

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15328

研究課題名(和文)腎コロボーマ症候群特異的iPS細胞による腎臓病の病態解明

研究課題名(英文)Pathophysiological analysis using iPS cells from patient with Renal Coloboma syndrome

研究代表者

古市 賢吾 (FURUICHI, KENGO)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：50432125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、稀少遺伝性疾患である、PAX2遺伝子変異を伴った腎コロボーマ症候群から疾患特異iPS細胞を樹立し、本症候群の病態解明、治療法開発および薬剤スクリーニングシステムを構築するものである。

PAX2遺伝子変異を伴った3例の腎コロボーマ症候群症例の血球細胞からiPS細胞およびコントロールの健常日本人由来iPS細胞から中間中胚葉および尿細管などの腎系譜細胞への誘導を確立した。また、腎系譜細胞へ誘導された経時的なサンプルから、候補遺伝子に対する経時的発現遺伝子解析を行い、PAX2の遺伝子発現と呼応して発現増強し、疾患特異iPS細胞で発現増強の低減が見られる因子群を確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established disease-specific iPS cells from renal coloboma syndrome with PAX2 gene mutation, which is a rare genetic disorder. To clarify the pathogenesis of this syndrome, we used these iPS cells. The cells were also used to investigate therapeutic target genes.

We induced kidney lineage cells, such as mesoderm and renal tubules, from disease-specific and control iPS cells. In addition, time-sequential expression gene analysis was performed. Some gene expressions were enhanced in response to gene expression of PAX2, and some candidate genes in which expression was reduced in disease specific iPS cells was detected.

研究分野：腎臓病

キーワード：PAX2 腎コロボーマ症候群

1. 研究開始当初の背景

疾患特異的 iPS 細胞は疾患の病態解明、新規薬剤の開発など幅広い可能性を持つ。本研究を支える背景は次の二点であった。

(1) 腎コロボーマ症候群はヒト胎生期の腎発生に関わる PAX2 遺伝子異常による疾患である；腎コロボーマ症候群は腎不全に至ることもある腎障害および視力障害を主体とする疾患である。本疾患は、非常に稀少な症候群である (Hum Mutat. 2012;33:457-66)。我々はこれまで、26 例の臨床的に腎コロボーマ症候群と診断した症例を集積し、その遺伝子診断法を確立していた (Nephron. 1989;51:115-8, Am J Ophthalmol. 2005;139:203-5)。またその遺伝解析の結果、この稀少な疾患の責任遺伝子とされる PAX2 の変異が明らかとなった 11 例の症例を集積していた。このうち 4 つの変異はこれまでに報告の無い新規の変異であった。従って、本研究でしか作製し得ない新規の変異を含んだ複数の疾患特異的 iPS 細胞を作製し、腎系譜細胞に分化させる事ができる条件を整えていた。

また、PAX2 遺伝子は成体ではその発現が一旦消失するが、腎障害後に再活性化する事を確認していた。我々は、この事を動物実験で確認するとともに、急性腎障害後の修復や慢性腎障害における腎障害進展への関与について検討を進めていた。

このように、腎コロボーマ症候群の疾患特異的 iPS 細胞を用いて、稀少な遺伝性疾患と後天的な腎疾患に共通な障害機序を PAX2 遺伝子と言う視点から解明する貴重で希少な機会を有する状況と考えた。

2. 研究の目的

PAX2 遺伝子は、胎生期の腎発生に重要な遺伝子である。腎コロボーマ症候群も腎発生段階の異常が病態の基本と考えられるが、ヒトの胎生期の異常を検討する事は通常的手法では不可能である。本研究は、通常評価不可能なヒト胎児期の腎発生に関連する疾患の病態機序解明に、疾患特異的 iPS 細胞を用いて迫るプロジェクトであった。腎疾患における疾患特異的 iPS 細胞の研究は、他臓器に比べて検討が少なく新規性、チャレンジ性の高い分野であると考えた。

同時に、標的となる PAX2 遺伝子は、成体では一旦発現しなくなる。しかし、その PAX2 遺伝子は、虚血などの腎臓へのストレス後に尿細管上皮細胞において再活性化し、腎障害の進展に関与する事を示唆するデータを得ていた。我々はこれまで、腎障害の進展には、尿細管上皮細胞が発現するケモカイン・サイトカインが重要な役割を果たしている事を示していた。転写調節因子である Pax2 とこれら炎症関連分子との関連を示す報告は現時点では無いが、これまでの動物実験、細胞実験などの予備実験から相互に関連している可能性のある機序と考えた。この様な我々

独自の視点に立った斬新なアイデアは、本疾患特異的 iPS 細胞の研究を稀少な疾患の病態解明だけでなく、広く腎臓病共通の腎障害進展・修復機序解明につながる研究へと発展させ、腎臓病共通の障害進展や修復機序の解明に重要と考えた。

本研究結果は、現在治療法が無い稀少な遺伝性疾患の病態解明および治療を目指すものであり、本疾患症例に希望の光を与えるものであると考えられた。さらに、本研究で得られた成果の恩恵は、限られた遺伝背景を持った症例だけでなく、現在 30 万人を超え、年間一兆円を超える医療費が必要な末期腎不全症例やその背景に存在する 1 千万人を超える慢性腎臓病症例の腎障害進展機序の解明や新規治療法開発にも道を開くものであると考えられた。その効果は、各症例に対する医学的なものだけでなく、社会的、医療経済的にも大きな効果を与える事が期待された。

3. 研究の方法

本研究では、我々が診断した PAX2 遺伝子変異を伴った 3 例の腎コロボーマ症候群症例の血球細胞から iPS 細胞を作製して、腎尿細管上皮細胞に分化誘導す計画とした (Osafune K, Nat Commun. 2013;4:1367)。尿細管上皮細胞は、急性腎障害後の修復や、慢性腎障害の間質線維化に重要な細胞であると共に、創薬における標的でもある。そこで、本遺伝子変異を伴った iPS 細胞から分化誘導した尿細管上皮細胞およびその誘導系を用いて、腎コロボーマ症候群の特異的病態および発症進展機序解明、慢性腎臓病および急性腎障害での障害進展・修復機構の解明、および創薬スクリーニングに供する事が可能な評価系を作製する事を計画した。

疾患特異的 iPS 細胞作製と腎系譜細胞への誘導は次の様な計画を立てた。腎コロボーマ症候群症例の末梢血細胞を用いて iPS 細胞を樹立する計画とした。iPS 細胞樹立は、これまでの実績のある京都大学 iPS 細胞研究所にて行う事とした。樹立には、患者由来の末梢血 T 細胞にエピソーマルベクターを用いて初期化因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, p53 shRNA の 6 因子) を導入し iPS 細胞を作製する計画を立案した。iPS 細胞株の樹立評価は、導入因子のゲノム integration の確認、OCT3/4 や NANOG などの未分化マーカーの発現、胚様体形成法による三胚葉への分化能の評価、中間中胚葉および尿細管などの腎系譜細胞への分化誘導効率、核型解析などの各ステップにて行う計画とした。

腎コロボーマ症候群は、胎生期に腎低形成を含めた形成異常を起こす。本症候群では、腎の形態異常や腎障害の程度が症例毎に異なる。我々は新規異常も含めた異なる 3 例の PAX2 遺伝子変異を伴う症例から iPS 細胞を樹立する計画であった。本研究では、これら疾

患特異的 iPS 細胞を用いて通常的手法では検討困難な、本症候群ヒト胎生期における腎障害機序を、発生過程をシャーレ上で再現する事により遺伝子変異部位の違いが与える影響も合わせて検討する計画とした。

樹立した腎コロボーマ症候群特異的 iPS 細胞およびコントロールの健常日本人由来 iPS 細胞から中間中胚葉および尿細管などの腎系譜細胞への誘導を行い、3 症例由来およびコントロールの iPS 細胞を用いて中間中胚葉および尿細管などの腎系譜細胞への誘導後に発現する遺伝子発現変化を検討する計画とした。

PAX2 遺伝子は、成体では一旦発現が消失する。しかし、虚血障害などのストレスで発現が再活性化する事を確認している。そこで、腎系譜細胞へ分化誘導した腎コロボーマ症候群特異的 iPS 細胞あるいはコントロール iPS 細胞を種々のストレスに暴露し PAX2 遺伝子の発現増強や発現分子の違いについても検討する計画とした。

さらに、薬剤の薬効評価のスクリーニングには、上記の実験で同定される PAX2 遺伝子関連の分子を指標にすれば可能と考えた。この系は直接ヒト細胞を用いた薬剤スクリーニング系であることが薬剤開発の面では有利な点であると思われた。そこで、PAX2 遺伝子関連分子のヒト細胞を対象とした測定系を構築し、慢性腎臓病や急性腎障害の治療薬開発の薬剤スクリーニング系を確立する事を計画した。

4. 研究成果

同意の得られた 3 症例の末梢血から腎コロボーマ症候群特異的 iPS 細胞を樹立した。各症例毎に確立された iPS 細胞 20 株について適正株の選別作業を進めた。計画に従い、iPS 細胞株の樹立評価は、導入因子のゲノム integration の確認、OCT3/4 や NANOG などの未分化マーカーの発現、胚様体形成法による三胚葉への分化能の評価、中間中胚葉および尿細管などの腎系譜細胞への分化誘導効率、核型解析などを行った。これらの評価法にて各症例毎に選別された腎コロボーマ症候群患者由来の至適 iPS 細胞株を確立した。

症例毎に選別された腎コロボーマ症候群患者由来の至適 iPS 細胞株およびコントロールの健常日本人由来 iPS 細胞から中間中胚葉および尿細管などの腎系譜細胞への誘導を試みた。腎系譜細胞への誘導は研究分担者と共に、最新の誘導法を導入しながら改訂を繰り返した。初期の誘導法では、疾患特異的 iPS 細胞では、尿細管への誘導効率が低い傾向が認められた。しかしながら、最新の誘導法では、細胞表面マーカーで認められるような誘導効率の差は、いずれの疾患特異的 iPS 細胞でも認めなかった。一方、発現遺伝子に関しては、いくつかの因子に関して、コロボーマ症候群患者由来の至適 iPS 細胞株およびコントロールの健常日本人由来 iPS 細胞との間に

差を認める分子を確認した。また、発現解析に関しては、当初の予定にはなかった CAGE システムによる解析を行う機会を得た。PAX2 は転写因子であり、転写開始点を正確に同定する CAGE の解析システムは本研究に最も有用なシステムであり、今後の発展性も高いと考え、解析を進めた。これらの解析により、転写活性が上昇する因子群の候補をピックアップすることに成功した。PAX2 の遺伝子発現と呼応して発現増強し、疾患特異 iPS 細胞で発現増強の低減が見られる 10 因子に対する検討を進めた。これらの因子には、腎発生や細胞分化に関与している事が報告されている因子も含まれている。また、これまで機能が解明されていない分子も含まれている。

また、発現解析を網羅的に進めるために、PAX2 遺伝子の転写活性に関して、データベース上の検索も進めた。このような手法においても、いくつかの標的候補分子が確認された。網羅的解析結果との照合でより可能性の高い分子の選択を行う事が可能であった。これらの基礎研究を元に、本研究をさらに発展させて、エンハンサー領域解析の可能性についても検討が進んでいる。

腎系譜細胞、特に尿細管上皮細胞への分化に関しては、誘導高率がこの 2 年間で上昇した。また、これらの細胞を flow cytometry にて分離することも可能となった。しかし、尿細管上皮系の細胞を単離・培養するには至っていない。しかし、更なる腎系譜細胞への分化誘導法の開発が世界的に進められており、それらの成果が本研究に应用可能となれば、ヒト尿細管上皮細胞をターゲットした薬剤スクリーニングシステムが可能となると思われる。本研究においては、腎系譜細胞に誘導した細胞塊全体での虚血ストレス実験を行った。先に記載した検討でピックアップされた分子群を指標にその影響を評価する評価系は確立できた物と考える。同様の検討は、継代培養可能なマウス尿細管上皮細胞においても確立した。

今回の検討において、病態解明や治療法開発のための基盤システムを確立すると共に、プレリミナリーな解析が可能であることを示した。また、一定レベルまでヒト尿細管上皮細胞を分化誘導する事が可能であり、薬剤評価系の基盤を確立することができた。この様に、本研究課題の目標が達成できた。今後、これら基盤システムを用いて詳細な機序解明プロジェクトをさらに展開していく基礎データを収集する事ができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Furuichi K, Yuzawa Y, Shimizu M, Hara A, Toyama T, Kitamura H, Suzuki Y,

- Sato H, Uesugi N, Ubara Y, Hisano S, Ueda Y, Nishi S, Yokoyama H, Nishino T, Kohagura K, Ogawa D, Mise K, Shibagaki Y, Kimura K, Haneda M, Makino H, Matsuo S, Wada T. Nationwide multicentre kidney biopsy study of Japanese patients with type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant* Epub ahead of print, 2017 査読有
2. Sakai N, Chun J, Duffield JS, Lagares D, Wada T, Luster AD, Tager AM. Lysophosphatidic acid signaling through its receptor initiates profibrotic epithelial cell fibroblast communication mediated by epithelial cell derived connective tissue growth factor. *Kidney Int* 91(3):628-641, 2017 査読有
 3. Oshima M, Iwata Y, Furuichi K, Sakai N, Shimizu M, Hara A, Kitajima S, Toyama T, Shinozaki Y, Sagara A, Umeda E, Kaneko S, Arai S, Miyazaki T, Wada T. Association of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) expression with urinary protein and kidney dysfunction. *Clin Exp Nephrol* 21(1):35-42, 2017 査読有
 4. Hara A, Furuichi K, Yamahana J, Yasuda H, Iwata Y, Sakai N, Shimizu M, Kaneko S, Wada T. Effect of autoantibodies to erythropoietin receptor in systemic lupus erythematosus with biopsy-proven lupus nephritis. *J Rheumatol* 43(7):1328-2334, 2016 査読有
 5. Okumura T, Furuichi K, Higashide T, Sakurai M, Hashimoto S, Shinozaki Y, Hara A, Iwata Y, Sakai N, Sugiyama K, Kaneko S, Wada T. Association of PAX2 and Other Gene Mutations with the Clinical Manifestations of Renal Coloboma Syndrome. *PLoS One* 10(11):e0142843, 2015 査読有
 6. Toyama T, Furuichi K, Shimizu M, Hara A, Iwata Y, Sakai N, Perkovic V, Kobayashi M, Mano T, Kaneko S, Wada T. Relationship between Serum Uric Acid Levels and Chronic Kidney Disease in a Japanese Cohort with Normal or Mildly Reduced Kidney Function. *PLoS ONE* 10(9):e0137449, 2015 査読有
 7. Komura T, Sakai Y, Harada K, Kawaguchi K, Takabatake H, Kitagawa H, Wada T, Honda M, Ohta T, Nakanuma Y, Kaneko S. Inflammatory Features of Pancreatic Cancer Highlighted by Monocytes/Macrophages and CD4+ T cells with Clinical Impact. *Cancer Sci* 106(6):672-686, 2015 査読有
 8. Iwata Y, Furuichi K, Hashimoto S, Yokota K, Yasuda H, Sakai N, Kitajima S, Toyama T, Shinozaki Y, Sagara A, Matsushima K, Kaneko S, Wada T. Pro-inflammatory/Th1 gene expression shift in high glucose stimulated mesangial cells and tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 443(3):969-974, 2014 査読有
- 〔学会発表〕(計 18 件)
1. 和田隆志: 糖尿病性腎症病期分類: 病理・バイオマーカーへの展望, 第 28 回日本糖尿病性腎症研究会 2016年12月4日 東京
 2. 古市賢吾・和田隆志: 糖尿病性腎症のコホート研究とバイオマーカー, 第 46 回日本腎臓学会西部学術大会 2016年10月14日 宮崎
 3. 和田隆志・原章規・岩田恭宜・古市賢吾: 糖尿病性腎症におけるバイオマーカー: 抗エリスロポエチン受容体抗体の可能性, 第 59 回日本腎臓学会学術総会 2016年6月17日 横浜
 4. 和田隆志: 腎臓病の病態とバイオマーカー探索, 日本薬物動態学会 第 30 回年会 2015年11月12日 東京, 口頭, 招待講演 東京
 5. 古市賢吾・和田隆志: 本邦における糖尿病性腎症研究: 臨床, 病理, バイオマーカーの接点と展開, 第 45 回日本腎臓学会西部学術大会 2015年10月24日 金沢, 口頭, 審査有
 6. Norihiko Sakai, Yasutaka Kamikawa, Akihiro Sagara, Yasuyuki Shinozaki, Shinji Kitajima, Akinori Hara, Yasunori Iwata, Miho Shimizu, Kengo Furuichi, Takashi Wada. LPA-LPA1 Signaling Regulates Fibroblast Proliferation and Myofibroblast Differentiation Dependent on Epithelial Cell-Fibroblast Interaction. *ASN Kidney Week 2015* 2015年11月7日 San Diego, USA, ポスター, 審査有
 7. Takashi Wada. Albuminuria in diabetic nephropathy *Asian Nephrology Conference* 2015年4月26日 Kaohsiung, Taiwan, 口頭, 招待講演
 8. 岩田恭宜・古市賢吾・橋本真一・奥村利矢・山村雄太・和田隆志: 次世代センサーが導くバイオマーカーの開拓, 日本臨床検査自動化学会第 46 回大会 2014年10月10日 神戸, 口頭, 審査有
 9. 古市賢吾・和田隆志: 本邦における糖尿病性腎症のレジストリーと臨床疫学, 第 57 回日本腎臓学会学術総会 2014年7月5日 横浜, 口頭, 審査有
 10. 岩田恭宜・和田隆志: 炎症が妨げる再生, 第 57 回日本腎臓学会学術総会 2014年7月5日 横浜, 口頭, 審査有

11. 和田隆志: 臨床検査の視点からみた腎臓と生体ネットワーク, 第 63 回日本医学検査学会 2014 年 5 月 17 日 新潟, 口頭, 招待講演
12. Haruka Yasuda, Yasunori Iwata, Kengo Furuichi, Shinichi Hashimoto, Norihiko Sakai, Shinji Kitajima, Tadashi Toyama, Yasuyuki Shinozaki, Akihiro Sagara, Takashi Wada. Pro-inflammatory/Th1 gene expression shift in high glucose stimulated mesangial cells and tubular epithelial cells. The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology 2014 年 5 月 15 日 Tokyo, Japan, ポスター, 審査有
13. Kengo Furuichi, Miho Shimizu, Tadashi Toyama, Takashi Wada and The Research Group of Diabetic Nephropathy, Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan. Establishment and impacts of Japan Diabetic Nephropathy Cohort Study (JDNCs). ISN NEXUS SYMPOSIUM 2014 2014 年 4 月 3 日 Bergamo, Italy, ポスター, 審査有
14. 和田隆志: 糖尿病性腎症における炎症の意義とその制御, 第 28 回日本糖尿病合併症学会 2013 年 9 月 13 日 旭川, 口頭, 招待講演
15. 古市賢吾・舟本智章・北島信治・遠山直志・北川清樹・岩田恭宜・清水美保・和田隆志: 糖尿病性腎症レジストリー Japan Diabetic Nephropathy Cohort Study(JDNCs)の集積と展開, 第 28 回日本糖尿病合併症学会 2013 年 9 月 13 日 旭川, 口頭, 審査有
16. 岩田恭宜・橋本真一・横田恭宣・古市賢吾・和田隆志: 高糖刺激下での培養メサンギウム細胞における炎症関連遺伝子発現, 第 56 回日本腎臓学会学術総会 2013 年 5 月 11 日 東京, 口頭, 審査有
17. Yasunori Iwata, Kengo Furuichi, Haruka Yasuda, Norihiko Sakai, Shinji Kitajima, Tadashi Toyama, Yasuyuki Shinozaki, Akihiro Sagara, Takashi Wada. Genome-Wide Profiling of Inflammation Related Genes in High Glucose Stimulated Mesangial Cells and Tubular Epithelial Cells. ASN Kidney Week 2013 2013 年 11 月 7 日 Atlanta, USA, ポスター, 審査有
18. Kengo Furuichi. Regulation of inflammatory transition from acute to chronic kidney disease. ISN World Congress of Nephrology 2013 2013 年 6 月 2 日 Hong Kong, 口頭, 招待講演

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: 腎コロボーマ症候群の遺伝子診断
 発明者: 古市賢吾, 和田隆志
 権利者: 国立大学法人金沢大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2015-063841
 出願年月日: 平成 27 年 3 月 26 日
 国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古市 賢吾 (FURUICHI, Kengo)
 金沢大学・附属病院・准教授
 研究者番号: 50432125

(2) 研究分担者

和田 隆志 (WADA, Takashi)
 金沢大学・医学系・教授
 研究者番号: 40334784

長船 健二 (OSAFUNE, Kenji)
 京都大学・iPS 研究所・教授
 研究者番号: 80502947