

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 14 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：26861405

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた気管軟骨への分化誘導に関する研究

研究課題名(英文) Generation of tracheal chondrocytes from human iPS cells

研究代表者

吉江 進 (Yoshie, Susumu)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70705459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒトiPS細胞から分化誘導させた気管軟骨細胞を利用し、生体親和性の高い人工気管を開発することで、気管欠損部位の再生を目的とする。まず、低分子化合物と成長因子を用いてヒトiPS細胞から沿軸中胚葉へ高効率に分化誘導させた。次に、ヒトiPS細胞由来沿軸中胚葉から気管軟骨細胞へ分化誘導させるために、気管軟骨細胞分化に関わる転写因子Aを強制発現させることで気管軟骨細胞へ分化誘導させた。生体適合性のある人工材料とヒトiPS細胞由来気管軟骨細胞を組み合わせたハイブリット型の人工気管を気管欠損モデルラットに移植した結果、移植2週間後においてもラットの生存が確認され、気管欠損部位の再生が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to regenerate tracheal defect by the use of an artificial trachea with human iPS cell-derived tracheal chondrocytes as a frame and collagen sponge as a scaffold. First, we could successfully induce human iPS cells into paraxial mesoderm with high efficiency using low molecular weight compounds and growth factors. Next, tracheal chondrocytes could be generated from human iPS cell-derived paraxial mesoderm by the overexpression of transcriptional factor A, which is related to chondrocyte differentiation. Finally, an artificial trachea with human iPS cell-derived tracheal chondrocytes and collagen sponge was implanted into tracheal defects in nude rats. At 14 d after implantation, the survival of rat was confirmed. These results raised the possibility that our artificial trachea can regenerate tracheal defect.

研究分野：生理学

キーワード：ヒトiPS細胞 気管 軟骨 再生

1. 研究開始当初の背景

甲状腺癌、炎症や外傷によって、気管の狭窄や破壊が引き起こり気管の一部を切除せざるを得ない場合がある。これまで、気管切除後における気管再建においては、肋軟骨や耳介軟骨、皮膚等の自家組織が気管再建材料として用いられてきた。しかし、これらの再建方法は他部位から十分な量の組織片を採取しなければならない上に、気管を再建する上で必ずしも適切な形状や強度ではない。以前、申請者らはポリプロピレン製のメッシュやリングを加工して気管の骨格とし、さらにはコラーゲンスポンジを細胞の足場として付加させることで、生体内の気管上皮組織をその場で再生できるような自己組織再生型の人工気管を開発した (Nakamura T et al., *Int J Artif Organs*. 2000)。2002 年には、この人工気管を用いて、世界に先駆けて気道の再生医療を開始し、現在まで 11 名に臨床応用し良好な結果を得ている (Omori K et al., *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005)。しかし、開発した人工気管は代用気管として優れた性質を有している反面、気管軟骨の骨格として用いられているポリプロピレンは非吸収性であるため、長期体内留置を避けられない。さらに、成長期にある小児に対しては気道の成長に影響を及ぼすことから、ポリプロピレンを含んだ人工気管は適応できない。

2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞から分化誘導させた気管軟骨細胞と生体適合性のあるコラーゲンスポンジを組み合わせ、生体親和性の高いハイブリット型の人工気管を開発することで、気管欠損部位の再生を試みる。

3. 研究の方法

(1) 移植後の生着を評価するためのヒト iPS 細胞への GFP 導入

分化細胞の生着を評価するために恒常的に GFP を発現するヒト iPS 細胞を作製する。

(2) ヒト iPS 細胞から沿軸中胚葉への分化誘導

気管軟骨細胞への分化誘導効率を上げるために、低分子化合物や成長因子を組み合わせ気管軟骨細胞の前駆体である沿軸中胚葉への高効率な分化誘導を行う。

(3) ヒト iPS 細胞由来沿軸中胚葉から気管軟骨細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞由来沿軸中胚葉から気管軟骨細胞へ分化誘導させるために、気管軟骨細胞分化に関わる転写因子 A の発現を DOX (ドキシサイクリン) の添加によってコンディショナルに制御できるようなヒト iPS 細胞を作製する。

(4) 移植のための足場材料の開発

アテロコラーゲンに凍結乾燥を施し、コラーゲンスポンジを作製する。この足場材料を用いてヒト iPS 細胞から分化誘導した気管軟骨細胞の移植を行う。

(5) 気管軟骨部分欠損モデルラットの作製及びヒト iPS 細胞由来気管軟骨細胞の移植

全身麻酔下にヌードラットの気管を露出させ、電気メスを用いて気管軟骨部分欠損モデルを作製し、ヒト iPS 細胞由来気管軟骨細胞と足場材料であるコラーゲンスポンジを加工して気管欠損部に移植を行う。

4. 研究成果

(1) 移植後の生着を評価するためのヒト iPS 細胞への GFP 導入

エレクトロポレーションによって恒常的に発現する GFP をヒト iPS 細胞へ導入し、GFP 陽性ヒト iPS 細胞を作製した。

(2) ヒト iPS 細胞から沿軸中胚葉への分化誘導

単層培養条件下で低分子化合物と成長因子を組み合わせ、5 日間分化誘導を行った。その結果、沿軸中胚葉マーカーである CDX1, 2, Tbx6, PDFGR  $\alpha$ 、T, MSGN1 の発現量が経時的に上昇した。また、免疫染色やフローサイトメーターの結果から、90%以上の細胞が沿軸中胚葉マ-

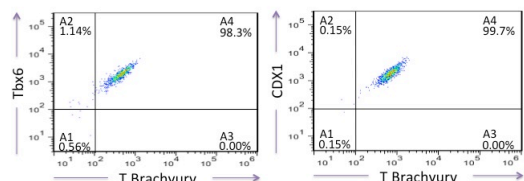


図1 ヒトiPS細胞から沿軸中胚葉への分化誘導

カー陽性の細胞であった (図 1)。

(3) ヒト iPS 細胞由来沿軸中胚葉から気管軟骨細胞への分化誘導

気管軟骨細胞分化に関わる転写因子 A の発現を DOX の有無によってコンディショナルに制御するために、pEF1  $\alpha$ -Tet3G vector と転写因子 A を搭載した pTRE3G-mCherry vector をエレクトロポレーションによってヒト iPS 細胞に導入した。DOX 未添加のヒト iPS 細胞では、転写因子 A の発現は誘導されなかったが、DOX を添加したヒト iPS 細胞では、転写因子 A の発現が誘導されるような Tet-On A ヒト iPS 細胞を複数株作製し、そのうち 1 株を用いて分化誘導を行った。(2) で分化誘導したヒト iPS 細胞由来沿軸中胚葉に DOX を添加した結果、細胞同士が凝集し始め立体的な細胞塊が形成された(図 2)。気管軟骨細胞への分化を評価

するために、RT-PCR 及びアルシアンブルー染色を行った結果、転写因子 A を強制発現させた分化細胞では、Sox5、Sox6、Sox9、コラーゲンタイプ II、コラーゲンタイプ XI 等の軟骨マーカーの発現と軟骨基質が確認された (図 3)。また、免疫染色においても、vimentin、sox9、コラーゲンタイプ II 陽性の細胞が確認された (図 4)。

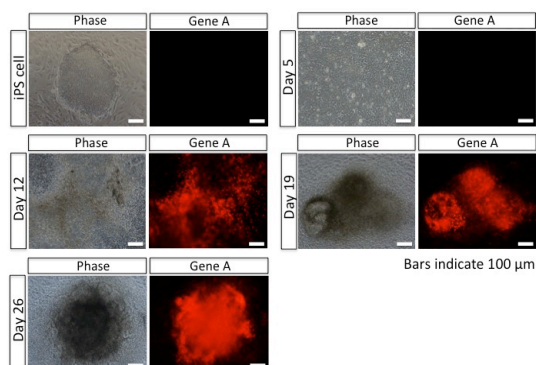


図2 ヒトiPS細胞から気管軟骨細胞への分化誘導

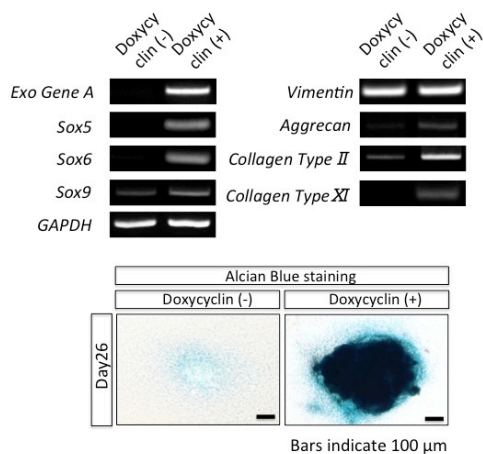


図3 ヒトiPS細胞由来気管軟骨細胞の分化評価 ①

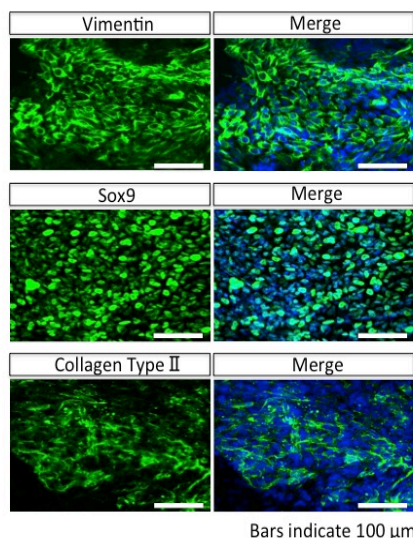


図4 ヒトiPS細胞由来気管軟骨細胞の分化評価 ②

(4) 移植のための足場材料の開発  
アテロコラーゲンに凍結乾燥を施し、移植に適したコラーゲンスポンジを作製した。

(5) 気管軟骨部分欠損モデルラットの作製及びヒト iPS 細胞由来気管軟骨細胞の移植

全身麻酔下にヌードラットの気管を露出させ、電気メスを用いて気管軟骨部分欠損モデルを作製し、ヒト iPS 細胞由来気管軟骨細胞と足場材料であるコラーゲンスポンジを加工して気管欠損部に移植を行った。移植 2 週間後においてもヌードラットの生存が確認されたため、気管欠損部の再生が示唆された。今後、パラフィン切片を作製し、HE 染色や免疫染色で分化細胞の生着や気管欠損部の組織評価を行う予定である。

## 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 2 件)

(1) Susumu Yoshie, Mitsuyoshi Imaizumi, Ryosuke Nakamura, Masakazu Ikeda, Koshi Otsuki, Yukio Nomoto, Ikuo Wada, Koichi Omori. Generation of airway epithelial cells with native characteristics from mouse induced pluripotent stem cells. *Cell and Tissue Research*, 364(2) 319-330, 2016.

(2) Susumu Yoshie, 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 Oto-Laryngologica*, 135(4) 395-401, 2015.

[学会発表] (計 1 件)

(1) 吉江 進、今泉 光雅、池田雅一、中村亮介、Bayu Tirta Dirja、大槻 好史、野本 幸男、和田 郁夫、大森 孝一 「ヒト iPS 細胞を用いた気管軟骨細胞への分化誘導」 第 67 回日本気管食道科学会総会 2016 年 11 月 19, 20 日(福島)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

吉江 進 (YOSHIE, Susumu)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：7070549

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

大森 孝一 (OMORI, Koichi)、挾間 章博  
(HAZAMA, Akihiro)、和田 郁夫 (WADA,  
Ikuo)、今泉 光雅 (IMAIZUMI, Mitsuyoshi)