

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19453

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞から腎臓に分化しうる原始線条の作製

研究課題名(英文) Induction of human iPS cells to primitive streak that can differentiate into kidney

研究代表者

前 伸一 (Mae, Shin-ichi)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：50749801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓は中間中胚葉から派生する尿管芽と後腎間葉の相互作用によって形成されるが、尿管芽は前方中間中胚葉、後腎間葉は後方中間中胚葉から派生すると考えられている。本研究では、ヒトiPS細胞から後期原始線条を経て、前方中間中胚葉を分化誘導する方法を開発した。さらに、作製した前方中間中胚葉は、ウォルフ管に分化しうる発生生物学的機能を有していた。今後は、尿管芽と後方中間中胚葉に由来する後腎間葉の分化誘導法を確立し、それらの相互作用により腎組織の構築を目指す。

研究成果の概要(英文)：The reciprocal interaction between two renal progenitors, ureteric bud and metanephric mesenchyme, develops the mammalian adult kidney. According to the knowledge of embryonic development, ureteric bud is considered as the anterior intermediate mesoderm (IM) descendant, while the posterior IM contribute to metanephric mesenchyme development. In this study, we establish a stepwise differentiation method for anterior IM from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) following late primitive streak induction. Moreover, these cells have the developmental potential to differentiate into wolffian duct cells. To construct kidney-like structures, we developing the induction protocols to differentiate ureteric bud and posterior IM-derived metanephric mesenchyme.

研究分野：再生医学

キーワード：ヒトiPS細胞 原始線条 腎臓

1. 研究開始当初の背景

近年、マウスやニワトリなどの実験動物を用いて、腎臓発生機構や腎構成細胞に分化しうる前駆細胞の解明が徐々に進展している。我々は、それらの知見に基づいて、ヒト iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) から腎臓を派生させる胎生組織である中間中胚葉を高効率に分化誘導する方法を開発した。さらに、ヒト iPS 細胞由来の中間中胚葉から腎前駆細胞を作製する試みが世界的になされており、試験管内で糸球体や尿細管様構造を含む腎組織を作製するまでに至っている。

このように、ヒト iPS 細胞から腎組織を作製することが可能となりつつあるが、分化誘導因子の組み合わせや処理期間など、ヒト iPS 細胞から腎前駆細胞の作製法がそれぞれの方法で異なっている。細胞株や未分化維持方法が異なっているため、ヒト胚発生を模倣しているにもかかわらず、異なる条件でもヒト iPS 細胞から腎前駆細胞を作製できる原因を説明することは困難である。そこで、ヒト iPS 細胞からの分化誘導における最初の処理が異なっていることに着目し、ヒト iPS 細胞の性質もしくは最初のステップで作製される前駆細胞の違いに、前述の原因を解明する手掛かりがあるのではないかと考えた。

ニワトリ胚発生では、特定期間の原始線条が中間中胚葉に分化しうる機能を有していることが報告されている。従って、ヒト iPS 細胞から特定の因子の組み合わせ処理で、中間中胚葉に分化しうる期間に相当する原始線条細胞が分化誘導され、そこから腎前駆細胞の作製が可能となるのではないかと考えた。また、原始線条細胞は前後軸に沿ってどの位置に存在するのかによって、その後どのような細胞種に分化するのか運命付けられていることも知られている。このことから、過去の報告では、ヒト iPS 細胞から異なる位置情報を持つ原始線条細胞が同時に作製されているため、その割合が腎前駆細胞に分化しうる中間中胚葉への分化誘導効率に反映されているのではないかと予想した。これらの仮説に基づいて、中間中胚葉への分化に特化した胚発生の特定の時期かつ前後軸における特定の位置の原始線条細胞をヒト iPS 細胞から分化誘導することが、急務な課題であるとの着想に至った。そのような分化誘導法を開発することによって、ヒト iPS 細胞から腎前駆細胞の分化誘導効率を向上させるために必要な改善点を明示でき、さらに正しい発生運命を持つ原始線条細胞から作製された細胞でなければ、生体内のものと一致する遺伝子発現や生理機能を獲得できないことを実証できると考える。

2. 研究の目的

発生生物学の知見によると、原始線条で発現するマーカー遺伝子である転写因子 Eomes (Eomesodermin) や Hand1 (Heart and neural crest derivatives expressed transcript 1)

を発現した細胞は、中間中胚葉になる発生運命を持たないことが報告されている。また、13 個のホメオティック (Hox) 遺伝子は一つの染色体上に番号順に並んでおり、その順に原始線条で発現した後、胚の前後軸に沿った組織の形成を司ることが知られている。従って、ヒト iPS 細胞から EOMES や HAND1 を発現せず、腎臓形成に関与する HOX 遺伝子を発現する原始線条細胞を分化誘導することが、時期および位置情報として腎臓への正しい発生運命を与えるために適切なストラテジーであると考えられる。以上の理由により、ヒト iPS 細胞から腎臓への発生運命を持つ原始線条細胞を選択的に分化誘導する方法の確立に重点を置き、高効率に腎前駆細胞に分化しうる中間中胚葉細胞の作製を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 原始線条マーカーの発現を誘導する因子の検証

転写因子 *Brachyury* は胚発生において原始線条で普遍的に発現していることが知られている。また、胚発生において原始線条の形成は増殖因子である *Nodal/Activin*, *Bmp* (Bone morphogenetic protein; 骨形成因子), *Fgf* (Fibroblast growth factor; 線維芽細胞増殖因子) および *Wnt* によって促進され、それらの濃度勾配によって前後軸が決定されている。そこで、それらの因子の濃度、組み合わせ、処理期間を比較検討し、ヒト iPS 細胞から高効率に BRACHYURY 陽性細胞を分化誘導する方法を確立する。その際に、中間中胚葉になる発生運命を持たない原始線条のマーカーである EOMES や HAND1 の発現を誘導する条件も合わせて検討する。

(2) 中間中胚葉に分化しうる原始線条の作製

発生生物学の知見から総合的に考察した場合、EOMES や HAND1 陰性の原始線条細胞から派生する組織は、中間中胚葉もしくは骨や筋肉が派生する沿軸中胚葉のいずれかであることが予想される。

マウス胚発生においてレチノイン酸の働きを示す *RARE* (*retinoic-acid response element*) は中間中胚葉と沿軸中胚葉で共に発現している。また、レチノイン酸は中間中胚葉と沿軸中胚葉への分化を促すことも報告されている。

これらのことから、レチノイン酸処理によって、原始線条における発生運命を反映しながら、中間中胚葉と沿軸中胚葉を同時に誘導可能ではないかと考えた。そこで、前述の(1)において異なる条件で作製した EOMES や HAND1 陰性の原始線条細胞に対して、レチノイン酸処理を施す。そして、中間中胚葉マーカーである転写因子 *OSR1* (*Odd-skipped related 1*) の発現を指標に、中間中胚葉に効率良く分化する原始線条細胞が作製可能であるか否かを検討する。

(3) 前方および後方中間中胚葉に分化しうる原始線条細胞の作製

腎臓は中間中胚葉から派生する尿管芽と後腎間葉の相互作用によって形成されるが、尿管芽は前方中間中胚葉、後腎間葉は後方中間中胚葉から派生すると考えられている。前方中間中胚葉領域は Hoxb4、後方中間中胚葉領域は Hox11 によってそれぞれ規定されているため、それらの発現を指標に原始線条細胞を作製する。

(4) 中間中胚葉の機能評価

OSR1-GFP レポーターヒト iPS 細胞株とフローサイトメトリーを用いて、分化誘導した中間中胚葉を生存したまま単離する。そして、免疫不全マウスに移植し、前方中間中胚葉は尿管芽系譜、後方中間中胚葉は後腎間葉系譜の細胞へと分化する発生生物学的機能を有するか否かを検証する。

4. 研究成果

(1) 原始線条マーカーの発現を誘導する因子の検証

我々はこれまでに、OSR1 発現を指標にして、ヒト iPS 細胞から高効率に中間中胚葉を分化誘導する方法を確立している。しかし、それらの中間中胚葉には腎臓に分化しうる細胞がほとんどなく、作製した中間中胚葉は不均一で未熟な細胞であると考えられる。

まず、確立したヒト iPS 細胞からの分化誘導において、最初のステップで作製される原始線条に着目し、それらがどのような細胞であるのかを再度検証した。これまでの方法では、Activin A と Wnt シグナルのアゴニストである CHIR99021 を組み合わせることにより、ヒト iPS 細胞から BRACHYURY 陽性細胞を作製している。しかし、そのような方法で作製されるほとんどの BRACHYURY 陽性細胞が、腎臓に分化しうる中間中胚葉になる発生運命を持たない原始線条のマーカーの EOMES や HAND1 を発現していた。そこで、それらの発現が、原始線条の形成を促す増殖因子である Activin, Bmp, Fgf, Wnt の中で、どの因子によって誘導されるのかを検証したところ、EOMES および HAND1 発現は、それぞれ Activin A, BMP4 によって誘導された。

次に、ヒト iPS 細胞から EOMES と HAND1 を発現しない BRACHYURY 陽性細胞の分化誘導を試みた。ヒト iPS 細胞を原始線条への誘導因子である FGF2 と CHIR99021 で処理したところ、HAND1 を発現しない BRACHYURY 陽性細胞を効率良く作製できた。さらに、CHIR99021 を高濃度にする事で EOMES 発現を抑制することが可能であった。

(2) 中間中胚葉に分化しうる原始線条の作製

マウス胚発生において、レチノイン酸は原始線条から中間中胚葉および沿軸中胚葉への分化を促すことが知られているため、ヒト

iPS 細胞から FGF2 と高濃度 CHIR99021 で作製した BRACHYURY 陽性細胞にレチノイン酸処理を施したところ、高効率に OSR1 陽性中間中胚葉に分化することが分かった(図1)。一方で、EOMES や HAND1 を発現する BRACHYURY 陽性細胞にレチノイン酸処理を施しても、ほとんど OSR1 陽性中間中胚葉に分化しなかった。これらのことから、FGF2 と高濃度 CHIR99021 で分化誘導される EOMES や HAND1 を発現しない BRACHYURY 陽性細胞が、中間中胚葉に分化する発生生物学的機能を有していると考えられる。

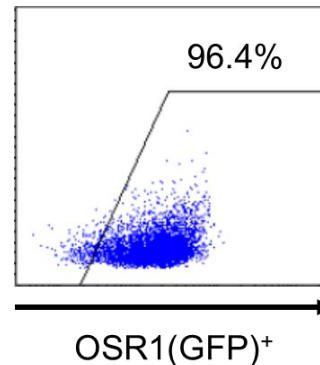


図1 高効率に作製した OSR1 陽性細胞

(3) 前方および後方中間中胚葉に分化しうる原始線条細胞の作製

腎形成に必要な尿管芽および後腎間葉は、それぞれ前方と後方中間中胚葉から派生し、それらの中間中胚葉領域は Hoxb4 と Hox11 発現で規定されている。また、Hox 遺伝子発現は後期原始線条段階から認められるため、腎臓に分化しうる中間中胚葉を作製するためには、HOX 遺伝子を発現する BRACHYURY 陽性後期原始線条細胞を作製することが重要であると考えた。

まず、FGF2 と高濃度 CHIR99021 で分化誘導される BRACHYURY 陽性細胞における HOXB4 発現を検証したところ、どの処理期間においてもその発現は認められなかった。また、FGF2 と高濃度 CHIR99021 での処理期間を長くした場合、BRACHYURY 陽性細胞が減少し、OSR1 陽性細胞が増加することが分かった。これらのことから、後期原始線条細胞を作製するためには、BRACHYURY 陽性細胞から OSR1 陽性細胞への分化を抑制することが重要であると予想した。

そこで、原始線条から中間中胚葉の分化には Nodal シグナルが重要であることに着目し、TGFβ シグナルの阻害剤である A83-01 を FGF2 と高濃度 CHIR99021 に追加したところ、BRACHYURY 陽性細胞を作製することが可能であった。さらに、BRACHYURY 陽性細胞は HOXB4 を発現していたことから、ヒト iPS 細胞から後期原始線条を作製できたと考えられる。しかし、どの培養期間においても HOX11 発現は確認できなかったことから、HOX11 発現の誘導にはさらに別の因子が必要であることが示唆される。

レチノイン酸処理だけでは、HOXB4 を発現する BRACHYURY 陽性細胞から PAX2 や GATA3 などを発現する前方中間中胚葉への分化誘導効率が低かった。そこで、前方中間中胚葉が発現している FGF8 を追加したところ、効率良く前方中間中胚葉を作製できることが分かった。

(4) 中間中胚葉の機能評価

前方中間中胚葉は表皮外胚葉からの因子によってウォルフ管に分化することが知られている。そこで、表皮外胚葉から分泌される BMP, Wnt, Fgf で、前方中間中胚葉からウォルフ管への分化誘導を試みたところ、FGF2 でウォルフ管への分化が促されることが分かった(図2)。現在、前方中間中胚葉を免疫不全マウスに移植し、生体内で尿管芽系譜に分化するか否かを検討している。

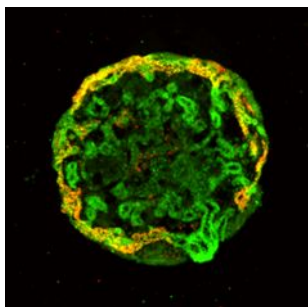


図2 ヒト iPS 細胞から再現したウォルフ管

これまでの報告では、原始線条からの分化誘導によって細胞の発生運命を腎臓の方向に限定することに主眼が置かれていた。しかし本研究では、原始線条において、既に腎臓への発生運命が決定しているのではないかという着想に至って、ヒト iPS 細胞から腎前駆細胞を分化誘導した点に新規性がある。今後は、作製した前方中間中胚葉から高効率に尿管芽組織を作製すると共に、後方中間中胚葉に分化しうる原始線条を作製する方法の開発が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Mae S and Osafune K
Kidney regeneration from human induced pluripotent stem cells
Current opinion in organ transplantation, 査読有, 20(2), 2015, 171-177
DOI: 10.1097/MOT.000000000000170

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
なし

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前 伸一 (MAE, Shin-ichi)
京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教
研究者番号: 50749801