

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 元年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09659

研究課題名(和文) ヒト疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝性尿細管疾患診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel diagnosis methods for hereditary nephrotubular diseases using the disease-specific iPS cells

研究代表者

羽毛田 公 (HAKETA, Akira)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：60624294

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)：偽性副甲状腺機能低下症患者末梢血単核球に山中4因子をウイルス導入にてiPS細胞を樹立し、マトリゲル培養21日間で腎尿細管細胞へはアクアポリン1陽性尿細管上皮に誘導出来、21種の分化尿細管マーカーmRNAの発現を確認した。残存した未分化iPS細胞はrBC2LCN-PE23にて除去した。尿細管上皮細胞へのPTH添加でcAMP産生増加、リン酸取込みを確認した。偽性副甲状腺機能低下症患者iPS細胞から腎尿細管細胞への分化誘導が出来、未分化iPS細胞の除去により、今後診断法の確立は可能と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで遺伝性尿細管疾患、とりわけ偽性副甲状腺機能低下症の臨床的診断法であるEllsworth Howard試験でのPTHによる尿中cAMPとリン酸排泄の正確な評価は困難な事が多かった。今回の研究にて偽性副甲状腺機能低下症の疾患特異的iPS細胞からの培養尿細管細胞でPTH負荷によるcAMP増加とリン酸の細胞内取り込みにて、Ellsworth Howard試験をin vitroで行える事は大いに意義がある。予想される結果としては遺伝性尿細管疾患の正確な診断法が確立され、医療社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：To develop in vitro parathyroid hormone (PTH) stimulating test, we will establish the disease (psudehyperparathyroid: PHP)-specific iPS cells from periferal blood mononuclear cells (MNC) of PHP patients and differentiate the PHP-specific iPS cells to nephrotubular cells on which we will perform the PTH stimulating test. iPS cell line (201B7) was differentiated to nephrotubular cells in matrigel with BMP2, BMP7, activin-A and retinoic acid. 201B7 cell line was differentiated to aquaporin-positive nephrotubular cells. Addition of PTH increased cAMP levels and incorporation of Phosphorus in RPTEC. We established iPS cells from MNCs from patients with PHP and confirmed differentiation to aquaporin-positive nephrotubular cells. We could completely eliminate the contamination of undifferentiated iPS cells with rBC2LCN-PE23. These findings indicate possibility of establishment of diagnosis of hereditary nephrotubular diseases by the disease-specific iPS cell technology.

研究分野：内分泌学

キーワード：疾患特異的iPS細胞 遺伝性尿細管疾患 アクアポリン 偽性副甲状腺機能低下症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患を有する患者の体細胞から樹立した iPS 細胞 (疾患特異的 iPS 細胞) は、患者の遺伝情報を保持したあらゆる細胞を作製しうることから、疾患発症機序の解明、治療薬開発の画期的なツールと考えられる。偽性副甲状腺機能低下症、Bartter 症候群、Gitelman 症候群などの遺伝性腎尿細管疾患に於ける尿細管機能の正確な評価は、一般臨床レベルでは困難な場合が多く、偽性副甲状腺機能低下症を診断する Ellsworth-Howard 試験での PTH による尿中 cAMP とリン酸排泄の正確な評価も困難な事が多い。また偽性副甲状腺機能低下症による腎内石灰化では腎機能障害を伴い、PTH による尿中 cAMP とリン酸排泄が不正確となる。Bartter 症候群と Gitelman 症候群は、低 K 血症、高レニン・アルドステロン血症を特徴とする遺伝性尿細管疾患である。近年、原因部位・遺伝子が特定され、Bartter 症候群は 1 型から 4 型まで分類可能となったが、原因遺伝子を特定できる施設は限られており、臨床症状や検査所見で分類しているのが現状である。Bartter 症候群 3 型は Gitelman 症候群と臨床症状や検査所見が類似する患者が存在するため、そのみでは診断を確定することが困難である。そこで利尿剤負荷試験による障害部位特定により診断にいたる方法が見直されている。しかし、Bartter 症候群 3 型は原因部位がヘンレループから遠位尿細管に及ぶため、利尿剤負荷による反応が不明である。この様に、臨床での遺伝性腎尿細管疾患患者の確定および鑑別診断が困難であっても、尿細管疾患特異的 iPS 細胞から腎尿細管細胞を分化誘導出来れば、培養尿細管細胞での正確な機能評価より鑑別診断が出来る。これまで尿細管疾患特異的 iPS 細胞から腎尿細管細胞を分化誘導の報告はないが、2013 年 Narayanan らは ES 細胞から尿細管細胞への分化誘導法を検討し (Kidney Int.2013: 83; 593)、BMP、アクチビン、レチノイン酸を含むマトリゲルを用いて機能的尿細管細胞への分化を報告している。我々はこれまでこの方法を用いてヒト iPS 細胞からアクアポリン 1 陽性の腎尿細管細胞を分化誘導に成功した。

2. 研究の目的

ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝性尿細管疾患診断法の開発を目的に、ヒト末梢血単核球から樹立した iPS 細胞から分化尿細管細胞への誘導法を確立する。偽性副甲状腺機能低下症患者末梢血からの iPS 細胞由来尿細管細胞で PTH 負荷での cAMP 増加とリン酸の細胞内取り込みを評価し、臨床での PTH 負荷試験 (Ellsworth-Howard 試験) の結果と比較検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト末梢血単核球細胞から iPS 細胞の樹立

末梢採血し、Ficoll にて単核球を分離し、PBMC CM 培地に播種、培養し、翌日山中 4 因子センダイウイルスベクターを感染させる。21 日目までに ES 培地を添加し、iPS 細胞の状態から判断して、アルカリホスファターゼ染色で iPS 形成の評価を行った。

(2) ヒト iPS 細胞株からの尿細管細胞誘導の確立

Narayana et al. Kidney Int 2013 の ES 細胞からの尿細管細胞への分化誘導法を基に、マトリゲルを氷冷 DMEM と 1:50 で混合、培養液 (REGM) と 0.5% FBS に BMP2 (10 ng/ml)、BMP7 (2.5 ng/ml)、activin-A (10 ng/ml)、retinoic acid (0.1 mM) を添加し、培養 10 日目に尿細管細胞への分化を Aquaporin 1 免疫染色で確認した。

(3) 誘導尿細管細胞の機能解析

コントロール細胞としてヒト近位尿細管細胞を用い、iPS 細胞から分化誘導した尿細管細胞から培養 10 日目に mRNA を抽出し、以下の尿細管分化マーカーを real time PCR にて比較検討した。CD13, SGLT2, GGT, PEPT1, PEPT2, GLUT5, OAT1, OAT3, OCT1, AQP1, Na⁺/K⁺ ATPase, NBC1, MDR1, Vit D3 Hydr, AQP3, NCCT, PODXL, OCTN2, KSP-CAD, MEGALIN
既製の近位尿細管培養細胞に PTH 負荷を行い、cAMP 増加と ³²P-リン酸の細胞内取り込みにて適切な条件を検討。

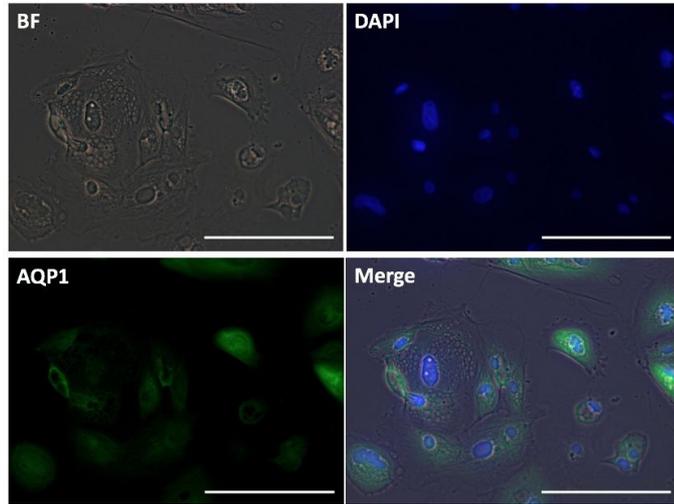
1) cAMP 産生の測定: 24Well プレートに尿細管細胞を 10%FBS/DMEM で播種し培養、DMEM 1 ml (IBMX 1mM, FBS 0.5 %濃度添加) に交換、PTH (0,10, 50, 100 nM) を添加し各 30、60、120 分刺激した。DMEM を吸引し PTH による反応を停止。5 % TCA 1 ml を加え氷上でホモジナイズし吸引、検体に水飽和エーテルを加え、遠心分離しエーテル層を除去、水層の cAMP の濃度を測定した。

2) 近位尿細管培養細胞へのリン酸の取り込み

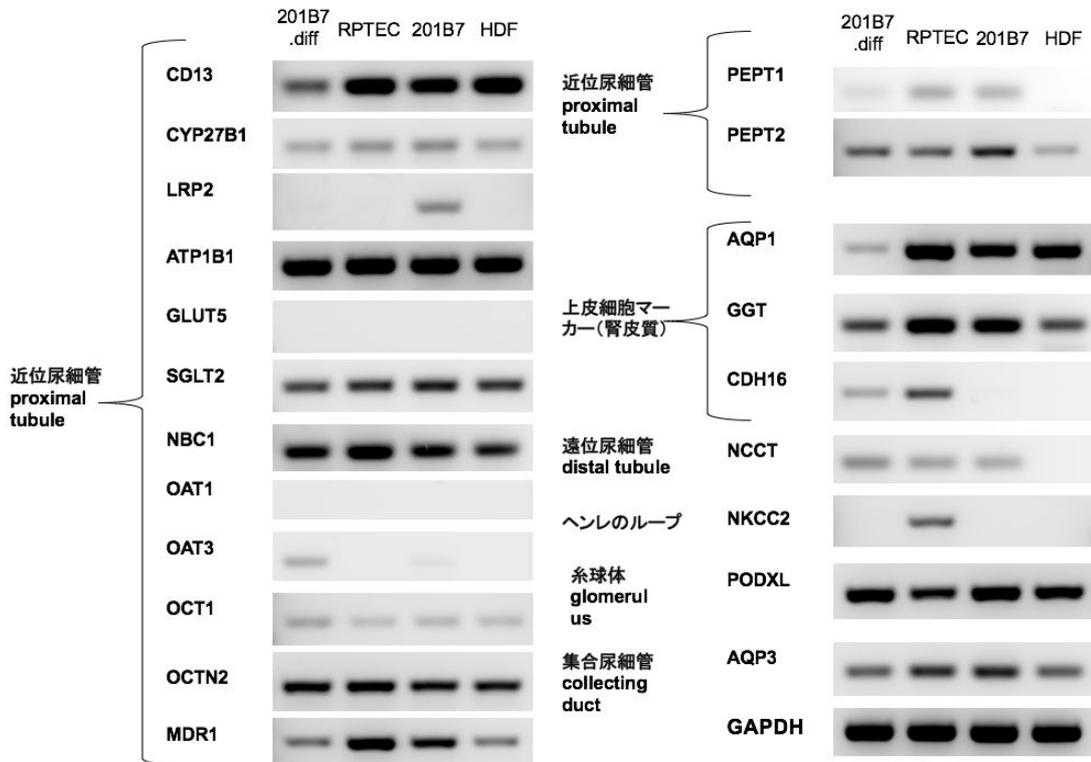
培養細胞の培地を吸引し、Pi Free Medium 0.8 ml を添加、Piuptake sol. を添加。30 sec または 1 min で次の well に移り反応を停止。次に 0.1N NaOH を 400 μl 添加、20 μl をタンパク測定用に 96 well dish に播種、残りは液体シンチレーションにセットする。測定終了後、タンパク濃度測定。

4. 研究成果

(1) iPS 細胞 201B7 株から 21 日間でアクアポリン 1 染色陽性尿細管上皮への分化誘導

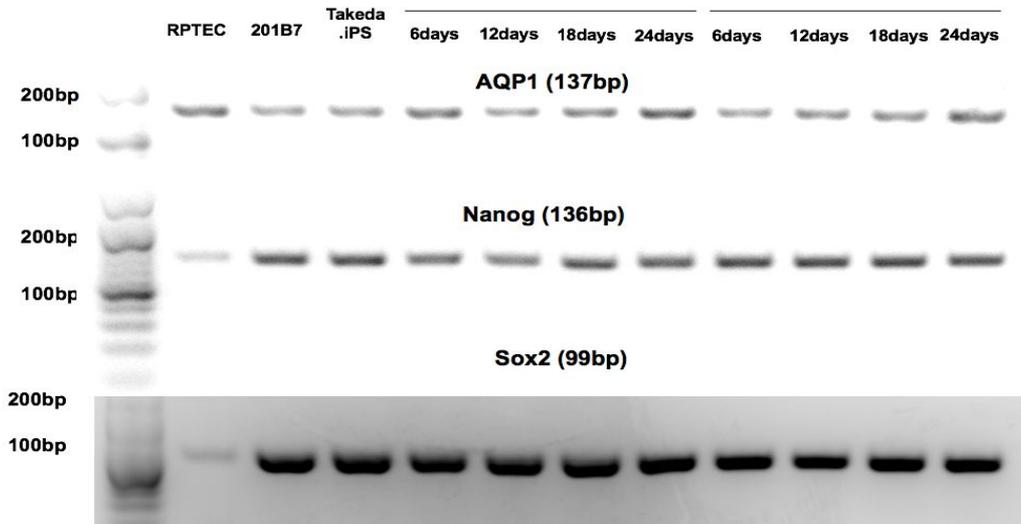


(2) iPS 細胞から分化誘導した尿細管細胞について培養 10 日目に mRNA 抽出し、21 の尿細管分化マーカーの real time PCR を行った。



iPS 細胞株 201B7 からの尿細管上皮への分化において RPTEC との比較で、近位尿細管マーカー CD13, ATP1B1, SGLT2, NBC1, OCT1, MDR1, PEPT2, AQP1, GGT, CDH16 が発現し、遠位尿細管マーカー NCCT も発現していた。またヘンレのループマーカー NKCC2 は発現していなかった。さらに糸球体マーカー PODXL、集合管マーカー AQP3 も発現していた。このように今回の方法で iPS から尿細管上皮細胞への分化は確認された。

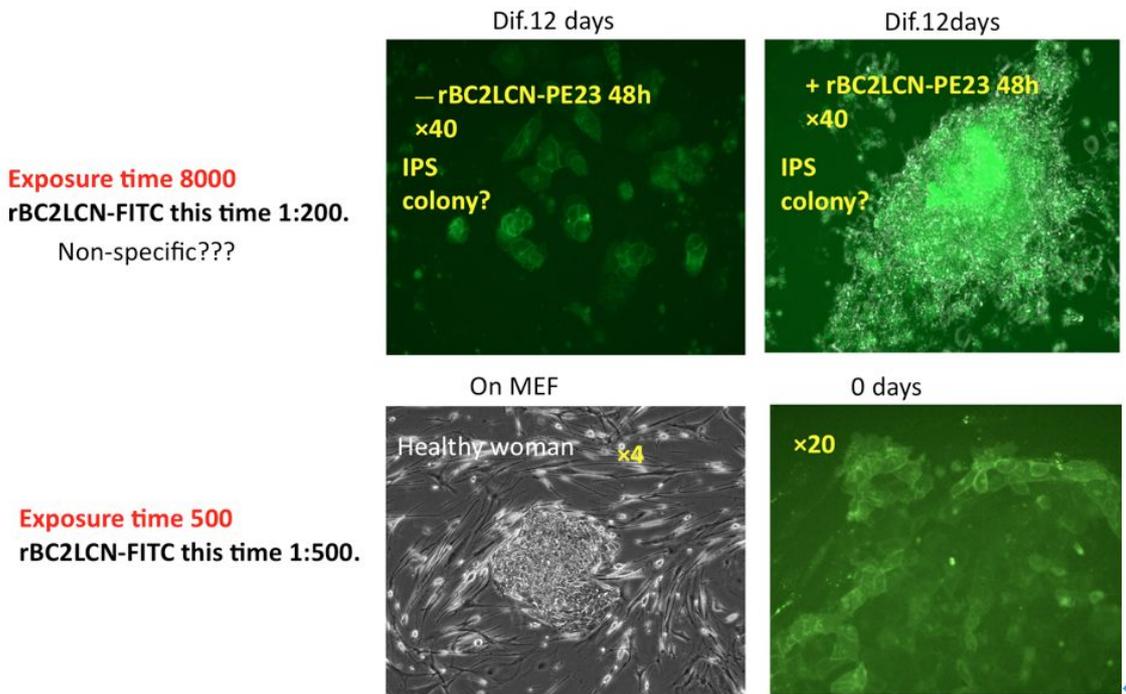
(3) 分化尿管上皮細胞への未分化 iPS 細胞の残存



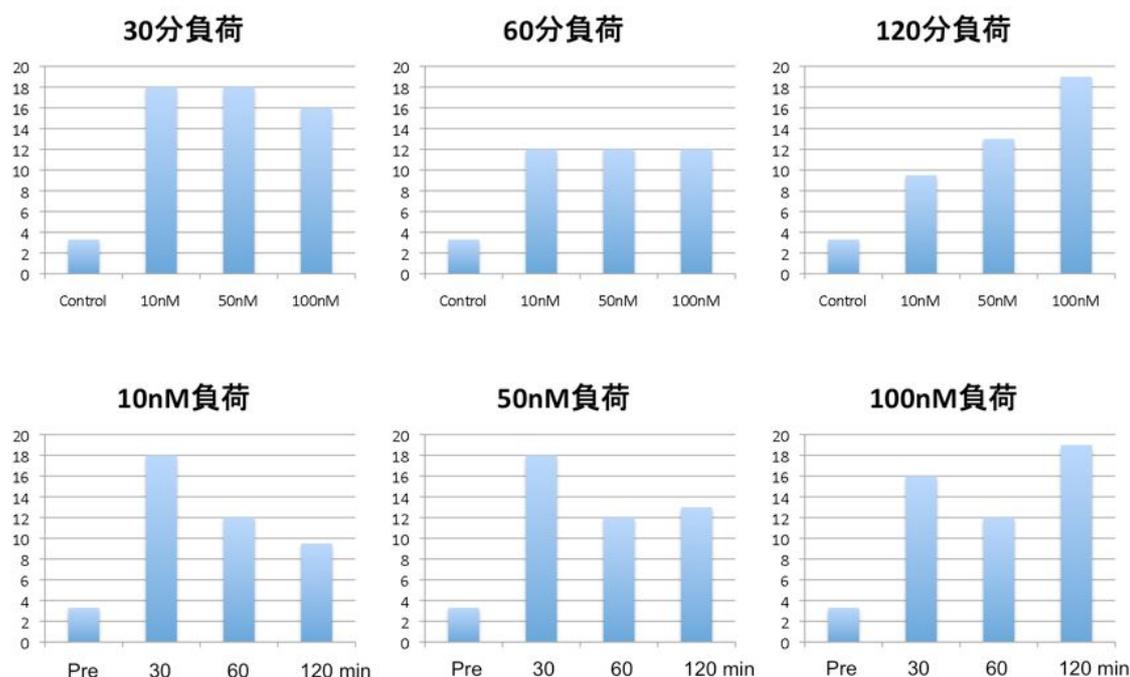
2 名の患者さんからの iPS 細胞を尿管上皮細胞に分化させ、6, 12, 18, 24 日目で AQP1 発現が確認されたが、この時点で iPS 細胞を含む未分化マーカー-Nanog, Sox2 の発現が確認され、未分化 iPS 細胞の残存を示唆した。

(4) 残存未分化 iPS 細胞の除去

iPS 細胞をマトリゲルにて尿管細胞に分化し、rBC2LCN-PE23 を添加して iPS 細胞を死滅させ、rBC2LCN-FITC 染色にて、殆どの残存 iPS 細胞は除去された。

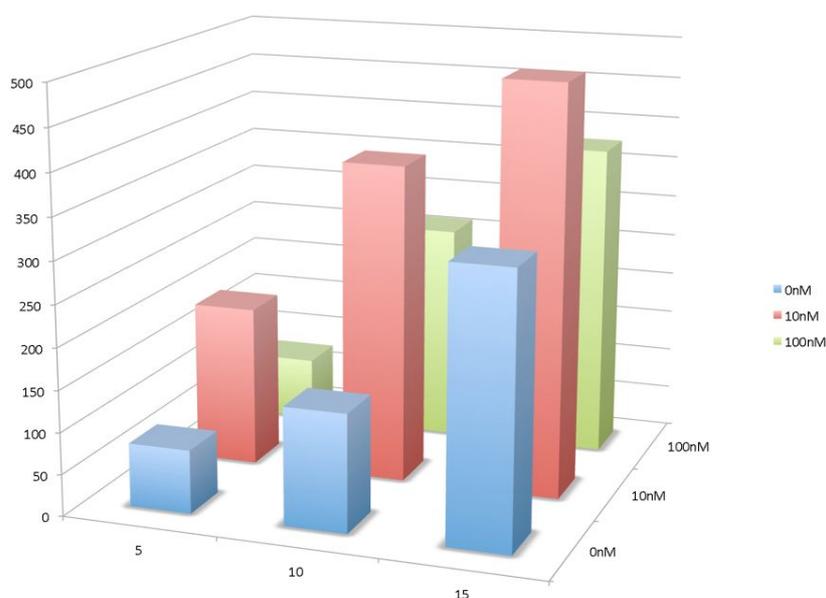


(5) 近位尿細管培養細胞に PTH 負荷を行い cAMP 増加による適切な条件の検討



近位尿細管培養細胞に PTH 負荷を行い cAMP 増加は 120 分負荷で濃度依存性が認められた。

(6) 近位尿細管培養細胞に PTH 負荷での ^{32}P -リン酸の細胞内取り込みにて適切条件の検討



PTH 負荷での ^{32}P -リン酸の細胞内取り込みは PTH 10 nM がピークで時間依存性も確認された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- 1) Tanaka S, Haketa A, Yamamuro S, Suzuki T, Kobayashi H, Hatanaka Y, Ueno T, Fukuda N, Abe M, Yoshino A, Soma M. Marked alteration of glycemic profile surrounding lanreotide administration in acromegaly: a case report. J Diabetes Invest. 9:223-225. 2018 (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

- 1) 田中 翔、福田 昇、羽毛田 公、小林 洋樹、畑中 善成、阿部 雅紀、相馬 正義. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた偽性副甲状腺機能低下症の診断法の確立. 第 90 回日本内分泌学会学術総会、京都、2017.4.22.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：福田 昇
ローマ字氏名：FUKUDA Noboru
所属研究機関名：日本大学
部局名：総合科学研究所
職名：教授
研究者番号(8桁)：60624294

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。