

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08246

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた腎性貧血に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapy for renal anemia using human iPS cells

研究代表者

人見 浩史 (HITOMI, Hirofumi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：70346641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞からエリスロポエチン産生細胞を作製した。貧血に重要な役割を担うエリスロポエチンの産生機序を解明するとともに、腎性貧血モデル動物に対する治療効果を証明した。ヒトiPS細胞由来エリスロポエチン産生細胞を用いた細胞療法の可能性が示唆された。ヒトiPS細胞由来エリスロポエチン産生細胞は、産生・分泌機序解明などの基礎研究に加え、貧血治療に対する再生医療の研究に有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、腎性貧血の治療に対する安価でより生理的な管理を可能とする医療技術の向上に加え、貧血に対する新規治療法の開発による本邦の医薬産業界の活性化をもたらすものである。これまでヒトiPS細胞を用いた再生医療の試みがなされているが、エリスロポエチン産生細胞に関しては我々以外の報告は存在せず、本研究は全く新規で独自のものである。患者自身の体細胞から樹立され、ほぼ無限に増殖する能力を有する多能性幹細胞であるiPS細胞を用いることで、免疫抑制の必要ないエリスロポエチン産生細胞を大量に作製することも可能であり、今後も需要の増す腎性貧血治療に対して有効な手段になりうる。

研究成果の概要(英文)：Erythropoietin dysregulation is a hallmark of renal anemia. Although recombinant erythropoietin is beneficial and safe, more physiological therapies are required. We developed a differentiation protocol for erythropoietin-producing cells from human iPS cells. These cells produced and secreted functional erythropoietin protein. In addition, transplantation of these cells into a mouse model improved renal anemia. From the perspective of basic research, these cells may be a useful tool for investigating the molecular mechanisms of erythropoietin production and secretion. From the perspective of clinical research, these results may provide a physiological therapeutic agent for renal anemia.

研究分野：再生医学 腎臓内科学 内分泌学

キーワード：再生医学 iPS細胞 移植・再生医療 エリスロポエチン 腎性貧血 薬効評価 細胞療法

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

透析療法は多くの腎不全患者に施される確立された医療であるが、腎臓機能の全てを補完することは出来ない。その代表的な病態として、エリスロポエチン欠乏に伴う腎性貧血が挙げられる。これまで腎性貧血に対しては、遺伝子組み換え技術で合成されたエリスロポエチン製剤が広く用いられている。これにより輸血療法を主体とする従来の治療と比較し、腎性貧血の管理は容易となった。しかし現在行われている間歇的な投与は、赤血球数の変動を来すとの報告もあり非生理的と考えられる。また腎性貧血は心血管イベントの発症と密接に関与していることが知られ、十分なエリスロポエチン投与により、これらが抑制される可能性が示唆されている。一方で、エリスロポエチンの過剰投与により、脳や心血管疾患のリスクがむしろ増大することも報告されており、エリスロポエチンの適正投与量については未だ議論が多く、生理的な貧血治療が必要とされている。さらに遺伝子組換えエリスロポエチン製剤に対する免疫反応により、輸血しか治療法のない重度貧血を呈する患者も報告されている。また腎臓代替療法を必要とする患者数の増加に伴い、エリスロポエチン製剤を投与される患者数も増加している。遺伝子組み換えエリスロポエチン製剤の需要は全世界で増加しており、薬剤販売額の統計においても常に上位を占めている。そのため我が国のみならず、多くの国の医療経済に対する負担は大きく、安価なエリスロポエチン補充や新規経口治療薬など腎性貧血の治療が渴望されていた。

エリスロポエチンは主に腎臓で産生され、骨髄における赤血球系の産生に関与していることが知られていたが、発現調節機構と産生する細胞については明らかとなっていなかった。近年、エリスロポエチン産生細胞が腎臓の傍尿管で同定され、その発現機序も徐々に解明されてきた。しかしながらエリスロポエチン産生細胞を単離することは非常に難しく、特にヒトにおいては単離培養も確立されておらず、エリスロポエチン産生機序はほとんど明らかとなっていなかった。そのため、ヒトのエリスロポエチン産生細胞は、研究を大きく進める有用なツールとして考えられていた。また腎性貧血患者の増加により、臨床においても安価で生理的な治療法を開発することが急務となっていた。これらのことから、エリスロポエチン産生細胞、特にヒトのエリスロポエチン産生細胞を作製することができないだろうかと考えた。

2. 研究の目的

エリスロポエチン産生細胞を生体材料として用いることで、生理的で安価な腎性貧血治療法を検討してきた。まずエリスロポエチン産生細胞の不活化に興味を持ち実験を行い、種々の細胞を不活化することが出来たが、エリスロポエチン産生細胞を腎臓から単離することが困難であるという問題点も露呈した。特にヒトのエリスロポエチン産生細胞を準備することができず、この方法の限界と考えた。そのため生体材料として iPS 細胞に注目し、エリスロポエチン産生細胞を分化誘導する方法を開発した。そこでこれまでの研究をさらに進め、これまでの腎性貧血に対する治療を根本から変える可能性のある iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞の臨床応用のため、本研究を立案するに至った。本研究の目的はヒト iPS 細胞からエリスロポエチン産生細胞を分化誘導し、これを生体に導入することにより、エリスロポエチンの生理的な補充を行うことである。さらにはエリスロポエチン産生機構を解明することにより、新規腎性貧血治療を開発することにある。

これまでいくつかの臓器に対して、ヒト iPS 細胞を用いた再生医療の試みがなされているが、エリスロポエチン産生細胞に関しては、知りうる限り我々以外の報告は存在せず、本研究は全く新規で独自のものである。患者自身の体細胞から樹立され、ほぼ無限に増殖する能力を有する多能性幹細胞である iPS 細胞を用いることで、免疫抑制の必要ないエリスロポエチン産生細胞を大量に作製することも可能であり、今後も需要の増す腎性貧血治療に対して有効な手段になりうる。さらに臨床応用に向け動物モデルを用いた検証は必須であり、本研究で得られる成果は、腎性貧血の治療に対する安価でより生理的な管理を可能とする医療技術の向上に加え、貧血に対する新規治療法の開発による本邦の医薬産業界の活性化をもたらすものであると考えている。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞の臨床応用を最終的な目的とするが、本研究では、エリスロポエチン産生機構の解明と、モデル動物に移植し腎性貧血改善効果を検討する。以下に本研究で明らかにする内容を示す。

(1) ヒト iPS 細胞からエリスロポエチン産生細胞を分化誘導し、高効率にエリスロポエチン産生を行う条件検討と、エリスロポエチン産生・分泌機構を解明する。エリスロポエチン産生機構が解明された場合、腎性貧血治療薬のスクリーニングを行う。

(2) 腎性貧血免疫不全マウスにエリスロポエチン産生細胞を移植し、貧血改善効果を検討する。さらに生体適合性を考慮した医療材料でモジュール(カセット)を作製し移植する。細胞移植に関しては移植部位が非常に重要であるため、血流が保持されまた低酸素を感知することが可能な移植部位を検討する。

(3) マウス iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞を自家移植する。まずマウスから iPS 細胞

を樹立する。そのマウス iPS 細胞を用い、我々が開発した分化誘導法で産生細胞を作製する。ヒト iPS 細胞と同様に、マウス iPS 細胞においてもエリスロポエチン産生細胞に分化誘導できることを確認している。分化誘導したエリスロポエチン産生細胞を細胞塊またはモジュール化し、iPS 細胞を樹立したマウスに自家移植する。必要に応じて腎性貧血を惹起し、貧血改善効果と産生細胞生着について評価する。また貧血の状態を感知し、長期に生着が可能な移植部位について検討する。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞からエリスロポエチン産生細胞を分化誘導し、高効率にエリスロポエチン産生を行う条件検討と、エリスロポエチン産生・分泌機構を解明することを行った。ヒト iPS 細胞から誘導したエリスロポエチン産生細胞は、生体と同様に低酸素刺激によりエリスロポエチン産生が増加し、低酸素関連因子が重要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、これまでの分化誘導法を改良することにより、高効率にエリスロポエチン産生細胞を誘導する条件検討を行った。また最近臨床応用された腎性貧血治療薬のプロリン水酸化酵素阻害剤は、エリスロポエチン産生および分泌を増加させた。ヒト iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞を、腎性貧血治療薬の薬効評価に用いる可能性が示唆された。

次に、ヒト iPS 細胞からエリスロポエチン産生細胞を分化誘導し、腎性貧血免疫不全マウスに作製した細胞を移植し、貧血改善効果を検討した。腎性貧血モデルは、マウスにアデニンを経口投与することで作製した。ヒト iPS 細胞からエリスロポエチン産生細胞を作製し、細胞塊とすることで腎性貧血モデルマウスの腎被膜下に移植した。移植された細胞は長期間エリスロポエチンを産生し、マウスの腎性貧血を改善した。我々が作製した細胞は、生理的なホルモン産生・分泌調節機構を有すると考えられ、ホルモン過剰により多血症となることはなかった。また移植した細胞の腫瘍化も認められなかった。腎被膜下以外の移植部位は引き続き検討を行っている。さらに細胞を直接移植するのではなく、生体適合性を考慮した医療材料でモジュールを作製し、移植することを検討した。モジュール内で細胞が長期間生存すること、エリスロポエチン分泌が持続することを確認している。モジュールの安全性を確認し、腎性貧血マウスに移植することを検討している。

さらに、マウス iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞を自家移植することを検討した。はじめに、血液検体から iPS 細胞を樹立する系を確立した。ヒト血液から単核球を分離し、プラスミドを導入することにより iPS 細胞を樹立した。樹立された iPS 細胞はエリスロポエチン産生細胞に分化誘導できることを確認した。次に、ヒト iPS 細胞を用いる分化誘導法を改良し、マウス iPS 細胞からエリスロポエチン産生細胞に分化誘導できることを確認した。これらの技術を用い、マウスから iPS 細胞を樹立し、エリスロポエチン産生細胞に分化誘導し、自家移植を行う実験を進めている。一方で、作製したエリスロポエチン産生細胞の分離に役立つ因子として CD140b と CD73 に着目し、これらが有用な細胞表面マーカーであることを報告した。臨床応用に向け、細胞表面マーカーを用いた産生細胞の選択は非常に重要であると考えられた。さらには、分化誘導法の改良として、レチノイン酸がエリスロポエチン産生細胞の誘導効率を上げることも報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Nishimoto Shogo, Mizuno Tomohiro, Takahashi Kazuo, Nagano Fumihiko, Yuzawa Yukio, Nishiyama Akira, Osafune Kenji, Hitomi Hirofumi, Nagamatsu Tadashi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 CD140b and CD73 are markers for human induced pluripotent stem cell derived erythropoietin producing cells | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 FEBS Open Bio | 6. 最初と最後の頁 427 ~ 433 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12800 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yamazaki Daisuke, Konishi Yoshio, Morikawa Takashi, Kobara Hideki, Masaki Tsutomu, Hitomi Hirofumi, Osafune Kenji, Nakano Daisuke, Kittikuluth Wararat, Nishiyama Akira | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Failure to confirm a sodium?glucose cotransporter?2 inhibitor induced hematopoietic effect in non diabetic rats with renal anemia | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation | 6. 最初と最後の頁 834 ~ 843 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13205 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Rahman A, Yamazaki D, Sufiun A, Kitada K, Hitomi H, Nakano D, Nishiyama A. | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 A novel approach to adenine-induced chronic kidney disease associated anemia in rodents. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One | 6. 最初と最後の頁 e0192531 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0192531 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Li L, Konishi Y, Morikawa T, Zhang Y, Kitabayashi C, Kobara H, Masaki T, Nakano D, Hitomi H, Kobori H, Nishiyama A. | 4. 巻 137 |
| 2. 論文標題 Effects of an SGLT2 inhibitor on the systemic and intrarenal renin-angiotensin system in subtotaly nephrectomized rats. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J. Pharmacol. Sci. | 6. 最初と最後の頁 220-223 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2017.10.006. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Zhang Y, Nakano D, Guan Y, Hitomi H, Uemura A, Masaki T, Kobara H, Sugaya T, Nishiyama A. | 4. 巻 94 |
| 2. 論文標題 A sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor attenuates renal capillary injury and fibrosis by a vascular endothelial growth factor-dependent pathway after renal injury in mice. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Kidney Int | 6. 最初と最後の頁 524-535 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2018.05.002. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Wan N, Rahman A, Hitomi H, Nishiyama A. | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 The Effects of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors on Sympathetic Nervous Activity. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Front Endocrinol | 6. 最初と最後の頁 421 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2018.00421. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Yamazaki D, Hitomi H, Nishiyama A. | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 Hypertension with diabetes mellitus “Complications”. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Hypertens Res | 6. 最初と最後の頁 147-156 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-017-0008-y. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 人見浩史 |
| 2. 発表標題 iPS細胞由来細胞を用いた腎臓・内分泌領域創薬の新展開 |
| 3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松岡由和, 角出啓輔, 中塚隆介, 白水泰昌, 藤岡龍哉, 藺田精昭, 服部文幸, 人見浩史 |
| 2. 発表標題 CRISPR/Cas9 システムを用いたヒト造血幹細胞におけるCD34抗原の発現意義の解析 |
| 3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 人見浩史 |
| 2. 発表標題 腎疾患におけるiPS細胞の臨床応用 |
| 3. 学会等名 第54回日本小児腎臓病学会学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 人見浩史 |
| 2. 発表標題 iPS細胞を用いた腎性貧血および内分泌疾患治療の展望 |
| 3. 学会等名 第64回日本透析医学会総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hitomi H, Nakano D, Osafune K, Nishiyama A |
| 2. 発表標題 Human pluripotent stem cell-derived erythropoietin-producing cells improve renal anemia in mice |
| 3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) Kyoto (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hitomi H, Kasahara T, Katagiri N, Hoshina A, Mae S, Kotaka M, Toyohara T, Rahman A, Nakano D, Niwa A, Saito M, Nakahata T, Nishiyama A, Osafune K |
| 2. 発表標題 Human pluripotent stem cell-derived erythropoietin-producing cells improve renal anemia in mice |
| 3. 学会等名 ISSCR 2018 Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 人見浩史, 西山成, 長船健二 |
| 2. 発表標題 iPS細胞を用いて腎性貧血を治療する |
| 3. 学会等名 第63回日本透析医学会学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 人見浩史, 笠原朋子, 片桐直子, 保科あずさ, 前伸一, 小高真希, 豊原敬文, Asadur Rahman, 中野大介, 丹羽明, 斎藤潤, 中畑龍俊, 西山成, 長船健二 |
| 2. 発表標題 iPS細胞由来エリスロポエチン産生細胞を用いた腎性貧血に対する細胞療法開発 |
| 3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hitomi H, Nishiyama A, Osafune K |
| 2. 発表標題 Human pluripotent stem cell-derived erythropoietin-producing cells ameliorate renal anemia in mice. |
| 3. 学会等名 ISN Frontiers meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 人見浩史、西山成、長船健二 |
| 2. 発表標題 iPS細胞を用いた慢性腎不全の次世代治療法-腎性貧血細胞治療の可能性 |
| 3. 学会等名 第48回日本腎臓学会西部学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|-------------------------------|--------------|---------------|
| 産業財産権の名称 副甲状腺細胞の作製方法 | 発明者 人見浩史他 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2019-199409 | 出願年 2019年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |