

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・
品質基準の作成

担当責任者 条 昭苑 東京工業大学 生命理工学研究科 教授

研究要旨

今回はヒト-iPS細胞からヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導条件の培養日数や分化培地に加える化合物等について至適化を行ない、分化促進化合物、よい培養条件が得られた。分化途中細胞の表面抗原の解析結果から、途中段階の分化細胞を効率よく濃縮・純化できる方法を新規に見出した。代謝酵素などの成熟マーカーの発現も確認された。今後、今回見出した化合物を利用する分化誘導方法と純化方法を組み合わせて、さらに後の成熟化の培養条件をより適した方法の検討を加えることにより、より高効率、高成熟度の小腸上皮細胞が得られると期待される。

研究協力者

白木伸明 熊本大学 発生医学研究所 准教授
坂野大介 熊本大学 発生医学研究所 助教
山添大士 熊本大学 発生医学研究所 研究員
大垣総一郎 熊本大学医学教育部博士課程1年

縮・純化できる方法を開発することより、今後の分化効率化へ向けての展開を図った。

<倫理面への配慮>

今回の研究は細胞株由来のヒト iPS 細胞を使用し、患者由来のものではないため、倫理面への配慮が特に問題にはならない。

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の作成

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導条件の培養日数や分化培地に加える化合物等について至適化を行なった。分化誘導を促進する化合物、培養条件について検討を行なった。さらに、その条件下でヒト iPS 細胞から得られた途中段階の分化細胞について解析を行い、分化の経路を検証した。さらに、表面抗原の解析結果から、途中段階の分化細胞を効率よく濃

C. 研究結果

C1. ヒト iPS 細胞からの腸への分化誘導方法の最適化を検討したところ、ある化合物を加えることにより、分化誘導の日数の短縮が認められ、腸への分化誘導効率が有意に上昇した。さらに、この化合物を用いて分化誘導した小腸上皮細胞は薬物代謝酵素 Cyp3A4 を発現する細胞に分化することを確認した。

一方、分化の途中段階の細胞について解析を行ったところ、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞マーカーとしては CDX2 が指標とされるが、CDX2+

細胞には SOX17+と SOX17-細胞が存在し、その中でも CDX2+SOX17+細胞が CYP3A4 や MDR1 など を発現する小腸上皮細胞へ分化することを見出した。また CDX2+SOX17-に関しては胎盤の細胞へ分化することを見出した。したがって、これらの結果から、CDX2 というマーカー単独だけでは、真の小腸上皮とは言えないことが明らかになった。CDX2 と同時に SOX17 を評価に使用し、CDX2+SOX17+細胞を指標として評価すれば、真の小腸上皮細胞であるといえる。

さらに、簡易的濃縮方法の検討を行った。様々な細胞外マトリクスの上に継代し、分化細胞の接着効率、濃縮度について検討を行なった。

その結果、ある細胞外マトリクスを用いることにより CDX2+SOX17+細胞を特異的に濃縮することが可能であることを新規に見出した。なお、この細胞外マトリクスの受容体がマウス胚で特異的に小腸上皮に発現していることを見出し、生理的に意味がある現象であることが裏付けられた。また、今回の方法により分化誘導して得られた小腸上皮細胞から、Cyp3A4 陽性の細胞が得られ、このことから、分化誘導方法が適切であることを裏付けられた。

なお、今年度はトランスウエルでの培養方法も試したが、引き続き、次年度さらに検討する予定である。

D. 考察

これまでの分化の指標では胎盤細胞への分化も同時に観察しており、新たなマーカーを指標にすることでより特異的に小腸上皮細胞への分化誘導を行える。また CDX2+SOX17+細胞の濃縮を簡便に行えることから今後の分化誘導をより効率的に行える。またあるインテグリンが小腸上皮細胞特異的に発現しており、分化メカニズムの解析も今後大きく進展すると期待さ

れる。

E. 結論

今回の研究の結果により、真の小腸上皮細胞のマーカーを同定し、それを利用して、分化誘導して得られた小腸上皮細胞の簡易的濃縮方法の確立を行った。また、分化を促進する化合物を得て、これを利用して分化の加速化、高効率化に成功した。今後はこれらの成果をさらに応用して、分化成熟度の高い小腸上皮細胞の作成へ向けて展開出来ると期待される。

F. 健康危機情報

該当なし。

G. 研究発表等

論文発表等

- 1) Tsuyama T, Shiraki N, Kume S. “Definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells combined with selective elimination of undifferentiated cells by methionine deprivation”, *Human Embryonic Stem Cells, 3rd Edition (Springer's Protocols On Line series)* (Edited by Kursad Turksen), *in press*
- 2) Umeda K, Shiraki N, Kume S, Hepatic differentiation from human iPS cells using M15 cells, in “iPS Cells: Generation Characterization and Differentiation –Methods and Protocols” *Methods Mol Biol.* 2014 [Epub ahead of print]
- 3) Yamazoe T, Shiraki N, Kume S, Hepatic differentiation from murine and human iPS cells using nanofiber scaffolds, *Methods Mol Biol.* 2014 Nov 20. Epub. in “ES Cells: Methods and Protocols- 2nd Edition” [Epub ahead of print]
- 4) Shiraki N, Ogaki S, Kume S*. Profiling of embryonic stem cell differentiation. *Rev Diabet Stud.* 11(1):102-14, 2014.

- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 白木伸明 桑昭苑 「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』 医学のあゆみ」251, 1153-1159, 2014 . （長船健二 編集）
- 8) 坂野大介 桑昭苑 「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 器官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
- 9) 白木伸明 桑昭苑 「メチオニンの代謝はヒトの ES 細胞および iPS 細胞の未分化維持および分化を制御している」First Author's <http://first.lifesciencedb.jp/archives/8655>

学会発表等

- 1) 白木伸明 「ヒト iPS 細胞から効率的かつ安定に肝臓を分化誘導する方法の開発」第 11 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム 『ヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現に向けて』 日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会（H26. 12. 9. 東京）
- 2) 白木伸明 『幹細胞から様々な機能細胞を分化誘導する試み』ワークショップ（原孝彦・桑昭苑オーガナイザー）第 37 回日本分子生物学会（H.26. 11. 26 横浜）
- 3) 津山 友徳、白木 伸明、白木 恭子、小幡 史明、三浦 正幸、桑 和彦、遠藤 文夫、桑 昭苑、「ヒト多能性幹細胞における S-アデノシルメチオニンの重要性」“S-adenosyl methionine is crucial for maintaining human pluripotent stem cells” 第 37 回日本分子生物学会（H.26. 11. 26 横浜）
- 4) Ogaki S., Morooka M, Otera K and Kume S. “A cost effective intestinal epithelial differentiation system from human iPS cells”. Key Forum, Kumamoto 2014, 9,5.
- 5) Tsuyama T, Shiraki N, Kume S. “S-adenosyl methionine is crucial for maintaining human ES/iPS cells” Key Forum, Kumamoto 2014, 9,5.
- 6) Otera K, Ogaki S, Kume S. “Easy purification of human iPSC-derived immature intestinal epithelial cells.” Key Forum, Kumamoto 2014, 9, 5.
- 7) 桑昭苑 「多能性幹細胞から消化器官を創る」New Insights of Molecular Genetics on Growth Disorders 平成 26 年 7 月 12 日（東京）
- 8) Shoen Kume Chemical genetic identification of signals that control late-stage pancreatic beta cell differentiation. “Diabetes” session. ISSCR, 2014, June 20. Oral presentation (Vancouver)
- 9) Kume S “Signals that control differentiation of pluripotent stem cells into pancreatic beta cells” (Organizer, Erdal Karaoz) Tissue Engineering Regenerative Medicine International Society (TERMIS-EU 2014; Genova, June 10-13,2014)
- 10) 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. 第 12 回幹細胞シンポ

ジウム 福岡 (12th SCRS-Fukuoka) May 30-31,
2014.

報道発表等

- 1) TOP STORY として論文の紹介 ESC & iPSC
News 9.25 July 2, 2014 Web ニュース
<http://s1832.t.en25.com/e/es.aspx?s=1832&e=123108&elq=ceb3aa38f4034b5d8ab46b1081cf4f3f>
- 2) 科学新聞「ヒト iPS / ES 細胞 メチオニン除去培養液で効率的に分化」2014. 4.25
- 3) 熊本日日新聞「ヒト iPS、ES 細胞効率分化 熊本大研究所グループ メチオニン除去培養液を使用」2014. 4.23.
- 4) 朝日新聞 (熊本版)(生活面) 『熊本大・白木助教と糸教授 アミノ酸組成着目「簡便な方法」発見』2014. 4.19.
- 5) 朝日新聞全国版「万能細胞培養の効率アップ 熊本大などのチームが発見」2014. 4.18.
- 6) 日経産業新聞「iPS・ES 細胞分化防ぐ ヒトのアミノ酸発見 熊本大・東大」2014. 4.18.
- 7) 読売新聞熊本版「iPS 分化、効率的に 熊大研究者ら成功 アミノ酸の働きで」2014. 4.18.
- 8) NHK ニュース 2014. 4.18. 6時 55 分
- 9) KKT テレビタミン 2014. 4.18.18時 20分
- 10) RKK 夕方いちばん 2014. 4.18. 18時 19分

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 糸 昭苑、遠藤文夫、白木伸明、白木恭子、糸 和彦、馬渡一徳「アミノ酸組成変更培地を用いた幹細胞の分化促進方法、及び該方法を用いて処理された幹細胞、並びに培地」特願 2014-32068 出願日：2014 年 9 月 10 日

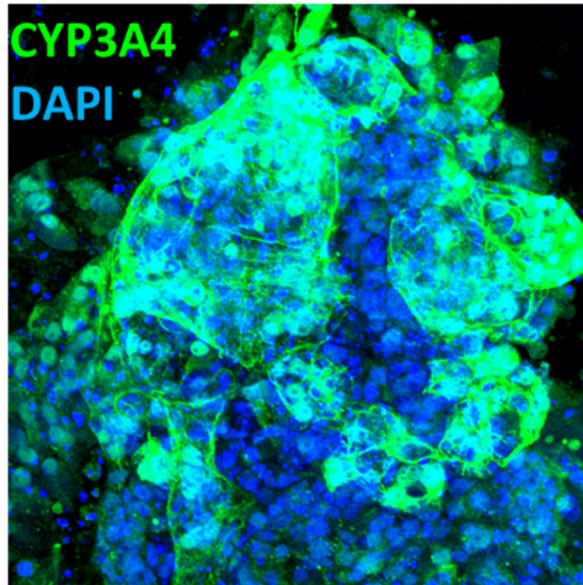


図 分化小腸上皮細胞から、薬物代謝酵素 CYP3A4 の発現を確認した。
今後は機能についても確認予定である。