

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861576

研究課題名(和文) マウスiPS細胞由来胚様体を用いた気管上皮再生

研究課題名(英文) Effective Embryoid Body Formation From Mouse Induced Pluripotent Stem Cells for Regeneration of Respiratory Epithelium

研究代表者

大槻 好史(Otsuki, Koshi)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80633776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、気管欠損部における気管再建後の上皮組織再生促進を意図し、多能性幹細胞(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。特に気管上皮細胞への分化に適した胚様体形成の条件について組織学的に評価し明らかにした。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 to respiratory epithelial tissue from induced pluripotent stem(iPS) cells, and to induce to reproduce tracheal tissue. Especially, current study determined the most effective conditions for embryoid body (EB) formation from iPS cells for regeneration of respiratory epithelium. This is the first study to demonstrate the potential of iPS cells for the regeneration of the respiratory epithelium.

研究分野：医師薬学

キーワード：iPS細胞 気管上皮 胚様体 再生

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞の分化誘導で得られた気管上皮による気管再生に関しては世界的に報告がないのが現状である。これまで広範囲な気管欠損部に対しては、自家組織移植が行われてきたが、侵襲が大きい上、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。

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。これらの点において、iPS 細胞は、細胞移植を想定した場合、理想的な cell source である。

我々の研究グループは、体内で組織再生を誘導する *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（スキャフォールド）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 8 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）。

また、iPS 細胞から分化誘導した軟骨細胞を含むスキャフォールドを気管欠損実験動物モデルに移植し、低率ではあるが気管軟骨様組織の作製に成功している（Imaizumi, et al. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2010）。

2. 研究の目的

本研究では、気管を構成する組織、特に気管上皮細胞を iPS 細胞より分化誘導する技術を確立する。マウス線維芽細胞由来 iPS 細胞から胚様体を作成し、気管上皮細胞へ

の分化誘導機構を解明し、効率良く気管上皮細胞を誘導する方法を明らかにする。

3. 研究の方法

iPS 細胞の培養

フィーダー細胞の確保：

leukaemic inhibitory factor を発現したマウス胎児線維芽細胞（SNL 76/7）に puromycin 耐性遺伝子を導入し充分量のストックを確保する。

iPS 細胞の確保：

mitomycin 処理により増殖能を喪失させた上記フィーダー細胞をゼラチンコーティングされたディッシュ上に播種し培養する。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に播種し培養する。継代培養を行い充分量の iPS 細胞を確保する。

iPS 細胞の純化：フィーダー細胞上で iPS 細胞がコロニーを形成したことを確認した後、トリプシン処理により細胞を剥離し、さらに剥離した細胞を別の培養皿で 37℃、25 分間培養することで iPS 細胞を純化する。

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。作成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ていく。

気管上皮様細胞の誘導

胚様体の作製：

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 96well プレート

(PrimeSurface96UorV) に播種する。この際、播種する細胞数を変え、分化指向性を検証する。播種する細胞数を 250、500、1000、2000/well とし、浮遊培養する。また、浮遊培養する日数を変え、分化指向性を検証する。浮遊培養する日数を 3,5,7,9 日と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。

胚様体からの分化誘導：ゼラチンコーティングされた 12well plate に胚様体を播種し、接着培養を行う。胚様体の接着培養を継続すると気管上皮様細胞が誘導される。また、アクチビンや b-FGF などの増殖因子を使用し iPS 細胞の上皮分化を促してみる。その際、増殖因子の濃度や増殖因子による誘導日数を変え、分化指向性を検証する。さらに接着培養に使用するゼラチンの種類や、培養環境も変化させ (Air-Liquid Interface) 検証してみる。増殖因子は 4 条件で行う。1) 無血清培地のみ、2)activin A のみ添加した無血清培地、および 3)bFGF (塩基性線維芽細胞成長因子) のみを添加した無血清培地 4)activin A 及び bFGF を添加した無血清培地のそれぞれにおいて線毛上皮への分化誘導にどう影響するかを検証する。

評価：胚様体の気管上皮組織の組織像、蛋白質や遺伝子の発現に関して評価を行う。凍結切片及びパラフィン切片の双方を作製し、必要に応じ各種染色 (免疫染色を含む) を行う。通常の光学顕微鏡のほか、蛍光顕微鏡を用いて各細胞モデルについて気管の再生部位の経時的組織学的変化を観察・評価する。観察項目としては、上皮形成の有無、形態 (線毛構造など) 周囲組織との適合性の確認 (H-E 染色) 上皮細胞の形質 (線

毛特異的タンパク： α -tubulin、Foxj1、上皮特異的タンパク：サイトケラチン AE1/3) などとする。

気管上皮組織含有スキャフォールドの開発：医療用ポリプロピレン製メッシュの内側及び外側にブタ由来アテロコラーゲンを真空凍結乾燥法により付加しコラーゲンスポンジの層を形成させる。誘導した気管上皮組織をコラーゲンゲルに付加しコラーゲンスポンジ上に被覆する。胚様体はコラーゲンゲルに包埋させる。

移植技術の開発：全身麻酔下に免疫不全ラットの気管を露出させ、気管上皮部分欠損モデルを作製する。前頸部皮膚を縦切開し、前頸筋を白線で分けると気管壁に到達する。気管壁を露出し第 2・3 気管軟骨前部を切除し開窓する (開窓部は 4×2 mm とする)。スキャフォールドの細胞含面を気管内腔面となるように開窓部を覆う。スキャフォールドと気管壁は縫合せず、スキャフォールドの上面を前頸筋で被覆し固定する。さらに皮下組織・皮膚を縫合する。胚様体が包埋されたスキャフォールドを移植されたヌードラットが生存できるかを検証する。

4. 研究成果

iPS 細胞の維持培養が確立できた：フィーダー細胞を確保し leukaemic inhibitory factor を発現したマウス胎児線維芽細胞 (SNL 76/7) に puromycin 耐性遺伝子を導入し充分量のストックを確保した。継代培養を行い充分量の iPS 細胞を確保した。

足場材料の開発を開発した：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。

気管上皮様細胞の誘導

胚様体作製：

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、接着能と凝集能を分化能の指標と位置付けて評価した。非接着性 96 穴プレートに播種する細胞数を 250、500、1000、2000/well とし、浮遊培養する日数を 3,5,7,9 日として胚様体を評価した。1000/well の細胞数で 5 日間の浮遊培養を行った胚様体が接着能、凝集能ともに優れていた。

胚様体からの分化誘導：胚様体をゼラチンコーティングされた 12well plate 上でアクチビンや b-FGF などの増殖因子を添加した無血清培地で接着培養を行い、気管上皮組織への分化誘導を検討した。増殖因子は以下の 4 条件で行った。1)無血清培地のみ、2)activin A のみ添加した無血清培地、および 3)bFGF (塩基性線維芽細胞成長因子)のみを添加した無血清培地 4)activin A 及び bFGF を添加した無血清培地とした。組織学的に 4)activin A 及び bFGF を添加した無血清培地を用いた場合に線毛上皮様構造が確認することができた。その後の維持培養において気管上皮への分化誘導を促進させる目的で Air-Liquid Interface を用いて、維持培養を継続させた。維持培養は 14 日間継続し、胚様体を組織学的に評価した。

胚様体の組織学的評価：

胚様体中の気管上皮用組織の組織像、蛋白質や遺伝子の発現に関して評価を行った。凍結切片及びパラフィン切片の双方を作製し、必要に応じ各種染色(免疫染色を含む)を行った。光学顕微鏡のほか、蛍光顕微鏡を用いて気管の再生部位の経時的組織学的変化を観察・評価した。胚様体中に、H-

E 染色で気管上皮様構造の形成を確認できた。線毛様構造において蛍光免疫染色を行い、同部位に線毛特異的タンパクである α -tubulin、Foxj1、細胞部位に上皮特異的タンパク：サイトケラチン AE1/3 の蛋白発現を確認できた。これにより、iPS 細胞から気管上皮組織の分化誘導を確認することができた。

気管上皮組織含有スキャフォールドの開発：誘導した気管上皮組織を胚様体の状態でコラーゲンゲルに包埋しコラーゲンスポンジ上に被覆することでスキャフォールドを形成した。

移植技術の開発：全身麻酔下に免疫不全ラットの気管を露出させ、気管上皮部分欠損モデルを作製した。スキャフォールドの細胞含面を気管内腔面となるように開窓部を覆い、創部を縫合し閉鎖した。胚様体が包埋されたスキャフォールドを移植されたヌードラットは麻酔覚醒後も 2 週間生存していることが確認された。

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 124,2014
E8-E14

〔学会発表〕(計3件)

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

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

大槻 好史 (OTSUKI KOSHI)
福島県立医科大学・医学部・助手
研究者番号: 80633776

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし