

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）
委託業務成果究報告書（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 梅澤明弘 国立成育医療研究センター研究所 再生医療センター長

研究要旨

医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」において経口投与では腸管上皮での薬物による酵素誘導の影響を考慮することが求められている。本研究では、薬物代謝酵素・トランスポーター等の薬物誘導性評価試験に対応する腸管上皮細胞作製系の開発研究を行った。ヒト iPS 細胞を用いた分化誘導系において腸管細胞マーカーである CDX-2 陽性を認めた。今後は、ヒト小腸上皮における薬物代謝酵素等の誘導が担保できる in vitro 試験系構築を目指し、腸管組織機能を有する分化誘導体作製系の開発と細胞性質の評価を進めていく。

研究協力者

阿久津英憲 国立成育医療研究センター研究所
生殖医療研究部部长

A. 研究目的

腸管組織はヒト臓器の中でも複雑な構造、機能を有する臓器であり、ヒト多能性幹細胞からの分化誘導は容易ではない。しかし、多能性幹細胞の応用は腸管組織細胞の供給を無尽蔵に、しかも体性組織検体を用いるよりも均一性質として品質管理に優れることが想定される。本研究では、薬物代謝酵素・トランスポーター等の薬物誘導性評価試験を行うことが可能となるヒト腸管上皮細胞分化誘導系の開発を行って行く。

B. 研究方法

ヒト胎児肺線維芽細胞（MRC5）由来ヒト iPS 細胞^{1), 2)}を用いて腸管組織への分化誘導研究を行

った。良好に未分化維持された MRC5-iPS 細胞を用いて無血清下で分化誘導を行った。分科誘導体の評価として、組織学的評価としてヘマトキシリン・エオジン染色を行った。加えて、腸管細胞マーカーである CDX-2 および E-CADHERIN 抗体を用いて免疫組織染色を行いタンパク質レベルでの発現動態を評価した。

参考文献

- 1) Nishino K, et al. Plos one 2010.
- 2) Toyoda M, et al. Genes Cells 2011.

<倫理面への配慮>

本研究についてヒト試料を用いてゲノム解析を行う研究の実施に際しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に、および当機関で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行する。

C. 研究結果

MRC5-iPS細胞は外胚葉・内胚葉・中胚葉の3胚葉組織へ分化することが確認されている。良好に未分化維持されたMRC5-iPS細胞を平面培養系において無血清培地により分化誘導を行った。その分化誘導体に対してヘマトキシリン・エオジン染色を行ったところ腸管上皮様構造を確認した。その固定標本に対して腸管細胞マーカーであるCDX-2抗体を用いて免疫組織染色を行った結果腸管上皮様構造にCDX-2陽性細胞が認められた(図1)。同様にE-CADHERINも陽性となり腸管上皮様組織構造をとることが示唆された。

D. 考察

生体内腸管組織は粘膜層、粘膜下層、筋層、漿膜下組織、漿膜に分かれており、吸収、免疫、蠕動といった複雑な機能を有する臓器である。腸管組織は、発生・分化・機能において複雑な器官であるが、経口薬物代謝評価系構築のためにはその分化誘導系の構築は重要である。今年度は、ヒトiPS細胞からの腸管様構造体の作製に成功したが、次年度以降で引き続き分化誘導系開発と分化誘導体の評価をさらに行う必要がある。

E. 結論

発生学および組織構造学にも複雑な臓器であるヒト腸管様構造体をヒトiPS細胞から作製することに成功した。今後は、経口薬物代謝評価系に資する観点から分化誘導系およびその作製体についてさらに知見を得る必要がある。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表等

論文発表等

- 1) Lu S, Kanekura K, Hara T, Mahadevan J, Spears LD, Osowski CM, Martinez R, Yamazaki-Inoue M, Toyoda M, Neilson A, Blanner P, Brown CM, Semenkovich CF, Marshall BA, Hershey T, Umezawa A, Greer PA, Urano F.: A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2014; 111: E5292-5301.
- 2) Higuchi A, Ling QD, Kumar SS, Munusamy MA, Alarfaj AA, Chang Y, Kao SH, Lin KC, Wang HC, Umezawa A.: Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material. *Lab Invest.*, 2015; 95: 26-42.
- 3) Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y.: A novel in vitro method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One.*, 2014; 9: e110496.
- 4) Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N.: A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples. *Lab Invest.*, 2015; 95: 4-13.
- 5) Fukawatase Y, Toyoda M, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Higuchi A, Takubo K, Umezawa A.: Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability. *Sci Rep.*, 2014; 4: 5421.
- 6) Inoue T, Umezawa A, Takenaka T, Suzuki H, Okada H.: The contribution of epithelial-mesenchymal transition to

renal fibrosis differs among kidney disease models. *Kidney Int.*, 2015; 87: 233-238.

- 7) Ichida JK, TCW J, Williams LA, Carter AC, Shi Y, Moura MT, Ziller M, Singh S, Amabile G, Bock C, Umezawa A, Rubin LL, Bradner JE, Akutsu H, Meissner A, Eggan K.: Notch inhibition allows oncogene-independent generation of iPS cells. *Nat Chem Biol.*, 2014; 10: 632-639.
- 8) Toyoda M, Umezawa A.: Stem cells bond our organs/tissues and engineering products. *Circ J.*, 2014; 78: 1582-1583.

学会発表等

- 1) 三木卓也, 脇谷晶一, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 西野 光一郎.: ヒト iPS 細胞の状態遷移における DNA メチル化可変領域の解析 (DNA methylation kinetics in the state transition of human iPS cells). 第 8 回日本エピジェネティクス研究会 (2014.5, 東京).
- 2) Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Tamoto R, Umezawa A, Akutsu H.: Generation of committed neural progenitors from human fibroblasts by defined factors. 12th Annual Meeting of ISSCR (2014.6, Vancouver, Canada).

報道発表等

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

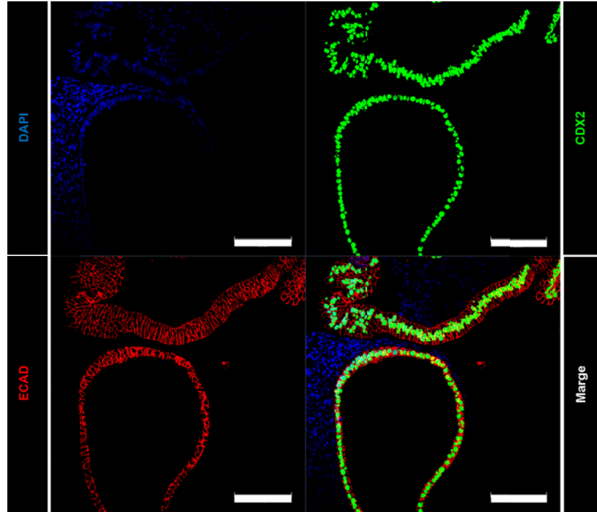


図1 ヒト iPS 細胞由来分化誘導体免疫組織染色
CDX-2 (緑) と E-CADHERIN (赤) が腸管上皮様
組織構造体に陽性である。細胞核 (DAPI ; 青)。
スケールバーは 100 μ m