

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591649

研究課題名（和文） 微小重力環境を用いた多能性幹細胞の腸管神経分化誘導による新しい幹細胞移植法の開発

研究課題名（英文） Development of stem cell transplantation with enteric nervous differentiation from mouse pluripotent stem cells under microgravity

研究代表者

植田 剛（UEDA TAKESHI）

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：40526810

研究成果の概要（和文）：微小重力環境下に神経堤幹細胞、脂肪由来幹細胞を用いたスフェロイドを形成することによる新しい幹細胞移植にむけて、まず iPS 細胞からの神経堤幹細胞への第一歩として、神経系を含んだ腸管への分化誘導実験を行った。iPS 細胞を含む培養液を懸垂培養し、胚葉体を形成し、付着培養に移行することにより、蠕動運動能を有する腸管に特有の三胚葉系を有する腸管臓器を分化誘導することができた。本研究はヒルシュスプルング病という疾患治療を目標とすると、疾患由来という特性を生かすことのできる iPS 細胞から神経系を含んだ腸管が誘導可能であったことが大変重要な発見であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：For new stem cell transplantation by using spheroid derived from neural crest stem cells and adipose tissue-derived stem cells under microgravity, at first, we tried to perform the differentiation from induced pluripotent stem cells to the neural crest stem cell. We demonstrate that mouse iPS cells have the ability to organize a gut-like organ with motor function in vitro by three-dimensional culture. A gut-like organ was composed of all the enteric components of three germ layers. When this study aims for treatment of Hirschsprung's disease, it was very important discovery to organization of functional gut including the nervous system from iPS cells which have a disease-specific characteristic.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：人工臓器学、再生医学、幹細胞、細胞・臓器移植

## 1. 研究開始当初の背景

胚の発生や生体の臓器の分化に重力が重要な影響を与えていることは最近の宇宙医学の進歩にて明らかとなってきた。これま

で ES 細胞から腸管分化誘導が可能で、神経栄養因子である GDNF、BDNF を添加することにより、神経堤幹細胞が分化誘導できることが分かっている。また簡便な細胞供給

源として期待されている脂肪由来幹細胞には、血管新生因子を産生し、移植下細胞の生着を促進するといわれている。そこで、神経堤幹細胞のみを移植するのではなく、神経堤幹細胞と脂肪由来幹細胞を微小重力環境で共培養してスフェロイドを作製することによる新しい幹細胞移植法の研究を計画した。

## 2. 研究の目的

微小重力環境下に神経堤幹細胞と脂肪由来幹細胞の共培養によるスフェロイド形成を行った新しい幹細胞移植の研究を行い、最終的にはヒルシュスブルグ病モデルマウスに移植を行うことを考慮すると、ES細胞ではなく、疾患特異的にも対応可能なiPS細胞を用いて、研究を行うことが必要であると考えられた。さらに重力の影響を評価するために培養系として懸垂培養系での胚葉体を作製することを経て、iPS細胞から蠕動運動能を有する腸管特異的な三胚葉系を有した腸管神経系への分化誘導に関する研究を行うことが必要と考えられた。

## 3. 研究の方法

iPS細胞を含む培養液を培養皿の蓋に吊り下げて行う懸垂培養系で、iPS細胞は重力の影響で培養液の先端に凝集し、胚葉体を形成する。この胚葉体を付着培養系に移して培養をおこない、蠕動運動能を有する腸管特異的な三胚葉系の細胞を有する腸管臓器の分化誘導をおこなった。さらに、形態学的、解剖学的な解析を行った。

## 4. 研究成果

iPS細胞は重力の影響を受けて、培養液の先端に凝集し胚葉体を形成する。懸垂培養を6日間行った胚葉体を用いて付着培養を行うと、約7日目に心筋細胞の収縮リズムとは異なり、不規則なリズムで自動収縮する3次元ドーム状の組織を認めるようになる。約10日目になると管腔状にも形態変化し、約14日目になると規則正しいリズムで自動運動するようになる。約21日目になると規則正しい自動運動に加えて、大きく波打つような搾り出す動き（蠕動様運動）が観察されるようになる。iGutを解剖学的に解析すると、個体の腸管と同様、内側から内胚葉由来のGoblet細胞やTuft細胞を含み、表面に微絨毛を有した粘膜上皮細胞が配列し、その外側中胚葉由来の平滑筋細胞やICC、最外層や腸管外側に外胚葉由来の神経線維ネットワークの順に一定の秩序で同心円状に配列しており、三胚葉系の組織を有する三層構造を呈した臓器としての腸管であった。ヒルシュスブルグ病に対する治療という目標を考慮すると、iPS細胞から腸管分化誘導が可能であるということは大変重要な発見であると考えられる。これらの研究成果は、Ueda T, Yamada T et al: Generation of functional gut-like organ from mouse induced

pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2010;391:38-42. で報告した。

## 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3件)

1. Generation of functional gut-like organ from mouse induced pluripotent stem cells. Ueda T, Yamada T Kanehiro H, Nakajima Y et al: Biochem Biophys Res Commun. 2010;391:38-42.
2. iPS細胞から蠕動運動する腸管の作成. 植田 剛, 中島祥介. 感染・免疫・炎症 2010;40:80-82.
3. 腸管再生医療の現状と展望-iPS細胞からの腸管再生-. 植田 剛, 中島祥介 大腸癌フロンティア 2010;3:75-79.

[学会発表] (計3件)

1. 植田 剛、山田高嗣、中島祥介 iPS細胞から蠕動運動する腸管(iGut)への臓器分化誘導 第9回日本再生医療学会 (2010年広島)
2. 植田 剛、山田高嗣、中島祥介 iPS細胞から蠕動運動する腸管(iGut)への臓器分化誘導 第110回日本外科学会定期学術集会(2010年名古屋) サージカルフォーラム
3. 植田 剛、山田高嗣、中島祥介 iPS細胞から蠕動する人工腸管(iGut)への臓器分化誘導第65回日本消化器外科学会総会(2010年下関) ワークショップ

[図書] (計1件)

1. 人工多能性幹(iPS)細胞から蠕動運動する人工腸管(iGut)への臓器分化誘導と再生医療への展望. 植田 剛, 山田高嗣, 小山文一, 金廣裕道, 中島祥介. 分子細胞治療フロンティア 2010;215-221.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 人工腸管の作成法

発明者: 山田高嗣

権利者: 奈良医大

番号: 2009-139271

出願年月日: 2009年6月10日

国内外の別: 国内、

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 高嗣 (YAMADA TAKATSUGU)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20316061

植田 剛 (UEDA TAKESHI)  
奈良県立医科大学・医学部附属病院  
・研究員  
研究者番号：40526810

### (2) 研究分担者

金廣 裕道 (KANEHIRO HIROMICHI)  
奈良県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：30204580