らかに胚様体作成時の細胞活

性は高く、代替血清だけでは細胞増殖がほとんどなかった。代替血清に成長因子を添加することで、選択的に腸管分化に有効な条件の発見が得られる可能性はあったが、試みた成長因子のなかには明らかに有効なものはなかった。

検索中わかったことは、ウシ胎仔血清ではロット差、非働化により胚様体形成に差が生じたため、腸管分化誘導に有効なウシ胎仔血清の選別が大変重要であった。今後の課題とはなるが、ウシ胎仔血清の構成成分の中から、含まれる成長因子をロット毎で詳細な検討すれば分化誘導に関して一定の法則が導かれ、将来至適条件の発見につながる可能性が期待できる。

つぎに、(2)過去に腸管分化の有効性が報告された成長因子7つを、胚様体作成時に付加投与した結果であるが、これも腸管分化に優位に有効な因子の同定はできなかった。我々は今回、条件の簡略化につとめることでプロトコルの再現性を保ちたいと考えた。その方法として、成長因子は一連の過程に1~2つの成長因子のみ使用することで、その成長因子の有効性が明らかになると仮定したが、単一の成長因子のみでの投与では、結果有効なものが見つからなかった。よって、培養過程の途中で、成長因子の追加あるいは変更が必要かもしれない。

腸管様構造物の再生効率は極めて不良だったため、分化誘導過程すべてを検討し、様々な条件下での腸管様構造物の作成を試みた。しかし、その再現性は依然極めて低いため、根本的には有効な液体成分を評価するだけの十分な量的な結果が得られなかった。

その改善策を発見するために、初期分化誘導過程である胚様体において、その培養期間による胚様体内の遺伝子発現に一定の規則性がないかを発見するべく、追加研究を行った。これは、胚様体形成時の内部微小環境において、経時的変化が生じることが示唆され、

仮に分化・増殖因子の発現量の変化がその時期によって明らかにすることができれば、腸管再生に有効な胚様体の培養期間に対する条件を得る可能性があり、そのことで今後の本研究の発展のため有効であると考えたからである。その結果は、現時点では胚様体培養期間のうち0～9日間において特徴的に増減する胚葉成分はリアルタイムPCRで評価したが見つけることはできなかった。

本研究は全く立ち後れた分野での基礎研究であり、この3年間で明らかに有効な進歩といえる結果を得ることができなかった。しかし、iPS細胞はあらゆる細胞に分化する能力がある優れた資源であることは疑いの余地はないことから、三胚葉由来である腸管を各分化誘導がうまく融合して起こる可能性が高く、iPS細胞を用いた腸管再生研究は人工腸管を分化誘導することのブレークスルーにつながる人が多いに期待できる。そのためには、今後も腸管様構造物作成のための細胞培養条件の詳細な検討の継続が重要である。

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)

Yoshida A, Chitcholtan K, Evans JJ, Uemura S, and Beasley SW, Provision of Optimal Conditions for In vitro Differentiation into Peristaltic Smooth Muscle from a Murine Induced Pluripotent Stem Cell Line, 査読有, JSM Regen Med, 2014, 2(1):1011, <http://www.jscimedcentral.com/Regenerative/vol2issue1.php>

[学会発表](計 3 件)

- 1) 吉田篤史、植村貞繁、山本真弓、久山寿子、胚様体培養期間による3胚葉成分の違い、第46回日本小児消化管機能研究会、2016年2月13日、倉敷芸文館(岡山・倉敷市)
- 2) 吉田篤史、植村貞繁、山本真弓、久山寿子、iPS細胞を用いた腸管分化の問題点、第45回日本小児消化管機能研究会、2015年2月14日、大宮ソニックシティ(埼玉・さいたま市)
- 3) 吉田篤史、植村貞繁、山本真弓、久山寿子、マウスiPS細胞から腸管への分化誘導、第51回日本小児外科学会学術集会、2014年5月8～10日、大阪国際会議場(大阪・大阪市)

[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

吉田 篤史

(Atsushi Yoshida)

(川崎医科大学・医学部・准教授)

研究者番号：10363219

(2) 研究分担者

植村 貞繁

(Sadashige Uemura)

(川崎医科大学・医学部・教授)

研究者番号：40160220

久山寿子

(Hisako Kuyama)

(川崎医科大学・医学部・講師)

研究者番号：90548645

(3)連携研究者

刀祢 重信

(Shigenobu Tone)

(川崎医科大学・医学部・准教授)

研究者番号：70211399