

## 175. ヒト iPS 細胞を利用した次世代型気管再生技術の開発

吉江 進

\*福島県立医科大学 医学部 耳鼻咽喉科学講座

Key words : iPS 細胞, 分化誘導, 軟骨, 気管, 再生

### 緒言

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、我々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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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。

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞<sup>3)</sup>から分化誘導させた気管軟骨細胞により人工気管の枠組みを形成し、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ことである。

### 方法および結果

#### 1. ヒト iPS 細胞から初期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、初期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%以上の細胞が初期中胚葉マーカー陽性の細胞であった (図1)。

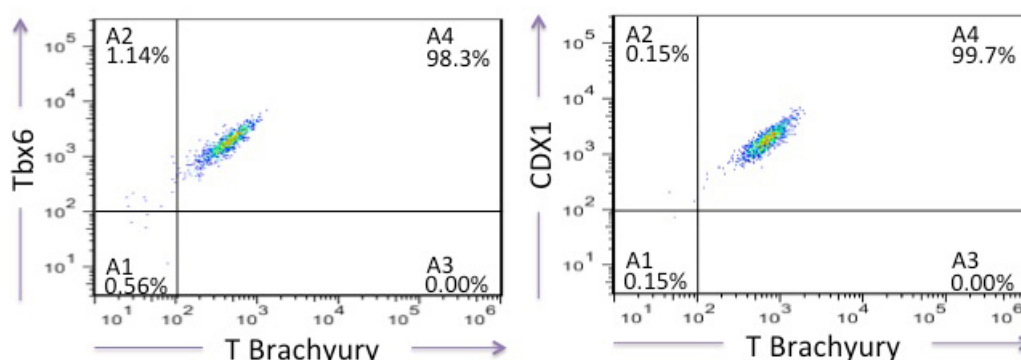


図1. ヒト iPS 細胞由来初期中胚葉の分化評価

低分子化合物と成長因子を組み合わせることによって高い割合で初期中胚葉マーカー陽性細胞を確認することができた。

## 2. ヒト iPS 細胞由来初期中胚葉から気管軟骨細胞への分化誘導

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 *α*-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。1 で分化誘導したヒト iPS 細胞由来初期中胚葉に 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)。

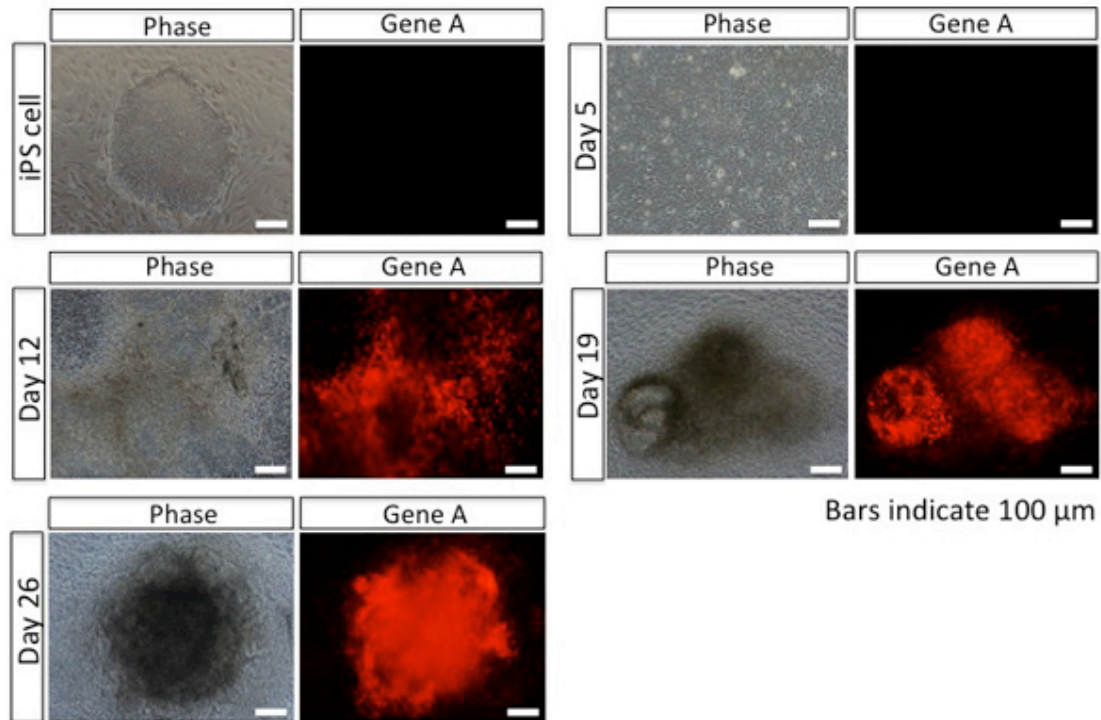


図 2. ヒト iPS 細胞から気管軟骨細胞への分化誘導

軟骨細胞分化に関わる転写因子 A をコンディショナルに発現させることによって立体的な細胞塊が形成された。

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)。

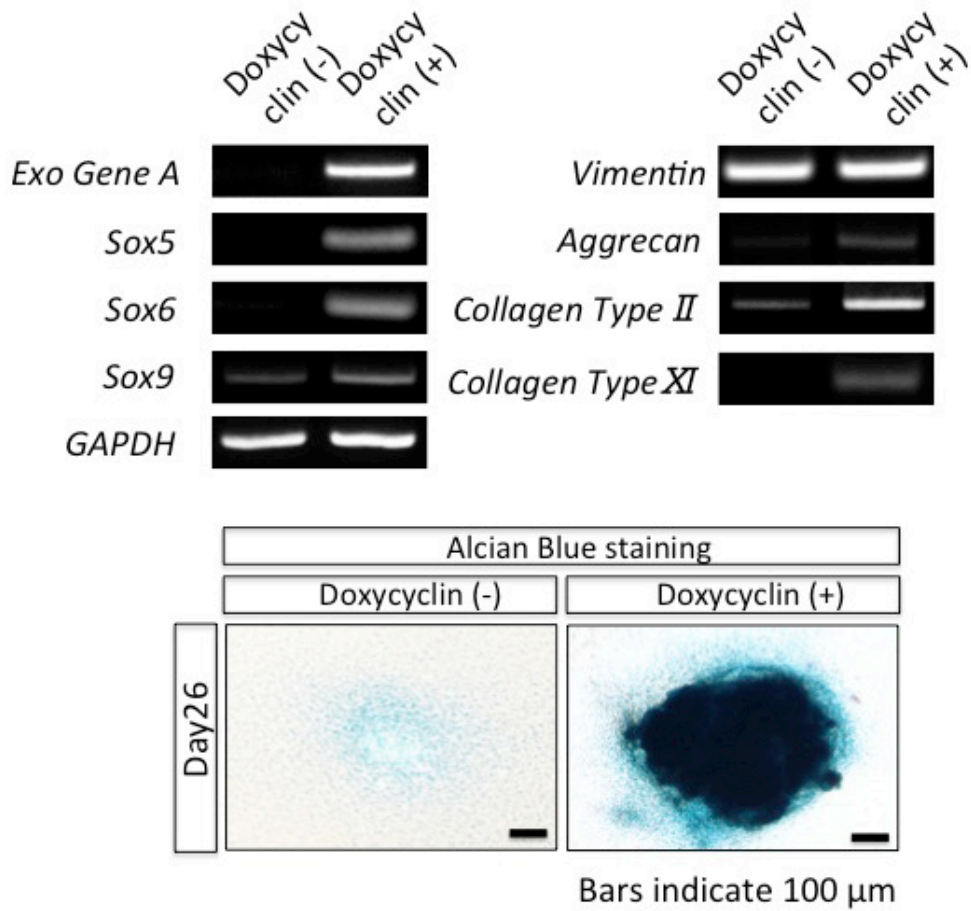


図 3. ヒト iPS 細胞由来気管軟骨細胞の分化評価①

分化誘導 26 日目において軟骨細胞マーカーや軟骨基質が確認された。

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)。

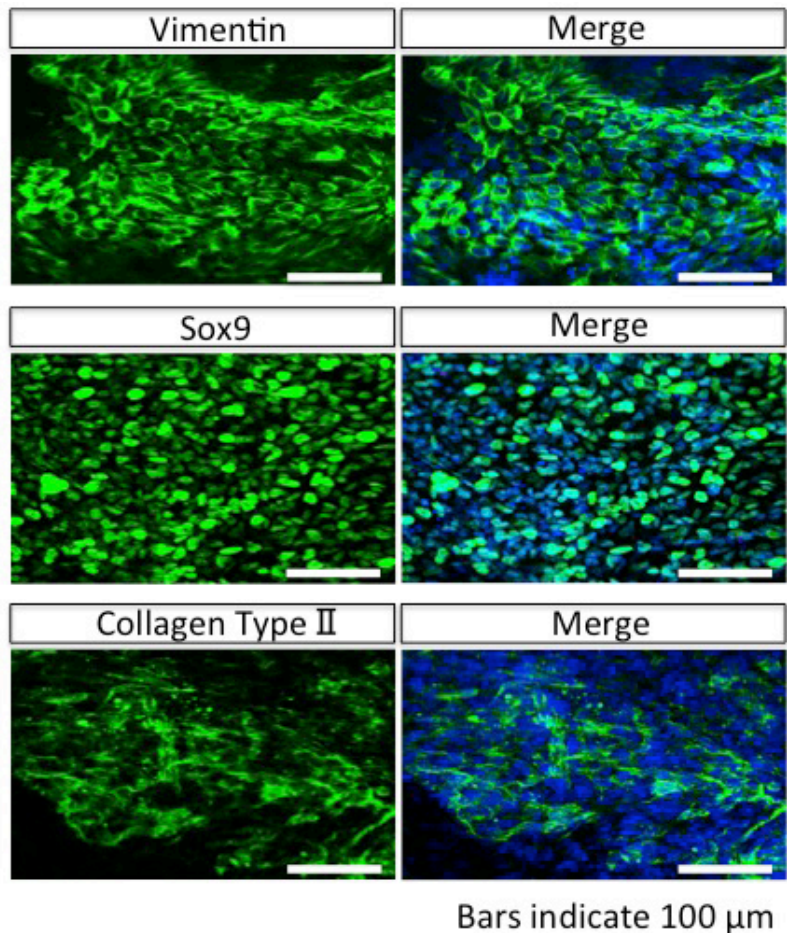


図 4. ヒト iPS 細胞由来気管軟骨細胞の分化評価②

分化誘導 26 日目において軟骨細胞マーカー陽性の細胞を確認することができた。

### 3. 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。

### 4. 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への移植

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。その結果、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。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。

## 考 察

ヒト iPS 細胞に単層培養条件下で成長因子と低分子化合物を組み合わせて添加させた結果、初期中胚葉マーカー陽性細胞を 90%以上確認することができたことから、高効率に初期中胚葉へ分化誘導できることが示唆された。さらに、軟骨細胞分化に関わる転写因子 A を薬剤誘導型発現システムで制御することで軟骨細胞マーカーの発現を確認できたことから、ヒト iPS 細胞から軟骨細胞へ分化誘導できることが示唆された。ヒト iPS 細胞から分化誘導させた気管軟骨細胞により人工気管の枠組みを形成し、生体親和性の高いハイブリット型の人工気管を気管軟骨欠損ヌードラットに移植した結果、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ことから、気管欠損部の再生が示唆された。

本研究を遂行するにあたり、上原記念生命科学財団より助成を賜りましたことを心より感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Nakamura T, Teramachi M, Sekine T, Kawanami R, Fukuda S, Yoshitani M, Toba T, Ueda H, Hori Y, Inoue M, Shigeno K, Taka TN, Liu Y, Tamura N, Shimizu Y. Artificial trachea and long term follow-up in carinal reconstruction in dogs. *Int J Artif Organs*. 2000;23(10):718-24. PMID: 11075903
- 2) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Asato R, Yamashita M, Tanaka S, Magrufov A, Ito J, Shimizu Y. Regenerative medicine of the trachea: the first human case. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005;114(6):429-33. PMID: 16042099
- 3) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72. PMID: 18035408