

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790671

研究課題名（和文） ES および iPS 細胞由来の小腸モデル細胞の作成

研究課題名（英文） Establishment of intestinal differentiation method from ES/iPS cells

研究代表者

白木 伸明（SHIRAKI NOBUAKI）

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：70448520

研究成果の概要（和文）：これまでに、我々はマウス中腎由来培養細胞株 M15 細胞との共培養系を用いて、ES 細胞から消化器官（膵臓、肝臓）細胞の分化誘導方法を開発し、分化に関わる因子を明らかにした。今回の研究では、M15 細胞を用いてマウス ES 細胞から内胚葉細胞を効率的に分化させた後に小腸分化を促進する液性因子を添加することで、小腸前駆細胞を効率よく分化誘導することにも成功した。更に、M15 細胞上で分化を進めることで、すべての小腸細胞が分化誘導可能であることも確認している。本方法は、マウス ES 細胞のみならずヒト iPS 細胞にも応用可能であることも併せて確認した。

研究成果の概要（英文）：The efficient differentiation of mouse or human ES cells into mature cell types of the intestine remains a major challenge. Using the in vitro differentiation procedure of pluripotent stem cells into definitive endoderm we established previously, we found that simultaneous application of two specific growth factors efficiently induced intestinal differentiation. All four intestinal differentiated cell types, namely the absorptive enterocytes and three types of secretory cells (goblet cells, enteroendocrine cells, Paneth cells) were efficiently differentiated among mouse and human ES cell-derived intestinal epithelium cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：ヒト iPS 細胞・ES 細胞・モデル細胞

## 1. 研究開始当初の背景

新薬開発において薬剤の吸収および代謝について迅速かつ大規模に調べるハイスループット評価系は必須となっている。現在、小腸での薬物透過吸収測定法としては、ヒト腸管透過吸収をよく反映すると言われていたヒト結腸ガン由来上皮細胞株 Caco-2 細胞

が汎用されている。近年、小腸の上皮細胞にも薬物代謝酵素 CYP3A4 が多く存在し、薬物の代謝に関与していることが明らかになったが、Caco2 細胞においては、発現量が極端に低いことが報告されている。また、ヒト小腸に発現している他の酵素についても存在はするものの、そのアイソザイムや発現量が

大きく異なることがわかっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、ES 細胞および iPS 細胞から正常発生に沿った形で小腸細胞を効率よく分化誘導する方法を確立し、小腸における薬物動態予測のためのモデル細胞を作成することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) マウス ES 細胞から胚性内胚葉を介した小腸系譜への分化誘導法の確立

分化には、小腸も含めた内胚葉組織への分化誘導能を持った M15 細胞との共培養系を用いた (Shiraki et al., 2008a)。まずは、正常発生において小腸および内胚葉への分化を制御することが報告されている因子について、添加時期・濃度および組み合わせをこれまでの知見を元に検討した。TGF $\beta$ ・FGF・Wnt・Notch・レチノイン酸のシグナルを想定し、液性因子およびシグナルの阻害薬を添加して、分化に与える影響を評価した。評価は、RT-PCR 解析・抗体染色・細胞内フローサイトメトリー解析を併用して行った。

(2) ヒト iPS 細胞から小腸への分化誘導法の確立

マウス ES 細胞で得られた知見を元に、ヒト iPS 株 (201B7) から小腸への効率的な分化誘導方法を構築する。インビトロでの評価は、マウス ES 細胞を用いた場合と同様の方法で行った。

## 4. 研究成果

平成 21 年度は、マウス ES 細胞を支持細胞である M15 細胞を共培養することにより、効率よく分化誘導できる方法の開発を行った。その結果、Cdx2 陽性の小腸細胞への分化を促進する液性因子を 2 種類同定することに成功した (図 1)。更に、M15 細胞上で分化を進めることで、すべての小腸細胞が分化誘導可能であることも確認している。(図 2)。さらに、液性因子の分化に与える影響をより詳細に解析するために、分化誘導した内胚葉細胞をセルソーターを用いて分離した後に再度腸への分化誘導を行う系を構築した。

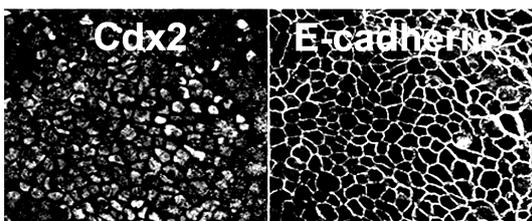


図 1, M15細胞上で液性因子添加培地で培養したマウスES細胞の抗体染色像, (Cdx2: 小腸細胞マーカー, E-cadherin: 上皮細胞マーカー)

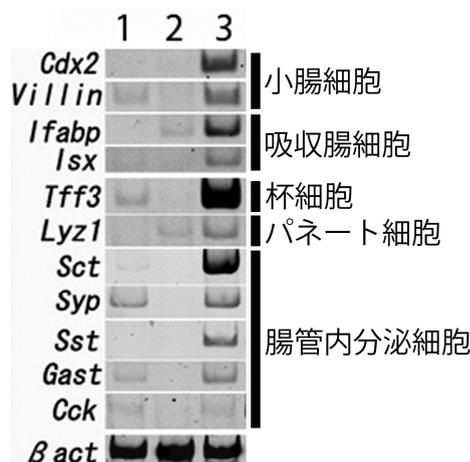


図2 M15細胞を用いた小腸分化

1: 未分化ES細胞 2: M15細胞

3: M15細胞上で培養したES細胞

平成 22 年度は、マウス ES 細胞から得られた知見を参考にしながら、ヒト iPS 細胞から小腸組織への分化誘導方法の開発を行った。ヒト iPS 細胞においても M15 細胞は内胚葉組織への分化誘導に有用であることが分かっており、小腸も同様に M15 の系を用いて、小腸分化誘導を行った。評価は、RT-PCR, 抗体染色、免疫染色等を用いて行った。解析の結果、M15 細胞上で分化を進めることで、効率よく小腸前駆細胞を分化誘導することに成功し、長期培養により、吸収腸細胞・杯細胞・パネート細胞および腸管内分泌細胞といった、すべての小腸細胞が分化誘導可能であることも確認した (大垣ら、投稿準備中)。

## 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 14 件)

1. Ogaki S†., Harada S†., Shiraki N., Kume K and Kume S., An expression profile analysis of ES cell-derived definitive endodermal cells and Pdx1-expressing cells. BMC Dev. Biol., Mar 1, (2011) (査読有り)
2. Higuchi Y, Shiraki N, Kume S., In vitro models of pancreatic differentiation using ES or iPS cells. Congenit. Anom. (Kyoto). 51., 21-5, (2011) (査読有り)
3. Shiraki N†., Harada S†., Ogaki S., Kume K. and Kume S., Identification of DAF1/CD55, a novel definitive endoderm marker. Cell Struct. Funct., 35, 73-80, (2010) (査読有り)

4. Higuchi Y., Shiraki N., Yamane K, Qin Z., Mochitate K., Araki K., Senokuchi K., Yamagata K., Hara M., Kume K., and Kume S., Synthesized basement membrane substrata direct the differentiation of mouse ES cells into pancreatic lineages, *J. Cell Sci.*, 123, 2733-42, (2010) (査読有り)
5. Katsumoto K, Shiraki N., Miki R, Kume S. Embryonic and adult stem cell systems in mammals: ontology and regulation. *Dev. Growth Differ.*, 52, 115-29, (2010) (査読有り)
6. 樋口裕一郎、白木伸明、糸 昭苑 「 $\beta$ 細胞分化誘導研究が発生学に与えるインパクト」特集号『代謝制御の鍵を握る $\beta$ 細胞』*実験医学* 28、1364-1367, 2010. (査読無し)
7. Shiraki N., Highchi Y and Kume S., (2010). Guiding ES cell differentiation into the definitive endoderm lineage. *Inflammation and Regeneration* 30, 109-14. (査読無し)
8. 山添太士、白木伸明、糸 昭苑 「ES細胞由来分化肝細胞の創出」、*医学のあゆみ*、医歯薬出版 (東京)、232(2)、105-109、2010 (査読無し)
9. 坂野大介、白木伸明、糸 昭苑 「iPS細胞を用いた $\beta$ 細胞分化誘導の研究」、*日本内科学会雑誌*、*日本内科学会*、98(12)、3149-3153、2009 (査読無し)
10. 白木伸明、樋口裕一郎、糸昭苑 「各種幹細胞を用いた消化器の再生医療」、*血液フロンティア*、*医薬ジャーナル*(大阪)、19(11)、1673-1678、2009 (査読無し)
11. 梅田香穂子、白木伸明、糸 昭苑 「ES細胞や iPS 細胞からの膵臓分化誘導と臨床への応用」、*臨床検査*、*医学書院* (東京)、53 (10)、1203-1207、2009 (査読無し)
12. 白木伸明、糸 昭苑 「ES細胞から $\beta$ 細胞への分化」、*肝胆膵*、*アークメディア* (東京)、59(4)、611-617、2009 (査読無し)
13. 樋口裕一郎、白木伸明、糸 昭苑 「iPS細胞を用いた膵臓細胞の作成と、その移植医療への応用」、*移植*、*日本移植学会*、44(3)、236-240、2009 (査読無し)
14. 樋口裕一郎、白木伸明、糸 昭苑、「ES

細胞をもちいて消化器系幹細胞を高効率に作製培養する技術」、*幹細胞の分化誘導と応用*、*エヌ・ティー・エヌ* (東京)、119-126、2009 (査読無し)

[学会発表] (計 26 件)

1. 三木 梨可, 吉田 哲, 安川 貴規, 白木 伸明, 糸 和彦, 糸 昭苑, Analysis of Epiplakin1 expression during pancreatic regeneration, *BMB2010*, 2010年12月7-10日 神戸ポートアイランド (神戸) (ポスター発表)
2. 河室友希, 三木 梨可, 安川 貴規, 吉田 哲, 白木 伸明, 糸 和彦, 糸 昭苑, Regeneration of beta cells in neonatal mouse after streptozotocin treatment, *BMB2010*, 2010年12月7-10日 神戸ポートアイランド (神戸) (ポスター発表)
3. 坂野大介, 白木 伸明, 片岡 正光, 糸 和彦, 糸 昭苑, The establishment of a screening system for low molecular compounds for beta-cell inducing activity, *BMB2010*, 2010年12月7-10日 神戸ポートアイランド (神戸) (ポスター発表)
4. 砂川孝行, 永江 玄太, 白木 伸明, 佐藤 憲子, 糸 昭苑, 油谷 浩幸, マウス ES細胞の3胚葉分化におけるDNAメチル化プロファイリング, *BMB2010*, 2010年12月7-10日 神戸ポートアイランド (神戸) (ポスター発表)
5. 永江玄太, 砂河 孝行, 白木 伸明, 末盛 博文, 糸 昭苑, 油谷 浩幸, 細胞分化過程における低 CpG プロモーターの組織特異的な脱メチル化, *BMB2010*, 2010年12月7-10日 神戸ポートアイランド (神戸) (ポスター発表)
6. 大垣総一郎, 白木 伸明, 糸 和彦, 糸 昭苑, ES細胞由来の胚性内胚葉を介した腸上皮様細胞への分化誘導法の確立, *BMB2010*, 2010年12月7-10日 神戸ポートアイランド (神戸) (ポスター発表)
7. 白木恭子, 白木 伸明, 持田 太賀, 糸 昭苑, 遠藤 文夫, The effects of amino acids on the differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatic lineage. , *BMB2010*, 2010年12月7-10日 神戸ポートアイランド (神戸) (ポス

ター発表)

8. 白木 伸明, 曾 勤, 持立 克身, 樋口 裕一郎, 梅田 香穂子, 糸 和彦, 糸 昭苑  
Efficient differentiation of mouse and human ES/iPS cells into hepatic cells using feeder free basement membrane substratum, BMB2010, 2010年12月7-10日 神戸ポートアイランド (神戸) (ポスター発表)
9. 山添 太士, 白木 伸明, 梅田 香穂子, 糸 和彦, 糸 昭苑, A novel culture environment that promotes hepatic differentiation from human iPS and mouse ES cells, BMB2010, 2010年12月7-10日 神戸ポートアイランド(神戸) (ポスター発表)
10. 持立克身、糸昭苑、曾勤、小高真希、白木伸明、樋口 裕一郎、永野麗子 「基底膜構造体を培養基質に用いた幹細胞の分化と機能発現」 シンポジウム：再生医療・臓器再生・人工臓器とマトリックス工学 第42回日本結合組織学会学術大会・第57回マトリックス研究会大会合同学術集会, 2010年8月19-20日 センターアルヴェ (秋田市) (口頭発表)
11. Nobuaki Shiraki, Zeng Qin, Katsumi Mochitate, Yuichiro Higuchi, Kahoko Umeda, Kazuhiko Kume and Shoen Kume. Efficient differentiation of mouse and human ES/iPS cells into hepatic cells using feeder free basement membrane substratum. ISSCR, 8th Annual Meeting, June 16-19, 2010. Moscone West (San Francisco, USA) (ポスター発表)
12. 貝塚 拓、野口 洋文、白木 伸明、魏 范研、糸 昭苑、富澤 一仁 「蛋白質導入法による ES 細胞からインスリン産生細胞への分化誘導」 第87回日本生理学会 2010年5月20日、盛岡市民文化ホール(盛岡市) (ポスター発表)
13. 白木伸明、「人工基底膜を用いた ES 細胞から肝細胞への分化誘導」第9回日本再生医療学会総会 シンポジウム「肝移植・再生」2010年3月19日 広島国際会議場 (広島) (口頭発表)
14. Yasuko Nakamura, Matsumoto S., Nobuaki Shiraki., Mochida T., Nakamura K., Takehana K., Kume S., Endo F. Glycine regulates the proliferation and differentiation of stem cells. グリシンは幹細胞の増殖分化を制御する. 第32回日本分子生物学会 2009年12月9日 パシフィコ横浜 (横浜) (ポスター発表)
15. Kahoko Umeda., Nobuaki Shiraki., Daisuke Sakano., Kumi Tokieda., Kazuhiko Kume., Shoen Kume. ヒト ES 細胞から膵前駆細胞への分化誘導 第32回日本分子生物学会 2009年12月9-12日 パシフィコ横浜 (横浜) (ポスター発表)
16. Soichiro Ogaki., Seiko Harada, Nobuaki Shiraki., Kazuhiko Kume and Shoen Kume. Microarray analysis of endoderm specific genes. 第32回日本分子生物学会 2009年12月9-12日 パシフィコ横浜 (横浜) (ポスター発表)
17. Genta Nagae, Takayuki Isagawa, Nobuaki Shiraki, Atsushi Kaneda, Hirofumi Suemori, Shoen Kume, Hiroyuki Aburatani. Tissue-specific promoter hypomethylation as a new aspect of tissue-specific differentially methylated regions, T-DMR. 第32回日本分子生物学会 2009年12月9-12日 パシフィコ横浜 (横浜) (ポスター発表)
18. Yuichiro Higuchi, Nobuaki Shiraki, Qin Zeng, Katsumi Mochitate, Keitaro Yamane, Kazuhiko Kume and Shoen Kume, Synthesized basement membrane dependent differentiation procedures of the mouse ES or iPS cells into pancreatic cell lineages 第32回日本分子生物学会 2009年12月9-12日 パシフィコ横浜 (横浜) (ポスター発表)
19. Nobuaki Shiraki, Zeng Qin, Katsumi Mochitate, Yuichiro Higuchi, Kahoko Umeda, Kazuhiko Kume and Shoen Kume. Efficient differentiation of mouse and human ES cells into hepatic cells using feeder free basement membrane substratum in vitro. 第32回日本分子生物学会 2009年12月9-12日 パシフィコ横浜 (横浜) (ポスター発表)
20. Keitaro Yamane, Yuichiro Higuchi, Nobuaki Shiraki, Kazuhiko Kume, Shoen Kume, Establishment of efficient

- transplantation methods using ES or iPS cell-derived pancreatic cells 第32回日本分子生物学会 2009年12月9-12日 パシフィコ横浜 (横浜) (ポスター発表)
21. Yuichiro Higuchi, Keitaro Yamane, Nobuaki Shiraki, Zeng Qin, Katsumi Mochitate, Kazuhiko Kume and Shoen Kume “The synthesized basement membrane substrata direct ES cells to differentiate into the pancreatic lineages.” International Joint Symposium on “Cell fate regulation research: stem cells and organogenesis” Nov 26-27, 2009. Kumamoto University (Kumamoto, Japan) (口頭発表)
22. 白木 伸明、樋口 裕一郎、山添 太士、曾勤、持立克身、小林 直哉、糸 和彦、糸 昭苑、Efficient differentiation of mouse and human ES cells into hepatic cells using feeder free basement membrane substratum in vitro、グローバルCOE-I MEG ジョイント・サマー・リトリート・セミナー、2009年9月3・4日、グリーンピア南阿蘇 (熊本) (ポスター発表)
23. Nobuaki Shiraki, Zeng Qin, Katsumi Mochitate, Yuichiro Higuchi, Kahoko Umeda, Kazuhiko Kume and Shoen Kume. Efficient differentiation of mouse and human ES cells into hepatic cells using feeder free basement membrane substratum in vitro. ISSCR, 7th Annual Meeting, July 8-11, 2009. Centre Conventions International Barcelona (Barcelona, Spain) (ポスター発表)
24. Yuichiro Higuchi, Keitaro Yamane, Nobuaki Shiraki, Zeng Qin, Katsumi Mochitate, Kazuhiko Kume and Shoen Kume. Novel differentiation procedures of the mouse ES or iPS cells into pancreatic cell lineages. ISSCR, 7th Annual Meeting, July 8-11, 2009. Centre Conventions International Barcelona (Barcelona, Spain) (ポスター発表)
25. Keitaro Yamane, Yuichiro Higuchi, Nobuaki Shiraki, Kazuhiko Kume, Shoen Kume, Differentiation of the mouse induced pluripotent stem cells into pancreatic cell lineages. (マウス iPS 細胞を用いた膵臓系譜への分化誘導) 42th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biology, May 28-31, 2009 TOKI MESSE (Nigata). (ポスター発表)
26. Yoshida T., Shiraki N., Baba, H., Goto, M., Fujiwara, S., Kume K., Kume S. The analysis of the expression patterns of Epiplakin1. (Epiplakin1 の発現パターンの解析) 42th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biology, May 28-31, 2009 TOKI MESSE (Nigata). (ポスター発表)
- [図書] (計1件)
1. Shiraki, N., Miki, R., Katsumoto, K., Kume, S. The potential of ES cells and tissue stem cells in the regenerative medicine of type I diabetes. ‘Stem Cell Therapy, 2010:71-85 Chapter 5. ISBN: 978-81-7895-502-5 Editor: Ken-Ichi Isobe. Transworld Research Network. 37/661(2), Fort P.O. Trivandrum-965 023 Kerala, India. (2010)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計5件)
- 名称: 腸細胞の製造方法  
 発明者: 糸昭苑、白木伸明、糸和彦、大垣 総一郎  
 権利者: 国立大学法人 熊本大学  
 種類: 特許権  
 番号: 特願 2010-246161  
 出願年月日: 2010年11月2日  
 国内外の別: 国内
- 名称: 多能性幹細胞の分化誘導効率を改善するための方法及び培地  
 発明者: 糸昭苑、遠藤文夫、白木伸明、白木 恭子、糸和彦  
 権利者: 国立大学法人 熊本大学  
 種類: 特許権  
 番号: 特願 2010-242774  
 出願年月日: 2010年10月28日  
 国内外の別: 国内
- 名称: 細胞の分化誘導方法  
 発明者: 糸昭苑、白木伸明、樋口裕一郎、梅田香穂子、糸和彦、山根恵太郎、持立克身  
 権利者: 国立大学法人 熊本大学  
 種類: 特許権

番号：特願 2009-136520  
出願年月日：2010 年 6 月 10 日  
国内外の別：国内

名称：特願 2009-254336  
発明者：糸昭苑、白木伸明、糸和彦  
権利者：国立大学法人 熊本大学  
種類：特許権  
番号：特願 2009-254336  
出願年月日：2009 年 11 月 5 日  
国内外の別：国内

名称：内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞の検出方法  
発明者：糸昭苑、原田聖子、白木伸明、糸和彦  
権利者：国立大学法人 熊本大学  
種類：特許権  
番号：特願 2009-225758  
出願年月日：2009 年 9 月 30 日  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

Higuchi Y., Shiraki N., Yamane K, Qin Z., Mochitate K., Araki K., Senokuchi K., Yamagata K., Hara M., Kume K., and Kume S., Synthesized basement membrane substrata direct the differentiation of mouse ES cells into pancreatic lineages, J. Cell Sci., 123, 2733-42, (2010)

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np43.html>

Ogaki S†., Harada S†., Shiraki N., Kume K and Kume S., An expression profile analysis of ES cell-derived definitive endodermal cells and Pdx1-expressing cells. BMC Dev. Biol., Mar 1, (2011)

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np44.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白木 伸明 (SHIRAKI NOBUAKI)  
熊本大学・発生医学研究所・助教  
研究者番号：7 0 4 4 8 5 2 0