

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293371

研究課題名(和文) マウスおよびヒト iPS 細胞を用いた頭頸部組織の再生技術開発

研究課題名(英文) Development of regenerative medicine for head and neck tissues using murine and human iPS cells

研究代表者

大森 孝一 (Omori, Koichi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10233272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000 円

研究成果の概要(和文)： マウス induced pluripotent stem (iPS) 細胞を用いて、気道上皮細胞および筋細胞へ分化誘導することに成功した。分化誘導した気道上皮細胞を人工気管とともに気管欠損部へ、筋細胞を反回神経損傷後の甲状披裂筋に移植し、生着を確認した。気道上皮細胞では線毛やタイトジャンクションの回復も確認できた。

ヒト iPS 細胞から気道上皮細胞への分化誘導に成功した。分化誘導された細胞は、アセチル化チューブリンで標識される線毛様構造を有し、さらにそれらは運動機能を有していることが確認された。

研究成果の概要(英文)： Successful differentiation into airway epithelial cells and skeletal muscle cells from murine induced pluripotent stem (iPS) cells were achieved. Differentiated cells were transplanted into tracheal defect or the thyroarytenoid muscle and their survival were confirmed. Further, the cilia and the tight junction were observed in the generated airway epithelial cells.

The airway epithelial cells were successfully generated from human iPS cells, and generated cells showed the ciliated structure with a motility function.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：iPS細胞 気道上皮細胞 筋細胞

1. 研究開始当初の背景

口腔、咽喉頭、気管などの頭頸部臓器は呼吸・嚥下・発声・構音といった生命維持や Quality of Life (QOL) の維持に必須の機能を担っている。悪性腫瘍や炎症性疾患の治療、外傷などではこれらの臓器の欠損を生じることがあり、整容面のみならず機能面での障害が生じ、患者の QOL は大きく損なわれる。

臓器欠損に対しては通常、複数臓器に複数回の外科的処置が行われ再建が試みられるが、これらの処置によっても難渋することも少なくない。また、たとえ形態的な再建が得られたとしても、機能的再建はなかなか得られない。

われわれはかねてより体内で臓器再生を図る *in situ* Tissue Engineering のコンセプトに基づき、頭頸部臓器の再生を目指して研究を重ねてきた。われわれが開発したポリプロピレンとコラーゲンからなる組織再生誘導型の足場材料は、気管や喉頭の再建に有用であることが臨床試験、非臨床試験で確認されている。これまでの研究から、線維芽細胞や脂肪組織由来幹細胞が上皮化促進に有用であることが明らかとなったが、より安全かつ確実な臓器再建方法確立のためには、この足場材料に適切な細胞を十分量付加することが必要となる。

2006 年、山中らはマウス人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cell: iPS 細胞) を樹立し、2007 年にはヒト iPS 細胞を樹立した。この iPS 細胞により ES 細胞における倫理的問題や拒絶反応の問題が克服され、再生医療における新たな細胞源なることが期待されている。

2. 研究の目的

本研究は、マウスおよびヒト iPS 細胞から頭頸部臓器を構成する気道上皮や筋肉などへの分化誘導技術を確立するとともに、分化誘導した細胞を足場材料とともに各々の組織欠損モデル動物に移植し、組織学評価および機能性評価を行うことにより、有効性と機能性を検証し、頭頸部領域における再生医療基盤技術を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

培養条件の検討および tdTomato 導入: マウス iPS 細胞をマウス胎児線維芽細胞上に播種、培養し、その未分化性の検証を行った。また、tdTomato をマウス iPS 細胞に導入し、足場材料とともに気管欠損部分に移植した。

移植足場材料の検討: 移植に最適な足場材料を検討するため、ポリプロピレンメッシュと様々な濃度のアテロコラーゲンで人工気管を作成した。

分化誘導方法の確立: 成長因子、サイト

カイン、ALI (Air-Liquid Interface) 培養を組み合わせることで、マウス iPS 細胞から気道上皮細胞や筋細胞への分化を試みた。

マウス iPS 細胞由来気道上皮細胞・筋細胞のヌードラットへの移植: 分化誘導した上皮細胞を人工気管とともに気管欠損部へ移植し、上皮再生への寄与につき評価した。また、分化誘導した筋細胞を反回神経損傷後の甲状腺破裂筋へ移植し、萎縮に対する効果を検討した。

ヒト iPS 細胞から気道上皮細胞への分化誘導: ヒト iPS 細胞から 2 次元培養で腹側前方前腸へ分化させ、その後 3 次元培養でスフェロイド形成を行い ALI 培養で気道上皮細胞への分化を試みた。

4. 研究成果

マウス iPS 細胞の未分化性が確認でき、また、tdTOMATO を導入することにより、気管移植部位への生着が確認できた。

0.5 もしくは 1% の濃度で作成した人工気管は多孔質であり、気道上皮再生に適した足場材料であると考えられた。

マウス iPS 細胞から杯様体を形成し、アクチピンと bFGF を添加した無血清培地で培養後、ALI 法にて培養を行い、協調運動する線毛を有した気道上皮細胞への分化に成功した。また、胚葉体をマトリゲルにてコーティングされたプレート上に播種し、horse serum を用いて筋細胞へ分化誘導し、RT-PCR で MyoD, Myogenin の、免疫染色で MHC の発現を確認した。マウス iPS 細胞由来上皮細胞の移植部位では分化誘導した細胞の生存、さらに線毛やタイトジャンクションの回復も確認でき、気道上皮再生に貢献することが明らかとなった。また、マウス iPS 細胞由来筋細胞を移植した甲状腺破裂筋ではその生着が確認された。

分化誘導された細胞はアセチル化チューブリンで標識される線毛様構造を有し、さらにそれらは運動機能を有していることが確認された。また、透過型電子顕微鏡を用いた観察にて、この線毛様構造は 9 組の 2 連微小管が 2 本の微小管を囲む 9+2 構造を有し、チューブリンを骨格とする線毛であることが確認された。

以上より、マウスおよびヒト iPS 細胞が頭頸部臓器再生における細胞源として有用である可能性が示唆された。

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 7 件)

1. Yoshie S, Ikeda M, Imaizumi M, Otsuki K, Nomoto Y, Wada I, Omori. Visualization of mouse induced pluripotent stem cells for evaluation of tracheal regeneration. 2015 Apr;135(4):395-401. doi: 10.3109/00016489.2014.990055.
 2. Yoshie S, Imaizumi M, Nakamura R, Otsuki K, Ikeda M, Nomoto Y, Wada I, Omori K. Generation of airway epithelial cells with native characteristics from mouse induced pluripotent stem cells. Cell Tissue Res. 2016 May;364(2):319-30. doi: 10.1007/s00441-015-2304-7.
 3. Nakaegawa Y, Nakamura R, Tada Y, Nomoto Y, Imaizumi M, Suzuki R, Nakamura T, Omori K. Effect of Structural Differences in Collagen Sponge Scaffolds on Tracheal Epithelium Regeneration. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2016 Feb;125(2):115-22. doi: 10.1177/0003489415599991.
 4. Ikeda M, Imaizumi M, Yoshie S, Otsuki K, Miyake M, Hazama A, Wada I, Omori K. Regeneration of tracheal epithelium using mouse induced pluripotent stem cells. Acta Otolaryngol. 2016;136(4):373-8. doi: 10.3109/00016489.2015.1121548.
 5. Dirja BT, Yoshie S, Ikeda M, Imaizumi M, Nakamura R, Otsuki K, Nomoto Y, Wada I, Hazama A, Omori K. Potential of laryngeal muscle regeneration using induced pluripotent stem cell-derived skeletal muscle cells. Acta Otolaryngol. 2016;136(4):391-6. doi: 10.3109/00016489.2015.1126351.
 6. Suzuki R, Nakamura R, Nakaegawa Y, Nomoto Y, Fujimoto I, Semura K, Hazama A, Omori K. Optimal bovine collagen concentration to achieve tracheal epithelial coverage of collagen sponges. Laryngoscope. 2016 Dec;126(12):E396-E403. doi: 10.1002/lary.25989.
 7. Nakamura R, Tani A, Yoshie S, Ikeda M, Wada I, Hazama A, Nomoto Y, Tada Y, Nakamura T, Omori K. Heparin cross-linked collagen sponge scaffolds improve functional regeneration of rat tracheal epithelium. J Tissue Eng Regen Med. 2017 Jan 19. doi: 10.1002/term.2204.
- 〔学会発表〕(計23件)
1. Omori K. Regenerative medicine of the tracheal and cricoid cartilage. 18th WCBIP/WCBE. Apr. 15, 2014. Kyoto.
 2. 大森孝一. 頸部気管・輪状軟骨の再生医療. 第12回熊本甲状腺疾患懇話会. 2014年8月8日. 熊本.
 3. Omori K, Otsuki K, Yoshie S, Imaizumi M, Nomoto Y, Nakamura T. Generation of ciliated epithelium derived from mouse induced pluripotent stem cells. The 61th CORLAS Meeting. Aug 24, 2014. Turkey.
 4. Omori K. Regenerative Medicine of the Trachea and Larynx. TERMIS-AP Meeting. Sep 26, 2014. Korea.
 5. 今泉光雅, 大槻好史, 池田雅一, 大森孝一. ヒト iPS 細胞を用いた声帯の組織再生. 第59回日本音声言語医学会. 2014年10月9日. 福岡.
 6. 今泉光雅, 大槻好史, 池田雅一, 大森孝一. iPS 細胞を用いた喉頭・気管の再生技術開発. 第66回日本気管食道科学会. 2014年11月13日. 高知.
 7. Ikeda M, Imaizumi M, Yoshie S, Otsuki K, Miyake M, Hazama A, Omori K. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cell for regeneration of tracheal epithelial cells. The 136th Annual Meeting of the American Laryngological Association. Apr 22-23, 2015. Boston.
 8. Imaizumi M, Otsuki K, Ikeda M, Yoshie S, Omori K. Technological development for the regeneration of trachea and

- larynx with induced pluripotent stem (iPS) cells. The 3rd Congress of European ORL-HNS. Jun 7-11, 2015. Prague.
9. 今泉光雅, 大槻好史, 池田雅一, 中村亮介, 大森孝一. iPS 細胞および生体適合性足場材料を用いた喉頭・気管の再生医学研究. 第 67 回日本気管食道科学会. 2015 年 11 月 19 ~ 20 日. 福島.
 10. Bayu Tirta Dirja, 吉江進, 池田雅一, 今泉光雅, 大槻好史, 中村亮介, 和田郁夫, 狭間章博, 大森孝一. Regeneration of laryngeal muscle using induced pluripotent stem cell derived skeletal muscle cells. 第 67 回日本気管食道科学会. 2015 年 11 月 19 ~ 20 日. 福島.
 11. 池田雅一, 今泉光雅, 吉江進, 大槻好史, 大森孝一. マウス iPS 細胞を用いた気管上皮組織の再生. 第 67 回日本気管食道科学会. 2015 年 11 月 19 ~ 20 日. 福島.
 12. 大槻好史, 今泉光雅, 野本幸男, 池田雅一, 吉江進, 三宅将生, 和田郁夫, 大森孝一. iPS 細胞を用いた気管上皮再生の可能性. 第 67 回日本気管食道科学会. 2015 年 11 月 19 ~ 20 日. 福島.
 13. 大森孝一. 喉頭・気管の機能再建外科-Functional Remodeling Surgery-. 第 30 回近畿耳鼻咽喉科手術手技研究会. 2016 年 2 月 6 日. 大阪.
 14. Imaizumi M, Classification system for animal vocal fold surgery: resection margins impact histological outcomes. The 10th East Asian Conference on Phonosurgery. Mar 4-5, 2016. Kumamoto.
 15. 中村亮介, 吉江進, 谷亜希子, 野本幸男, 多田靖宏, 大森孝一. ヘパリンを含有する気管再建材による FGF シグナリングの時空間的調節に関する研究. 第 15 回日本再生医療学会. 2016 年 3 月 17 ~ 19 日. 大阪.
 16. Yoshie S, Omori K, Miyake M, Kobayashi D, Hazama A. Generation of various ion channels-expressing functional airway epithelial cells from induced pluripotent stem (iPS) cells. 第 93 回日本生理学会大会. 2016 年 3 月 22 ~ 24 日. 札幌.
 17. Omori K. Tissue engineering in the head and neck. 90th Annual Congress of Korean Society of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. Apr. 22-24, 2016. Seoul.
 18. Omori K. The history and recent progress in synthetic materials for airway reconstruction. 19th World Congress of the International Bronchoesophagological Society. May 8-11, 2016. Florence.
 19. Suzuki R, Nakamura R, Nakaegawa Y, Nomoto Y, Tada Y, Fujimoto I, Semura K, Hazama A, Omori K. Optimal bovine collagen concentration to achieve tracheal epithelial coverage of collagen sponges. 137th American Laryngological Association. May 18-19, 2016. Chicago.
 20. Nakaegawa Y, Nakamura R, Tada Y, Suzuki R, Takezawa T, Nakamura T, Omori K. Effect of artificial tracheal fixation on tracheal epithelial regeneration. 137th American Laryngological Association. May 18-19, 2016. Chicago.
 21. Omori K. Stem Cell Therapy in ORL. STEM CELLS AND TRACHEAL REPAIR. Aug 29, 2016. Bordeaux.
 22. 岸本曜, 大森孝一. 喉頭・気管の上皮再生. 第 16 回日本再生医療学会. 2017 年 3 月 7-9 日. 仙台.
 23. 大西弘恵, 中村亮介, 奥山英晃, 竹澤俊明, 後藤慎平, 興相陽平, 小西聡史, 山下勝, 岸本曜, 楯谷一郎, 山本典生, 中川隆之, 大森孝一. ビトリゲル上でのヒト iPS 細胞からの気道上皮細胞分化誘導. 第 16 回日本再生医療学会. 2017 年 3 月 7-9 日. 仙台.
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
- 名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:
- 取得状況 (計 0 件)
- 名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:
- 〔その他〕
 ホームページ等
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 大森 孝一 (OMORI, Koichi)

京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科・教授
研究者番号：10233272

(2)研究分担者

今泉 光雅 (IMAZUMI, Mitsuyoshi)
福島県立医科大学 医学部 耳鼻咽喉科・講師
研究者番号：30554422

吉江 進 (YOSHIE, Susumu)
福島県立医科大学 医学部 細胞統合生理学講座・助教
研究者番号：70705459

大西 弘恵 (OHNISHI Hiroe)
京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科・特定助教
研究者番号：50397634

岸本 曜 (KISHIMOTO Yo)
京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科・特定病院助教
研究者番号：80700517

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし