iPS細胞を用いた喉頭・気管の上皮再生

今 泉 光 雅・大 槻 好 史・大 森 孝 一

Epithelial Regeneration of the Trachea and Larynx with Induced Pluripotent Stem Cells (iPS) Cells

Mitsuyoshi Imaizumi, Koshi Otsuki and Koichi Omori

Reconstruction of the upper airway after the resection of malignancies or stenotic inflammatory lesions is thought to be difficult. Postoperative scarring or granulation with stenosis is sometimes observed. Therefore, the regeneration of the respiratory tract with full functionality is vital after surgical treatment for cancer or inflammatory lesions.

ES cell-like pluripotent cells, also known as induced pluripotent stem (iPS) cells, were generated from mouse skin fibroblasts by the introduction of 4 transcription factors in 2006. These cells are capable of unlimited symmetrical self-renewal, and thus provide an unlimited source of cells for tissue-engineering applications. In addition, the use of iPS cells obtained from patient-derived somatic cells can prevent transplant rejection.

In this paper, using a technique for the differentiation of iPS cells, respiratory epithelium-like tissue was histologically observed, and the ciliary epithelium was immunohistologically confirmed. The transcript expression levels of CK14 were significantly increased in hiPS hVFF cultures. The cellular morphology was clearly cohesive and displayed a degree of nuclear polarity, which was suggestive of epithelial differentiation.

Our results suggest that iPS cells could be a new source cells for use in the regeneration of the tracheal and laryngeal epithelium.

Key words : iPS cell, epithelial regeneration, trachea, larynx

は じ め に

喉頭・気管の悪性腫瘍や炎症, 狭窄疾患の外科的治療後の声帯瘢痕を伴う音声障害や気管欠損部の再建は困難である。声帯瘢痕に対する治療として, 筋膜の移植やステロイド局注治療, 気管欠損部に対する再建方法として, 軟骨や筋肉, 皮膚を材料とした皮弁や用いられているが^{1, 2)}, 瘢痕や肉芽の形成を引き起こし, 十分な結果が得られない症例を経験する。それゆえ, 低侵襲でかつ機能性を保持した, 喉頭・気管の再建は重要である。喉頭・気管の再生医療において, 我々はポリプロピレンを物性的に軟骨に適合するように加工した人工気管を開発し臨床応用に良好な結果を得ている³⁾。半面, 人工材料の半永久的な体内留置が避けられず, また移植した人工材料の気管内腔面の上皮化の遅延が問題として指摘されている³⁾。近年, 組織の修復に際して, 自己細胞や目的とする細胞以外の細胞から分化誘導した細胞を移植するという再生医療研究が試みられているが, 安定した成績は報告されていない。1998年, University of Wisconsin MadisonのDr. James Thomsonがヒト胚性幹細胞(ES細胞)を樹立し, 再生医療への応用が期待されてきたが, 免疫拒絶と倫理的問題が臨床応用を困

難にしていた⁴⁾。2006年, 京都大学の山中伸弥教授らによってマウス人工多能性幹細胞(iPS細胞)が誕生した⁵⁾。iPS細胞は患者由来の細胞を利用できるため, ES細胞と異なり, 免疫拒絶と倫理的問題が回避可能である。加えて多分化能を有するため, 移植医療への利用が期待されている。

本稿ではiPS細胞を用いた喉頭・気管の上皮再生について述べる。

人工多能性幹細胞(iPS細胞)とは

2006年, 京都大学の山中教授らによってマウスiPS細胞が誕生した⁵⁾。iPS細胞は多分化能を有するため, 移植医療への利用が期待されている。ES細胞と異なり, 患者由来の細胞を遺伝子操作して人工的につくるため, 免疫拒絶の問題が回避可能であり, かつ胚やクローン技術を使用しないため倫理的問題が発生しない。しかしながらウイルスベクターを用いて遺伝子を操作していたため腫瘍形成の可能性があり, かつ作成に時間を要する等の問題がある。新たな作製方法として, トランスポゾン⁶⁾の使用⁷⁾, RNAの使用⁸⁾等が開発されている。そのため上記の問題は解決されつつあるが, iPS細胞の作製効率が低下するなどの別の問題が浮上している。

iPS細胞を用いた喉頭・気管の上皮再生研究

気管上皮の再生

マウス iPS 細胞より胚様体を形成させ、更に activin と b-FGF を組み合わせた無血清培地を用いて接着培養を行った。移植した組織内において細胞を可視化するため、蛍光

蛋白をマウス iPS 細胞に導入し、イメージングシステムを用いて確認した。結果、activin と b-FGF を加えた無血清培地では、光学顕微鏡・H-E 染色・免疫染色で線毛上皮様組織が観察された。in vitro および in vivo において蛍光蛋白を発現するマウス iPS 細胞が確認された (図 1)⁹⁾。

声帯上皮の再生

A: In vivo imaging

B: 拡大

C: 摘出組織での評価

図 1 生体における移植細胞の確認

人工材料を Scaffold として、tdTomato でラベルした iPS 細胞を気管欠損部に移植した。

In vivo Imaging System を用いて、動物体内を非侵襲的に観察し、tdTomato の発現が確認された (A, B)

摘出した気管欠損部においても、tdTomato を発現する移植細胞が観察された (C)。

文献 9 より改訂

A: Oct3/4: 未分化細胞のマーカー

B: CK14: 声帯上皮関連蛋白

図 2 声帯上皮細胞への分化誘導

未分化細胞のマーカーである Oct3/4 の発現が、共培養と EGF モデルにおいて有意に減少した (A)。

声帯上皮関連蛋白である CK14 の発現が、共培養モデルにおいて有意に増加した (B)

文献 10 より改訂

ヒト iPS 細胞を HA-hydrogel を Scaffold として、3 種類の環境で培養した。epidermal growth factor (EGF) を加えた環境、声帯由来線維芽細胞と共培養した環境と分化誘導因子を加えない環境で培養し、形態、蛋白、遺伝子レベルで上皮への分化を確認した。声帯上皮への分化が線維芽細胞と共培養した iPS 細胞と、EGF を加えたヒト iPS 細胞において、形態・蛋白・遺伝子レベルで確認された (図 2)¹⁰⁾。

今後の展望

2014 年 9 月、高橋政代医師をプロジェクトリーダーとするチームが、iPS 細胞を用いた臨床研究を初めて実施したことが報道された。腫瘍形成が臨床応用に対する足枷となっていたが、その問題点が解決されつつあることが示唆されたことに他ならない。腫瘍形成を防ぐ方法として、分化誘導を完全に行う、またはフローサイトメーターを用いて、未分化な細胞の割合を評価するだけではなく、ソーティングを行い分化した細胞のみを移植すること、およびウイルスベクターを用いて作成されていない iPS 細胞を利用する、腫瘍を形成しづらいとされる細胞株を利用することが挙げられる。将来の臨床応用に向けた今後の課題として、更なる研究を行っていく予定である。

結 語

iPS 細胞を用いた喉頭・気管の上皮組織の再生医学研究について報告した。

謝 辞

本論文を執筆するに当たり、福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科学講座、博士研究員吉江進先生に厚く御礼申し上げます。

利益相反に該当する事項はない。

参 考 文 献

- 1) Caputo V, Consiglio V : The use of patient's own au-

- ricular cartilage to repair deficiency of the tracheal wall. J Thorac Cardiovasc Surg 41 : 594-596, 1961.
- 2) Cotton RT. Management of subglottic stenosis. : Otolaryngol Clin North Am 33 : 111-130, 2000.
- 3) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S et al : Regenerative medicine of the trachea : the first human case. Ann Otol Rhinol Laryngol 114 : 429-433, 2005.
- 4) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282 : 1145-1147, 1998.
- 5) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126 : 663-676, 2006.
- 6) Woltjen K, Michael IP, Mohseni P et al : PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Nature 458 : 766-770, 2009.
- 7) Zhou H, Wu S, Joo JY et al : Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. Cell Stem Cell 4 : 381-384, 2009.
- 8) Warren L, Manos PD, Ahfeldt T et al : Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. Cell Stem Cell 7 : 618-630, 2010.
- 9) Yoshie S, Ikeda M, Imaizumi M et al : Visualization of mouse induced pluripotent stem cells for evaluation of tracheal regeneration. Acta Otolaryngol 135 : 395-401, 2015. Epub 2015 Mar 6.
- 10) Imaizumi M, Sato Y, Yang DT et al : In vitro epithelial differentiation of human induced pluripotent stem cells for vocal fold tissue engineering. Ann Otol Rhinol Laryngol 122 : 737-747, 2013.

別刷請求先 〒 960-1295 福島県福島市光が丘 1
福島県立医科大学耳鼻咽喉科学講座

今泉光雅