

令和元年5月29日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09602

研究課題名(和文) ヒト腎臓由来iPS細胞のゲノムワイドメチル化解析による新規腎系統分化誘導因子同定

研究課題名(英文) Identification of novel renal lineage differentiative induction by genome wide methylation analysis of human kidney-derived iPS cells

研究代表者

高瀬 敦 (TAKASE, OSAMU)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師

研究者番号：60265684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは、線維芽細胞由来iPS細胞(F-iPS)と腎上皮細胞由来iPS細胞(K-iPS)を比較して、ゲノムワイドなDNAメチル化解析とMicroarray解析の複合解析を行った。結果、元細胞から引き継がれるエピジェネティクスな記憶遺伝子が多いK-iPSが腎臓への分化誘導に適していると考えられた。また、DNAメチル化と蛋白発現が一致して動く遺伝子は決して多くないが、いくつかの新規腎系統分化誘導因子を同定する事ができた。更に癌幹細胞のエピジェネティクスな概念を検討するために、腎臓がん細胞を使ったiPS化(リプログラミング)を検討したが、癌の特殊性もありiPS細胞の樹立は困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療に関して近未来医療としての期待は大きい。しかしながら、実臨床への導入は未だ難しく基礎研究も十分ではない。

研究代表者らは腎臓再生医療に向けて腎上皮細胞由来iPS細胞の樹立に成功しており、それを使ってエピジェネティクスな記憶遺伝子の解明、新規腎系統分化誘導因子の同定をした。これにより、腎臓再生医療においてKEY遺伝子を利用した研究が進む事が期待できる。また、腎臓のみならず様々なiPS細胞のエピジェネティクスの解明は再生医療を推進する事と考える。更に癌細胞のリプログラミング(iPS化)において癌幹細胞の検討をしたが、癌の特殊性もありiPS化が困難であった。今後、癌幹細胞の解明に期待する。

研究成果の概要(英文)：The research representatives compared the fibroblast-derived iPS cells (F-iPS) and the renal epithelial cell-derived iPS cells (K-iPS) and performed a combined analysis of genome-wide DNA methylation analysis and Microarray analysis.

As results, K-iPS with many epigenetic memory genes inherited from the original cell was considered to be suitable for inducing differentiation into the kidney. Also, several new renal lineage differentiative induction factors could be identified although there are not many genes that change DNA methylation and protein expression with match. Furthermore, iPS formation (Reprogramming) using kidney cancer cells was examined in order to examine the epigenetics concept of cancer stem cells, but it was difficult to establish iPS cells due to the peculiarity of cancer.

研究分野：腎臓・再生・遺伝子

キーワード：Epigenetic memory Methylation iPS細胞 腎上皮細胞由来iPS細胞 新規腎系統分化誘導因子 癌幹細胞 リプログラミング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞から腎臓への分化誘導法としては、生理的な腎臓発生過程に準じて、中間中胚葉を経た報告がなされている (Nat Commun. 2013)。一方、中間中胚葉を経ず、体軸幹細胞を経て腎臓構成細胞を分化誘導し、糸球体と尿細管を含む3次元の腎臓組織の分化誘導法も報告された (Cell Stem Cell. 2014)。これらの異なる報告は、iPS 細胞における腎臓系統への分化誘導が、必ずしも生理的な発生過程と同じ経路を辿るものではないことを示している。iPS 細胞は、もともと人工的な多能性幹細胞であり、iPS 細胞には樹立前の細胞記憶が残されていると考えられており、樹立された iPS 細胞はそれぞれ元細胞のゲノムの特徴を持っている。言い換えれば、iPS 細胞は樹立された細胞毎に細胞記憶が異なっており、標準化が困難である反面、逆に細胞記憶を上手く利用することにより、効率良く標的細胞への分化誘導が可能と考えられる。

研究代表者らは、ヒト腎臓由来 iPS 細胞における細胞記憶を利用することにより、効率良く腎臓系統への分化誘導が可能との仮説を立て、研究を行って来た。iPS 細胞における細胞記憶の本質は未だ明らかではないが、最も有力なのが、いわゆる epigenetic memory である。我々はこれまで epigenetic memory の中でも、ヒストン修飾に着目し、HDAC 阻害薬の効果を検討してきた。独自にヒト腎上皮細胞由来、ヒトメサンギウム細胞由来、ヒト近位尿細管細胞由来のヒト腎臓由来 iPS 細胞を樹立し、既報に従い腎臓系統への分化誘導を試みた。

ヒト線維芽細胞由来 iPS 細胞 (F-iPS) とヒト腎臓上皮由来 iPS 細胞 (K-iPS) を用い、中間中胚葉を経た分化誘導法と体軸幹細胞を経た分化誘導法を行ったが、いずれの分化誘導法においても K-iPS は F-iPS に比較して、腎臓系統へ分化し易い事が明らかとなった。次に、ヒストン修飾に注目し、HDAC 阻害薬 (Tricostatin A) が K-iPS の腎臓系統への分化誘導を促進するか検討したところ、腎臓系統発生マーカーの発現を促進し、テラトーマ形成実験では、K-iPS の腎臓質下細胞移植において、糸球体様の構造物が見られた。更に、テラトーマ組織を用いた Western blot の結果、K-iPS では F-iPS では見られない AQP1、Nephrin、Erythropoietin の発現を認めた。以上の結果から、K-iPS には epigenetic memory が残されていると考えられた。研究代表者らは特に DNA のメチル化に着目した。K-iPS、F-iPS における iPS 樹立前後のメチル化の変化を、27,000 のメチル化サイトについて解析した。中でも、High CpG プロモーター領域 (GC>0.55, CpG>0.75) においては、56 の高メチル化遺伝子、17 の低メチル化遺伝子を同定し、既報の発生関連遺伝子とは全くことなる腎臓系統への分化誘導候補遺伝子を見いだした。然し乍ら、これらの結果はプレリミナリーな結果に過ぎず、本研究においては更に多くのゲノムワイドなメチル化解析により、新規腎臓系統分化誘導遺伝子を同定すると共に、これまでの発生過程に順じた分化誘導法と全く異なるヒト iPS 細胞における高効率な腎臓系統分化誘導法の確立をめざす。

加えて、近年、癌研究において「癌幹細胞」の存在が着目されており、その癌幹細胞が元となって癌組織を構成している可能性が指摘される。この癌幹細胞は通常の幹細胞が遺伝子的、エピジェネティック的に異常をきたしたものであると考えられている。また、これら癌幹細胞は抗癌剤や放射線治療に対する抵抗性、癌の進展の中心となっていると考えられ、最も治療標的とするべき細胞である。本研究は癌細胞のリプログラミング (初期化) において、癌細胞からの iPS 細胞の樹立を検討し、新たな癌研究に寄与したいと考える。

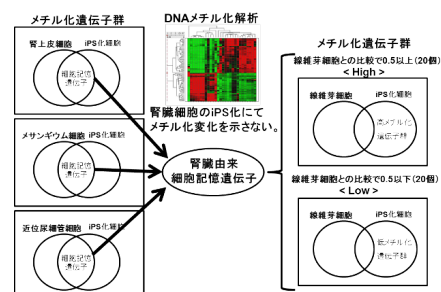
2. 研究の目的

研究代表者らは、一貫して、ヒト iPS 細胞に残された細胞記憶に着目した腎臓系統への分化誘導法確立を研究してきた。これまでにヒト腎臓由来 iPS 細胞にエピジェネティクス制御薬を作用させ、効率良く腎臓系統へ分化誘導が可能であることを報告した。更に、プレリミナリーなメチル化解析により、既報の発生関連遺伝子とは全く異なる腎臓系統への分化誘導遺伝子を見いだした。本研究においては、これまでの研究を継続・発展させ、更に多くのゲノムワイドなメチル化解析により、新規腎臓系統分化誘導遺伝子を同定すると共に、これまでの発生過程に順じた分化誘導法と全く異なるヒト iPS 細胞における高効率な腎臓系統分化誘導法の確立をめざす。

加えて、近年、癌研究において「癌幹細胞」の存在が着目されており、その癌幹細胞が元となって癌組織を構成している可能性が指摘される。本研究は細胞のエピジェネティック的なアプローチから癌細胞のリプログラミング (初期化) において、癌細胞からの iPS 細胞の樹立を検討し、新たな癌研究に寄与したいと考える。

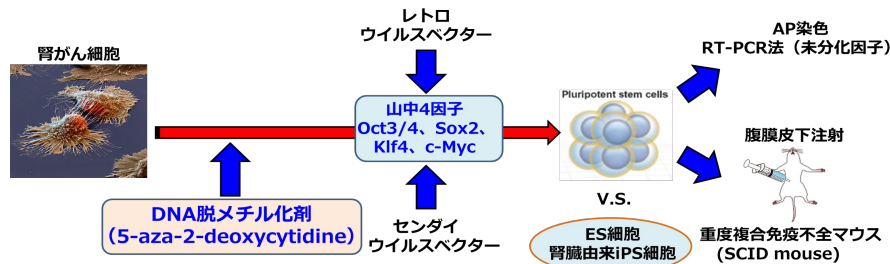
3. 研究の方法

本研究では、ゲノムワイドメチル化解析により、腎臓由来 iPS 細胞に残された腎臓のフェノタイプを決定する遺伝子群を同定し、従来の発生過程に従った方法とは全く異なる、iPS 細胞の腎臓系統への分化誘導法を確立する。最初に腎臓構成細胞 (上皮、尿細管細胞、メサンギウム細胞) および線維芽細胞から iPS 細胞を



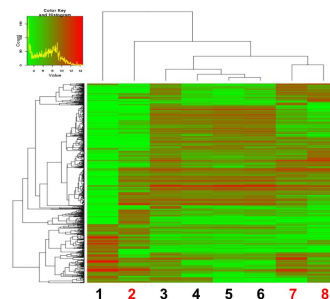
樹立し、これまでの Epigenetic Memory を考慮して、45 万を超えるメチル化サイトを持つビーズアレイにより、ゲノムワイドなメチル化解析を行った。iPS 細胞の樹立には従来のレトロウイルスと共に、ゲノムへの損傷の少ないセンダイウイルスベクターを用いた。特に腎臓由来 (K-iPS) と線維芽由来 iPS 細胞 (F-iPS) の樹立前後における DNA methylation 解析を行った。DNA メチル化解析にて腎臓由来細胞記憶遺伝子を見出し、その遺伝子群に着目して各 iPS 化前後と腎系統分化誘導を施した細胞において、60,000 個の DNA Microarray 解析を組み合わせて発現確認を検討した。

加えて、腎がん細胞を用いて、山中 4 因子を導入したレトロ、センダイウイルスから腎癌 iPS 細胞の樹立を試みた。また、活発な増殖能を持つ癌細胞において Epigenetics の関与が重要と考え、DNA の脱メチル化剤である 5-aza-2-deoxycytidine を前処置して検討した。iPS 細胞評価として、コロニー形成、AP 染色、未分化マーカーの RT-PCR 法、SCID マウスへの細胞移植などを腎上皮由来 iPS (K-iPS) 細胞や ES 細胞と比較して検討した。

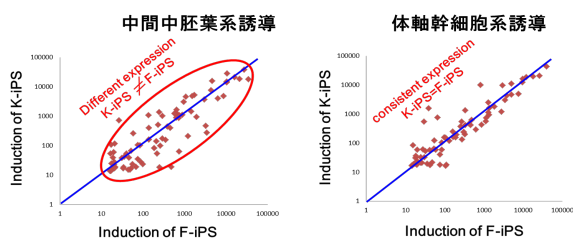


4. 研究成果

線維芽細胞、腎上皮細胞の各 iPS 化前後の細胞と iPS 化細胞の腎系統分化誘導を施した細胞において、Microarray cluster 解析を施行した。結果、右図のように 1(線維芽細胞)、2(腎上皮細胞)の成熟細胞から 3(F-iPS 細胞)、4(K-iPS 細胞)の同様な iPS 細胞を作成できた。3,4 の iPS 細胞を体軸幹細胞系誘導した 7(腎誘導 F-iPS 細胞)、8(腎誘導 K-iPS 細胞)は、2 番の腎上皮細胞に近い発現パターンを一部に認めた。特に K-iPS の腎系統分化誘導細胞が腎上皮細胞の遺伝子発現と相同性を示し、良好な分化状態を確認した。

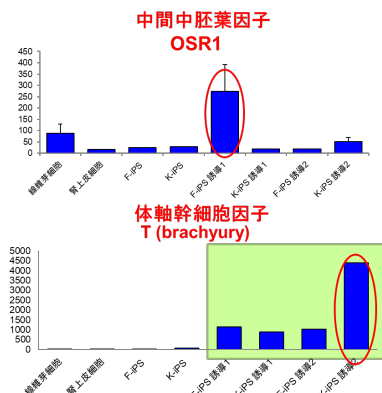
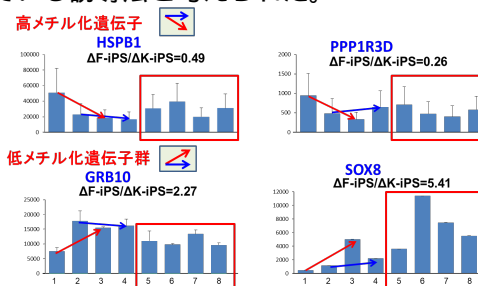


腎臓分化・発生因子 (Kidney-associated 21 gene)



また左図の DNA Microarray 解析において、腎臓分化・発生因子に関する 21 個の遺伝子について 2 つの腎系統分化誘導法と 2 つの iPS 細胞で解析した結果、腎臓分化・発生遺伝子において、体軸幹細胞系誘導にて両 iPS 細胞の発現が一致しており、体軸幹細胞系誘導は腎臓分化誘導に適している誘導法と考えられた。

更に、右図の Kidney Epigenetic Memory に対する Microarray 解析では、48 個の high methylation 遺伝子群において F-iPS で発現低下を示し、腎系統分化誘導で遺伝子発現が増加するものとして HSPB1、PPP1R3D の遺伝子を見出し、17 個の low methylation 遺伝子群において F-iPS で発現増加を示し、分化誘導で増加した遺伝子として GRB10、SOX8 を同定した。



更に左図のように、中間中胚葉因子である OSR1、体軸幹細胞因子である T (Brachyury) の発現を見た。既報通り F-iPS 細胞における中間中胚葉系誘導では OSR1 のみ発現亢進を認めた。体軸幹細胞系誘導では T の発現亢進を、2 つの iPS 細胞、2 つの誘導で認めた。特に K-iPS 細胞における遺伝子 T の発現は強く、遺伝子 T は、腎臓分化誘導に重要と考えられた。

各 iPS 細胞、腎系統分化誘導細胞を Methylation と Microarray 解析にて網羅的、相互的に検討した結果、新規腎系統分化誘導に関与する候補遺伝子を同定する事ができた。この結果より発生過程とは異なる全く新しい腎臓分化誘導因子を見つける事ができた。今後はその Target 遺伝子を改変して、更なる腎臓再生の研究を進めたいと考える。

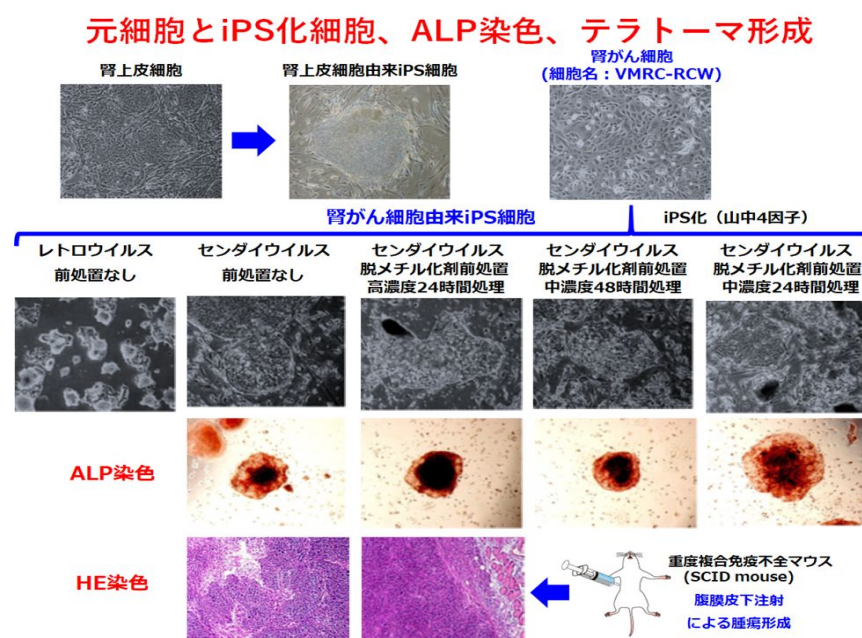
加えて下図のように、腎癌細胞を用いた iPS 化、リプログラミングについて検討した。山中 4 因子を導入したレトロ、センダイウイルス、及び DNA の脱メチル化剤である 5-aza-2-deoxycytidine を各前処置して腎癌 iPS 細胞の樹立を試みた。

結果、腎がんの iPS 化は、ウイルスベクターに関わらず、がん細胞の増殖が強く、iPS 様のコロニー形成には至らないものが多かった。脱 DNA メチル化剤を使用した iPS 化も同様にコロニー形成は難しくかった。比較的良いコロニーを採取、継代し、コロニーの ALP 染色をすると陽性であったが、一様な染色ではなく判断するのが難しかった。

腎がん由来 iPS 細胞の SCID マウスへのテラトーマ形成は、腹膜腫瘍は認められたものの、病理検査においてテラトーマの 3 杯葉系の組織は認められず、核異型のある転移性癌様の所見であった。

また、RT-PCR 法における未分化マーカー (Oct、Nanog) の発現は、ウイルスベクターの変更や脱メチル化剤の使用に関わらず、元細胞より発現増加するものの、K-iPS 細胞や ES 細胞と比べて発現が減少していた。

癌の iPS 化において、体細胞と比べて「癌幹細胞」の存在が正常の初期化 (リプログラミング) を難しくしている可能性が示唆された。それにより癌の増殖能や浸潤能に「癌幹細胞」が影響している機序が考えられた。がん細胞のリプログラミングにおいて、「癌幹細胞」の Epigenetic 機序の解明が不可欠であると考えられ、今後は癌細胞の特殊性質を変換させて iPS 細胞の樹立を検討する予定である。



5. 主な発表論文等

[学会発表](計8件)

- (1) 高瀬敦(代表)、辻村太郎、吉川真弘、佐野悦子、宮本寛治、高戸毅、岡野栄之、菱川慶一
 「腎癌細胞のリプログラミングへの取り組み」
 第17回日本再生医療学会総会、2018年
- (2) 高瀬敦(代表)、辻村太郎、吉川真弘、高戸毅、岡野栄之、菱川慶一
 「Epigenetic Memory 解析からの iPS 細胞の新規腎系統分化誘導遺伝子の同定」
 2017年度 生命科学系学会合同年次大会、2017年
- (3) 高瀬敦(代表)、辻村太郎、菱川慶一
 「ヒト腎臓由来 iPS 細胞を利用した Epigenetic Memory からの腎臓分化誘導遺伝子の同定」
 第60回日本腎臓学会学術総会、2017年
- (4) 高瀬敦(代表)、辻村太郎、高戸毅、南学正臣、菱川慶一
 「多種類 iPS 細胞における DNA methylation & Microarray 複合解析による Epigenetic Kidney Differentiation Gene の同定」
 第17回日本抗加齢医学会学術総会、2017年
- (5) 高瀬敦(代表)、辻村太郎、吉川真弘、高戸毅、南学正臣、菱川慶一
 「多種類 iPS 細胞における Kidney Epigenetic Memory 解析からの新規腎系統分化誘導遺伝子の同定」
 第16回日本再生医療学会総会、2017年
- (6) 高瀬敦(代表)、辻村太郎、出井真奈、高戸毅、南学正臣、菱川慶一
 「線維芽由来 iPS 細胞と腎臓由来 iPS 細胞における包括的 DNA メチル化解析比較からの

腎系統特異的分化誘導法の検討」

第 16 回日本抗加齢医学会学術総会、2016 年

- (7) Takase O (代表), Tujimura T, Nangaku M, Hishikawa K

「Functional role of epigenetic memory genes in human kidney derived iPS cells」

Annual Meeting of American Society of Nephrology (KIDNEY WEEK 2016)、2016 年

- (8) 高瀬敦 (代表) 辻村太郎、南学正臣、菱川慶一

「腎臓由来 iPS 細胞における Epigenetic Memory の Genome-Wide Methylation 解析の検討」

第 59 回日本腎臓学会学術総会、2016 年

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：菱川 慶一

ローマ字氏名：HISHIKAWA, Keiichi

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：特任准教授

研究者番号 (8 桁) : 50266460

研究分担者氏名：辻村 太郎

ローマ字氏名：TUJIMURA, Taro

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：特任助教

研究者番号 (8 桁) : 90741893

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。