

平成 28 年 9 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670384

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた消化管前駆細胞の純化・増幅およびそれを用いた再生医療基盤

研究課題名(英文) The purification and expansion of human iPS cell-derived intestinal precursor cells for future application in regenerative medicine

研究代表者

条 昭苑 (Kume, Shoen)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：70347011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：分化誘導方法を改良した結果、内胚葉分化誘導において使用するアクチビン低濃度化し、腸への分化誘導の時間短縮できる有効な方法を確立した(Ogaki S et al., Scientific Reports., 2015)。そして、細胞外基質を使うことにより、セルソータを使わずに腸前駆細胞を純化できること、成長増殖因子を加えて試験管内で腸前駆細胞を増幅できる方法を見出した。また、化合物を添加することによる成熟化を図ることが出来るようになった。これらの方法を組み合わせることにより、成熟度の高い細胞をある程度たくさん得られるようになり、移植する細胞源が確保できるようになった。

研究成果の概要(英文)：We established a cost effective protocol to induce endoderm differentiation with low concentration of Activin by adding DMSO. We found that at the presence of DMSO, the threshold of Activin to induce intestinal differentiation is much reduced. We also established a protocol to selectively culture the human iPS cells-derived intestinal epithelial cells from a mixed cell population, so that the purified cells could be expanded and used for further studies. We also found that using defined growth factors and chemicals, the purified cells could be expanded and further matured. The present studies therefore enabled us to prepare a certain amount of cells that could be used for further studies for establishing regenerative medicine of the intestine.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：腸上皮細胞 分化誘導 多能性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト腸上皮幹細胞の単離と培養が報告された。しかし、その維持培養には、非常に多くの液性因子を要するためコストが高く、またマトリゲル内で三次元的に培養するため操作が複雑である。

これまで申請者らは、ヒト iPS 細胞から腸上皮前駆細胞を効率的に分化誘導する系の構築に成功した (Ogaki, *Stem Cells*, 2013)。分化した腸上皮前駆細胞は、成熟化した吸収腸細胞・杯細胞・パネート細胞および腸管内分泌細胞に誘導できることについて、それぞれの特異的な分化マーカーを発現することにより確認している。しかしながら、ヒト iPS 細胞由来の分化細胞を用いた移植治療効果を評価する実験系は構築できていない。また、移植を行うためにはより純度が高く、多くの細胞数が必要である。したがって、よりコストのかからない、効率の良い分化誘導方法の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、高効率で簡便なヒト iPS 細胞由来腸上皮前駆細胞の純化方法を確認し、移植細胞源を確保するため、ヒト iPS 細胞由来腸上皮前駆細胞の自己増殖を促進する方法、およびその *in vitro* 増幅方法を確認することを目的とする。また、腸炎モデルマウスへの移植治療効果を検討し、再生医療の方法論の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では移植ソースとして、iPS 細胞由来腸上皮細胞の純化、増幅方法の確立を目指す。そのためには、細胞表面

マーカーの検討、細胞接着性を応用した細胞の純化方法を検討する。ヒト iPS 細胞由来腸上皮細胞の純化を行う。Cdx2 陽性腸前駆細胞を分化誘導後に、細胞を様々な基質や細胞外マトリクスをコートした培養皿に撒きなおし、Cdx2 陽性細胞の割合を調べ、様々な基質をスクリーニングし、より純化できる系を構築する。さらに純化した腸上皮細胞の培養条件を検討し、増幅できる方法の確立を目指す。純化・増幅させた腸上皮細胞をソースとした、腸炎モデルマウスへの移植治療効果の検討を行う。

4. 研究成果

本研究において、まずは分化誘導方法の改良から着手した。内胚葉分化誘導時に Dimethyl sulfoxide (DMSO) を添加する方法により、アクチビンの濃度を従来の 100ng/ml より、6.25ng/ml まで低くすることが出来ることを見出した。DMSO によるアクチビンの分化促進の分子機序について詳細に調べた結果、DMSO は、アクチビンの閾値の濃度を低下させる作用があることが分かった。DMSO 存在下では、低い濃度のアクチビンにおいて、その下流の Smad2 のリン酸化を引き起こすことが出来る。さらに、DMSO 存在下では、アクチビンによって分化誘導された細胞が M 期から G1 期へと向かわせることが出来、その結果より分化傾向にさせることが出来ると考えられる。DMSO をアクチビンによる内胚葉分化時に加える方法を取り入れることで、コストの低減のみでなく、腸への分化誘導の時間短縮にも繋がった (Ogaki S et al., *Scientific Reports*, 2015)。さらに、ある種の細胞外基質を使うことにより、セルソータを使わずに腸前駆細胞を純化できることを見出した (Otera et al,

unpublished) また、得られた細胞について、成長増殖因子を検討した結果、試験管内において、腸前駆細胞を増幅できる方法を見出した。さらに、化合物を添加することによる成熟化を図ることが出来るようになった。これらの方法を組み合わせることにより、成熟度の高い細胞をある程度たくさん得られるようになり、移植する細胞源が確保できるようになった。

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 12 件)

Arakawa A, Shiraki N, Tsuyama T, Kume S, Iwahata D, Yamada N. Quantification of intracellular Zn, Fe, Cu within both iPS cells and differentiated cells using HPLC coupled to ICP-MS. (*inductively coupled plasma mass spectrometer). **J. Anal Bioanal Tech** 7, Issue 1, 1000295, 2016. (査読有)

Ogaki S*, Morooka M*, Otera K and Kume S. A cost effective system for differentiation of intestinal epithelium from human induced pluripotent stem cells. **Sci Rep** 5: 17297, 2015. doi: 10.1038/srep17297 (査読有)

Nakashima R, Morooka M, Shiraki N, Sakano D, Ogaki S, Kume K, Kume S, Neural cells play an inhibitory role in pancreatic differentiation of pluripotent stem cells. **Genes Cells** 20, 1028-1045, 2015. doi: 10.1111/gtc.12308. (査読有)

Shiraki N, Ogaki S, Kume S*. Profiling of embryonic stem cell differentiation. *Rev Diabet Stud.* 11(1):102-14, 2014. doi: 10.1900/RDS.2014.11.102. (査読有)

Shahjalal HM, Shiraki N, Sakano D, Kikawa H, Ogaki S, Baba H, Kume K., Kume S. Generation of insulin-producing beta-like cells from human iPS cells in a defined and completely Xeno-free culture system. **J. Mol. Cell Biol.** 6, 394-408, 2014. doi: 10.1093/jmcb/mju029 (査読有)

Shiraki N., Shiraki Y., Tsuyama T., Obata F,

Miura M, Nagae G, Aburatani H., Kume K, Endo F, Kume S*. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. **Cell Metab.** 19, 780-794, 2014. doi 10.1016/j.cmet.2014.03.017 (査読有)

Kikawa K, Sakano D, Shiraki N, Kume K, Endo F, Kume S*. The beneficial effect of insulin treatment on the outcome of islet transplantation in Akita mice. **PLoS ONE** 9(4): e95451, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0095451 (査読有)

大垣総一郎 糸昭苑「ES/iPS 細胞からの内胚葉組織形成」生化学 87 巻 5 号 573-581, 2015 年 (査読なし)

白木伸明 糸昭苑「iPS 細胞の内胚葉系への分化誘導」糖尿病学 2015, 1 -9. 診断と治療社(査読なし)

白木伸明 糸昭苑「幹細胞維持と分化におけるメチオニン代謝」『がん幹細胞 新しい医療を求めて』(III. 基礎研究動向) 日本臨床 73 巻 5 号 765-772, 2015 年 5 月(査読なし)

白木伸明 糸昭苑 ES/iP 細胞を用いた内胚葉細胞(膵、肝、小腸)への分化誘導- iPS 細胞研究最前線-疾患モデルから臓器再生まで 医歯薬出版社株式会社「医学のあゆみ」 251, 1153-1159, 2014. (査読なし)

坂野大介 糸昭苑「ES 細胞を用いた発生分化の研究と再生医学への応用」『特集 臓器の発生と再生の基礎』公益財団法人金原一郎医学医療振興財団(医学書院) 生体の科学 65. 197-202, 2014. 6 月(査読なし)

[学会発表](計 9 件)

糸昭苑「膵臓の発生分化と再生を中心に最近のトピックス」『動物細胞工学会』 2015 年 11 月 11 日(東京都) CIC (キャンパスイノベーションセンター、田町)

糸昭苑『第 4 回細胞治療研究会』「多能性幹細胞を用いた消化器官の分化誘導研究」 2015 年 10 月 31 日(東京都)

糸昭苑「iPS 細胞を用いた再生医療」第 27 回福岡糖尿病アゴラ 2015 年 4 月 18 日(福岡市)

桑昭苑「多能性幹細胞から消化器官への分化誘導」『Frontiers in Medical Science Seminar Series #76 慶応大医学部総合医科学研究センターセミナー』2015.1. 8

桑昭苑「ヒト多能性幹細胞を用いた消化器官の発生再生と創薬研究」鹿児島大学『医学研究講義』平成 26 年 12 月 18 日 (2014 年)

白木 伸明, 白木 恭子, 津山 友徳, 小幡 史明, 三浦 正幸, 永江 玄太, 油谷 浩幸, 桑 和彦, 遠藤 文夫, 桑 昭苑『ヒト多能性幹細胞の未分化維持および分化におけるメチオニン代謝の役割』第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日 (横浜) ポスター発表

Ogaki S., Morooka M, Otera K and Kume S “A cost effective intestinal epithelial differentiation system from human iPS cells”. KEY Forum: From Stem Cells to Organs, 2014. Sep 4-5 Kumamoto.

Otera K, Ogaki S., Kume S. “Easy purification of human iPSC-derived immature intestinal epithelial cells.” KEY Forum: From Stem Cells to Organs. 2014, Sep 4-5 Kumamoto.

Nobuaki S and Kume S, 『Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells』 Key Forum: From Stem Cells to Organs, 2014-9-4 (Kumamoto City Medical Association Hall)

〔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

<http://www.stem.bio.titech.ac.jp/>

・一般を対象とする講演会

桑昭苑「生命理工学の魅力」『幹細胞生物学 (ES 細胞と iPS 細胞)』高校生のための生命理工レクチャー2015 年 11 月 23 日 (横浜市)

桑昭苑「iPS cell development in Japan ~ toward the cure of diabetes ~」Roster of Researchers Lecturing for The 7th YCU Science Summer Program 2015 横浜市立大学 7 月 16 日 (留学生夏の学校) 特別講演

桑昭苑「私の 1 型糖尿病根治・治療への取り組みーヒト iPS 細胞から機能的な膵島の創製とそれを用いた治療法の開発」IDDM シンポジウム、サイエンスカフェ「ヒト iPS 細胞から機能的な膵島の創製」平成 27 年 5 月 30 日名古屋

桑昭苑 熊本県立第二高等学校 SSH 特別講演会 (全校生徒 1400 名)「幹細胞と再生医学」平成 26 年 11 月 20 日

桑昭苑 熊本県眼科医学会研修会「iPS 細胞を用いた再生医療研究」平成 26 年 11 月 8 日

桑昭苑「ヒト多能性幹細胞を用いた消化器官の発生再生と創薬研究」熊本大学医学部第一内科同門会同窓会 平成 26 年 9 月 27 日

6. 研究組織
(1) 研究代表者
桑昭苑 (Kume, Shoen)
(東京工業大学大学院生命理工学研究科教授)

研究者番号：70347011

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：