

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861404

研究課題名(和文) ヒト iPS 細胞を用いた喉頭組織再生に関する研究

研究課題名(英文) Laryngeal Regeneration with Human-Induced Pluripotent Stem Cells

研究代表者

今泉 光雅 (Imaizumi, Mitsuyoshi)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30554422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000 円

研究成果の概要(和文)：in vitroにおけるiPS細胞の声帯上皮への分化誘導技術の開発：ゲルへのEGFなどの増殖因子添加や声帯由来線維芽細胞との共培養によりiPS細胞の分化を誘導し、上皮形成を図り、得られた組織片の組織像、蛋白質や遺伝子の発現に関して評価を行い発現が確認された。  
in vivoにおけるiPS細胞の損傷声帯への移植技術開発：ラットの声帯にiPS細胞をInjectableなゲルとともに移植し、声帯におけるiPS細胞の生着・生存が確認された。EGFを加えたモデルを移植した損傷声帯において、声帯癒痕の形成が抑制される傾向が確認された。ヒトiPS細胞を用いた喉頭組織再生の可能性を示すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Immunofluorescence revealed the presence of pancytokeratin, epithelium associated proteins in iPS cells EGF and in iPS Vocal Fold Fibroblast(VFF) cultures. Transcript expression levels of CK14 was significantly increased for iPS cells VFF cultures only and measured concomitantly with cell morphology that was clearly cohesive and displaying a degree of nuclear polarity, suggestive of epithelial differentiation. iPS cells cultivated in 3D hydrogel with VFF demonstrated the most robust conversion evidence of epithelial differentiation  
Presence of hydrogel was confirmed in vocal folds one and two weeks post injection. Histological results demonstrated that vocal folds injected with hydrogel scaffold containing EGF demonstrated less fibrosis than those with hydrogel only. iPS cells survived in injured rat vocal folds. hydrogel with iPS cells and EGF ameliorated the fibrotic response.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：ヒトiPS細胞 上皮分化誘導 気道再建

## 1. 研究開始当初の背景

喉頭組織の損傷、特に声帯組織の損傷に伴う音声障害は、豊かな生活環境の構築において大きな問題となる。仕事上声を使用する人の割合は増加しており、近年の研究によれば労働人口の約 41% が声を必要とする職業に従事し、そのうち 3 分の 1 以上が何かしらの音声障害の症状を有していることが報告されている。

声帯癬痕に伴う音声障害は、喉頭の術後や炎症、外傷後に形成され得る。癬痕の形成に伴い声帯粘膜の振動が阻害され、その結果音声障害が生じる。動物実験や臨床応用を含めて、声帯の癬痕に対する治療は、ステロイド薬や成長因子の注入、種々の細胞や物質の移植などにより試みられているが、現在まで決定的な治療法がないのが現状である。

細胞治療の中でも、最も期待されているのが幹細胞治療である。幹細胞は分化能や増殖能に優れ、血液領域や整形外科領域等ですでに臨床応用され、通常の体細胞や組織の移植では得られない利点が報告されている。しかしながら、現在まで喉頭領域で幹細胞を用いた声帯の治療に関する臨床研究は報告されていない。無限の増殖能や分化能をもち、患者本人の細胞から作製可能な iPS 細胞は、移植医療において大きな問題となる組織の拒絶も原則認めないとされ、再生医療において理想的な細胞といえる。

ヒト iPS 細胞が臨床応用可能となれば、音声障害を有する労働者の人口を減少させることが可能であり、より豊かな社会生活に貢献できることが期待される。

## 2. 研究の目的

喉頭の手術後や炎症後の音声障害に対する治療は、音声障害の病態解明、成長因子の投与、細胞の移植治療等様々なアプローチが行われているが、音声の回復は困難な

ことが多く、治療に対する統一見解は得られてない。本研究では喉頭再生に有用な移植細胞の実用化に向けて、生体適合性のある足場(スキャフォールド)を材料とし、喉頭組織の再生促進を意図し、iPS 細胞の培養法を確立する。より臨床応用に近づけるため、ヒト iPS 細胞から分化誘導した上皮細胞・組織を免疫染色や遺伝子解析により評価し、喉頭組織を再生する技術を開発する。

## 3. 研究の方法

マウス iPS 細胞を用いた気管の再生医療研究で得られている技術を用い、喉頭組織の再生に有用な移植材料、および移植細胞・組織の実用化に向けて研究を行う。生体適合性の Injectable なゲルを骨格とし細胞の進入・生着に適した足場材料(スキャフォールド)を作製、研究する。次に、声帯の損傷後の再生促進を意図し、ヒト iPS 細胞の培養法を確立する。ヒト iPS 細胞から分化誘導した声帯上皮細胞を免疫染色や遺伝子解析により評価し、喉頭上皮組織を再生する技術を開発する。

## 4. 研究成果

iPS 細胞を培養し、十分量のストックを確保後、足場材料(生体適合性の Injectable なゲル)を準備した。単層培養や声帯由来の線維芽細胞等と共培養して培養皿上でも、分化誘導を試みた。上皮への分化誘導培地の使用、ゲルへの EGF などの増殖因子添加などにより iPS 細胞の分化を誘導し上皮形成を図り、得られた組織片の組織像、蛋白質や遺伝子の発現が確認された。

全身麻酔下に免疫不全ラットの喉頭を露出させ、声帯損傷モデルを作成した。得られた細胞と足場材料を損傷部及び正常声帯に移植し、損傷部位における iPS 細胞の生着および分化増殖と正常組織での細胞の分化増殖を比較した。声帯の細胞移植

部位の組織像、蛋白質や遺伝子に関して、移植されていない正常部位とで比較し評価を行い、細胞の生着が確認され、声帯瘢痕に対する効果が確認された。

#### 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 7件)

#### 欧文

1. Bayu Tirta Dirja, Susumu Yoshie, Makakazu Ikeda, Mitsuyoshi Imaizumi, Ryosuke Nakamura, Koshi Otsuki, Yukio Nomoto, Ikuo Wada, Akihiko Hazama, Koichi Omori.  
Potential of laryngeal muscle regeneration using induced pluripotent stem cell-derived skeletal muscle cells  
ActaOtolaryngol. 2016 Apr;136(4):391-6.
2. Makakazu Ikeda, Mitsuyoshi Imaizumi, Susumu Yoshie, Koshi Otsuki, Masao Miyake, Akihiko Hazama, Ikuo Wada, Koichi Omori.  
Regeneration of tracheal epithelium using mouse induced pluripotent stem cells.  
Acta Otolaryngol. 2016 Apr;136(4):373-8.
3. Susumu Yoshie, Mitsuyoshi Imaizumi, Ryosuke Nakamura, Koshi Otsuki, Makakazu Ikeda, Yukio Nomoto, Ikuo Wada, Koichi Omori.  
Generation of airway epithelial cells with native characteristics from mouse induced pluripotent stem cells.  
Cell Tissue Res. 2016 May;364(2):319-30.

4. Yoshie Susumu, Masakazu Ikeda, Mitsuyoshi Imaizumi, Koshi Otsuki, Yukio Nomoto, Ikuo Wada, Koichi Omori.

Visualization of mouse induced pluripotent stem cells for evaluation of tracheal regeneration.

Acta Otolaryngol. 2015

Apr;135(4):395-401.

#### 和文

1. 今泉光雅、大森孝一、総説：ヒト iPS 細胞を用いた声帯の組織再生 音声言語医学 56(3), 209-212, 2015
2. 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 日本気管食道科学会会報 66 :2; 123-125, 2015
3. 今泉光雅、大槻好史、大森孝一、iPS 細胞を用いた喉頭・気管の上皮再生 喉頭 27, 59-61, 2015

[学会発表](計 8件)

#### 国際学会

1. Mitsuyoshi Imaizumi, Koshi Otsuki, Masakazu Ikeda, Susumu Yoshie, Koichi Omori. Technological development for the Regeneration of Trachea and Larynx with Induced Pluripotent Stem Cells (iPS) cells  
European ORL-HNS, Prague, 2015.
2. Mitsuyoshi Imaizumi, Susan L. Thibeault, Koichi Omori. Potential of Epithelial Differentiation from Human-Induced Pluripotent Stem Cells (hiPS) for Vocal Fold Tissue Engineering EastAsian phonosurgery. Taiwan, 2014.

3. **Mitsuyoshi Imaizumi**, Koichi Omori, Susan L. Thibeault.

In vitro Epithelial Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells (hiPS) for Vocal Fold Tissue Engineering Strategic Directions in Laryngeal Tissue Regeneration Conference, Madison, Wisconsin, July 10, 2014.

4. **Mitsuyoshi Imaizumi**, Nicole Y.K. Li, Ciara Leydon; Yuka Sato, David T. Yang, Susan L. Thibeault. Human-Induced Pluripotent Stem Cells (hiPS) with HA-hydrogels for Vocal folds Tissue Engineering. The 94th Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association, Las Vegas, Nevada, May 14, 2014.

#### 国内学会

1. **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総会ならびに学術講演会、福島、2015(シンポジウム)

2. **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・気管の上皮再生、第27回日本喉頭科学会・学術講演会、東京、2015.

3. **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総会ならびに学術講演会、高知、2014。(パネルディスカッション)

4. **今泉光雅**、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総会、福岡、2014.

(シンポジウム)

〔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

今泉光雅 (IMAIZUMI, Mitsuyoshi)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：30554422

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )