

平成27年 9月8日

日本音声言語医学会理事長 殿

所属施設・部局 福島県立医科大学・耳鼻咽喉科

申請者(代表者) 今泉光雅 (署名・捺印)

所属部局責任者 大森孝一 (署名・捺印)

## 研究報告書

プロジェクトの名称：ヒトiPS細胞を用いた喉頭組織再生に関する研究

1. 実施結果の概要（800字程度：なお，その中に本経費で購入した機器・消耗品等が，どのように研究に活用されたのかを簡潔に記入する。）

喉頭組織の再生に有用な移植材料、および移植細胞・組織の実用化に向けて研究を行う。生体適合性のInjectableなゲルを骨格とし細胞の進入・生着に適した足場材料（スキャフォールド）を作製、研究した。ヒト声帯の損傷後の再生促進を意図し、ヒトiPS細胞の培養法を確立した。

実績、成果

- ① iPS細胞の培養：ヒトiPS細胞の樹立を世界で初めて成功させたウイスコンシン大学、京都大学よりヒトiPS細胞を入手した。フィーダー細胞上またはフィーダー細胞フリーでの状態で培養し、実験に適した培養方法を確認し、十分量のストックの確保に成功した。
- ② 足場材料の開発：上皮再生を行う上で最適な条件を探索し、生体適合性のInjectableなゲルを入手した。
- ③ iPS細胞の声帯上皮への分化誘導技術の開発：  
純化したiPS細胞をゲル内に包埋し、三次元培養方法を確認した。三次元培養方法以外にも、単層培養や声帯由来の線維芽細胞等と共培養して培養皿上でも、分化誘導し、比較検討を試みた。ゲルへのEGFなどの増殖因子添加などによりiPS細胞の分化を誘導し、上皮形成を図り、得られた組織片の組織像、蛋白質や遺伝子の発現に関して評価を行い発現が確認された。

2014年9月、高橋政代医師をプロジェクトリーダーとする理化学研究所チームらが、患者由来のiPS細胞から作製した網膜の細胞を「加齢黄斑変性」の患者に移植したことが報道されたが、2例目に移植する際、iPS細胞の腫瘍化の危険性が高く、移植が中止された経緯

がある。そのため、より適切なiPS細の作成方法、分化誘導方法が重要であり、情報収集に時間を割くべきと考え、結果として本経費は学会参加・研修費の主に使用された。

## 2. 本研究に関わる将来展望

### (1) 研究成果とそのインパクト (A4用紙に2~3枚程度)

音声障害の生涯における罹患率は約30%とされており、個人のQOL(人生の質)のみならず、音声障害に伴う社会的・経済的損失に関しても報告されている。声帯癒痕に伴う音声障害は、喉頭の術後や炎症、外傷後に形成され、癒痕の形成に伴い声帯粘膜の振動が阻害され、その結果音声障害が生じる。声帯の癒痕に対する治療は、ステロイド薬や成長因子の注入、種々の細胞や物質、組織片の移植などが試みられているが、現在まで決定的な治療法がないのが実情である。

細胞治療の中でも、最も期待されているのが幹細胞治療である。通常分化した体細胞と比較し、幹細胞は分化能や増殖能に優れ、血液内科領域や整形外科領域等ですでに臨床応用され、通常体細胞や組織の移植では得られない利点が報告されている。しかしながら、現在まで幹細胞を用いた声帯の治療に関する臨床研究は報告されていない。

我々の研究グループは、マウスiPS細胞を用いた気管の再生研究を行い、*in vitro*、*in vivo*の実験にて良好な結果を得ている。無限の増殖能や分化能をもち、患者本人の細胞から作製可能なiPS細胞は、移植医療において大きな問題となる組織の拒絶も原則認めないとされ、再生医療において理想的な細胞といえる。ヒトiPS細胞が臨床応用可能となれば、音声障害を有する労働者の人口を減少させることが可能であり、より豊かな社会生活に貢献できることが期待される。

本研究の対象である声帯上皮は声帯の重要な構成要素であるが、声帯組織再生に対するiPS細胞を利用した研究は不十分であるのが現状である。ヒトの声帯が疾患等により損傷したときに、その修復に幹細胞等を用いた再生医療技術を適用することは、その後のヒトが生活の質(QOL)を落とさずに暮らしていくために必要な技術であることは言を待たない。幹細胞のソースとしては、骨髄由来間葉系幹細胞、脂肪由来間葉系幹細胞、胚性幹細胞等が存在するが、これらの細胞は増殖能や分化能に限りがある、または倫理的問題がある、移植時に拒絶反応が予想される等、理想的な幹細胞とは言えない。2006年にマウス人工多能生幹細胞(iPS細胞)が京都大学山中教授によって開発され、2007年にヒトiPS細胞が、京都大学山中教授およびウイスコンシン大学トムソン教授らによって誕生した。iPS細胞は増殖能や分化能に限りがなく、倫理的問題や移植時の拒絶反応を認めないことより、前述の問題点を解決する可能性が極めて大きい。マウスiPS細胞に関しては研究が進んでいるが、臨床応用の実用化に向けて、ヒトiPS細胞の研究開発が急務である。

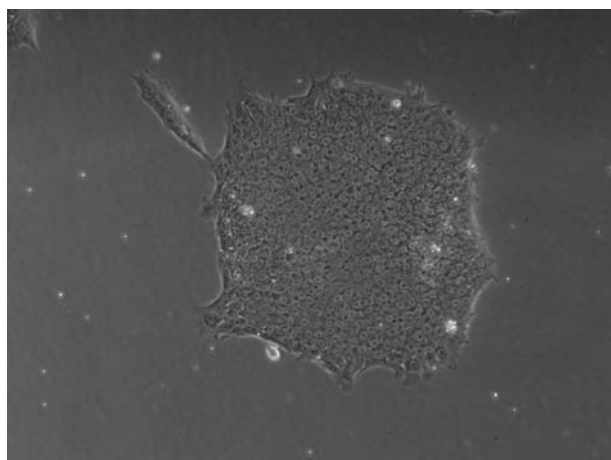
2014年9月、高橋政代医師をプロジェクトリーダーとする理化学研究所チームらが、患者由来のiPS細胞から作製した網膜の細胞を「加齢黄斑変性」の患者に移植したことが報道された。これはiPS細胞を用いた臨床研究を世界で初めて実施したものであり、細胞移植は今後眼科領域のみではなく、人体のあらゆる部位に応用される可能性を示唆する。

耳鼻咽喉科領域において、内耳再生に関する多能性幹細胞を用いた研究は比較的活発に行われ、ヒトiPS細胞を用いた内耳有毛細胞の再生に関する報告もされている。しかしながら、喉頭再生に関するヒト多能性幹細胞を用いた移植実験は、現在までCedervallらが、2007年に報告したヒトES細胞を用いた動物モデルのみである。ヒト多能性幹細胞の維持培養が困難であること、および分化誘導技術が高度であることより、続報が報告されないまま10年が経過しようとしている。本研究では、倫理面、細胞移植の際の拒絶の問題ともに優れたヒトiPS細胞を用いた移植モデルの研究であり、世界的にも類を見ない独創的な研究であるといえる。そのため、本申請の研究開発が成功し、喉頭の再生技術が確立された暁には、喉頭組織の損傷、特に声帯組織の損傷に伴う音声障害を治療・修復することが可能となり、成長因子の投与、細胞の移植治療等の治療法によっても音声回復が困難である現状においては、新たな治療方法となり得る。

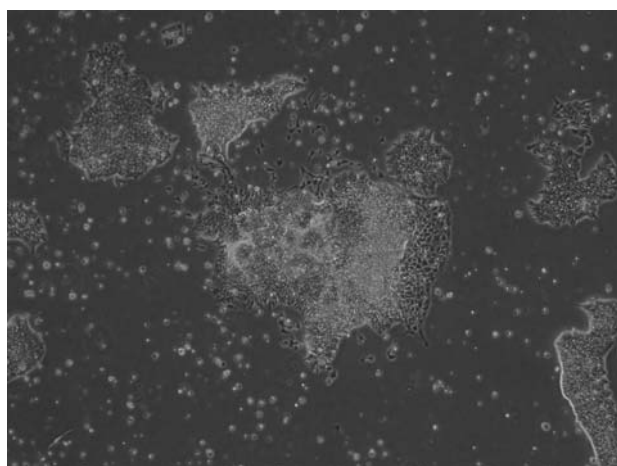
## 研究成果

### ① iPS細胞の培養：

ヒトiPS細胞を入手し、フィーダー細胞上またはフィーダー細胞フリーでの状態で培養に成功した。培養自体が困難であり、失敗に終わることの多い実験系であるが、分化したヒトiPS細胞のコロニーは適宜除去することによって、移植実験に適した培養方法を確立した。



継代培養中のヒトiPS細胞  
分化してしまった部位は認めず、適切に未分化な状態のまま維持培養されている。  
フィーダー細胞フリーでの培養条件  
(継代培養後4日目)



継代培養中のヒトiPS細胞  
iPS細胞が分化してしまい、不均一な形態を示している。培養が困難とされている点であり、毎日観察を行い必要であれば排除する必要がある  
フィーダー細胞フリーでの培養条件  
(継代培養後4日目)

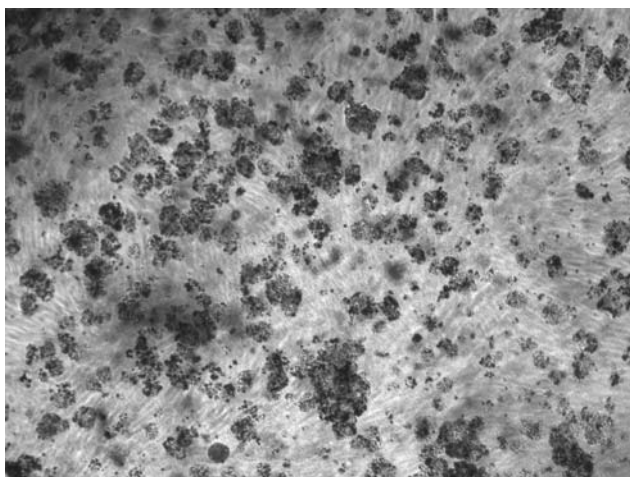
② 足場材料の開発：

上皮再生を行う上で最適な条件を探索し、生体適合性のInjectableなゲルを入手した。実際の分化誘導実験施行前に、ヒトiPS細胞および声帯由来線維芽細胞を、ゲル上およびゲル内に包埋した。三次元的な培養環境で、細胞が生着および増殖するかを確認した。

③ iPS細胞の声帯上皮への分化誘導技術の開発：

純化したiPS細胞を生体適合性のInjectableなゲル内に包埋し、三次元培養方法を確立した。声帯由来の線維芽細胞等と共培養し、分化誘導後比較検討を試みた。更にEpidermal growth factor (EGF) などの増殖因子をゲルへ添加し、よりiPS細胞の分化を効率的に誘導し、上皮形成を促した。

得られた組織片の組織像、蛋白質や遺伝子の発現に関して評価を行った。組織像として、分化誘導を行ったiPS細胞は、上皮の特徴である細胞間同士の接着および極性が確認された。分化誘導を行っていない細胞群では、細胞間同士の接着所見や極性は認められず、組織学的な変化は確認されなかった。



声帯由来線維芽細胞との共培養を試みたヒトiPS細胞細胞塊を形成しているのが、ヒトiPS細胞でその周囲の紡錘状の細胞が線維芽細胞

(2) その他に特記すべきことがありましたら記入ください。

3. 実績発表（発表予定を含む）

代表者・分担者氏名	発表論文名・著者名等（音声言語医学誌の投稿規定に沿った書式でお願いします）（著者名：論文名．雑誌名，巻：頁，年次．）
<p><u>今泉光雅</u></p>	<p>発表論文名</p> <p>iPS細胞を用いた気管・喉頭の再生技術開発．日本気管食道科学会会報，66：123－125，2015</p>
<p>Yoshie Susumu, Ikeda Masakazu, <u>Mitsuyoshi Imaizumi</u>, et al.</p>	<p>Visualization of mouse induced pluripotent stem cells for evaluation of tracheal regeneration. Acta Otolaryngol, 135(4), 395-401, 2015.</p>
<p><u>今泉光雅</u></p>	<p>シンポジウム</p> <p>ヒトiPS細胞を用いた声帯の組織再生．第59回日本音声言語医学会．2014年10月9日～10日</p>
<p><u>今泉光雅</u></p>	<p>パネルディスカッション</p> <p>ヒトiPS細胞を用いた喉頭・気管の再生技術開発．第66回日本気管食道科学会．2014年11月13日～14日</p>