

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：32651

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06203・19K21307

研究課題名(和文)腎臓再生における慢性腎不全患者由来iPS細胞の有用性の検証

研究課題名(英文)Regenerative potential of induced pluripotent stem cells derived from patients undergoing haemodialysis in kidney regeneration

研究代表者

田尻 進(SUSUMU, TAJIRI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：50646362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病に対する新規治療法として腎臓再生療法が注目を集めている。特に induced pluripotent stem cells (iPS細胞)は患者自身から樹立可能であり、患者由来の腎臓再生を可能にする。

慢性腎不全患者由来のiPS細胞からの腎臓再生が可能かどうかを検証を行うため、慢性腎不全により血液透析にいたった患者ならびに健常者からiPS細胞を樹立した。樹立したiPS細胞の特性の比較、ネフロン前駆細胞、ネフロンへの分化誘導能ならびにその遺伝子発現、機能(血管新生能)の比較を行った。その結果、透析患者iPS細胞は腎臓再生の有用なツールとなりうることを本研究において示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎不全に対する根本的治療としては腎移植があるが、ドナー不足の問題から腎移植のみでは腎不全を克服することは難しい。また仮に腎移植を受けられた場合も生涯にわたり、免疫抑制剤の内服が必要になる。患者由来の多能性幹細胞から腎臓を再生し、移植することができれば、ドナー不足や免疫抑制剤の内服といった問題を克服することができる。本研究は、患者由来幹細胞由来の腎臓再生の可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that uremic state in CKD is toxic to somatic stem/progenitor cells affecting their differentiation and angiogenic potential. Recent studies reported that specific abnormalities caused by the non-inherited disease are often retained in induced pluripotent stem cell(iPSC)-derived products obtained from patients. Thus, it is indispensable to assess whether iPSCs derived from patients with CKD due to non-inherited disease have the ability to generate kidneys. We generated iPSCs from patients undergoing haemodialysis due to non-inherited disease (HD-iPSCs) or from healthy controls (HC-iPSCs). HD-iPSCs differentiated into nephron progenitor cells (NPCs) with similar efficiency to HC-iPSCs. Additionally, HD-iPSC-derived NPCs expressed comparable levels of NPC markers and differentiated into vascularised glomeruli upon transplantation into mice, as HC-iPSC-derived NPCs. Our results indicate the potential of HD-iPSCs as a feasible cell source for kidney regeneration.

研究分野：再生医学

キーワード：慢性腎不全 腎臓再生 多能性幹細胞 ネフロン前駆細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全に対する根本的治療としては腎移植があるが、ドナー不足の問題から腎移植のみでは腎不全を克服することは難しい。また仮に腎移植を受けられた場合も生涯にわたり、免疫抑制剤の内服が必要になる。患者由来の幹細胞から腎臓を再生し、移植することができれば、ドナー不足や免疫抑制剤の内服といった問題を克服することができると思う。

### 2. 研究の目的

慢性腎臓病に対する新規治療法として腎臓再生療法が注目を集めている。特に induced pluripotent stem cells (iPSCs)は患者自身から樹立可能であり、この細胞を腎臓の系譜へと分化させることにより、患者由来の腎臓再生を可能にする。今まで、慢性腎不全患者由来の幹細胞から腎臓再生が可能かどうか検証した研究は少なく、特に腎不全患者由来多能性幹細胞を用いた研究は存在しない。そこで、慢性腎不全患者由来の iPSCs が腎臓再生の有用なツールとなりうるか検証することとした。

### 2. 研究の方法

#### (1) 透析患者、健常者由来 iPSC 細胞の樹立およびネフロン前駆細胞への誘導

後天性腎疾患により腎不全にいたった 3 名の患者 (原疾患は糖尿病性腎症、急速進行性糸球体腎炎、腎硬化症) から iPSC 細胞 (iPSCs) を樹立した。同様に健常者 2 名からも iPSCs を樹立した。腎不全群として、樹立した 3 名から 4 クローンの iPSCs を選択した。健常群として樹立した 2 名から 3 クローンの iPSCs を選択し、Riken cell bank から購入した 1 クローンを加え、4 クローンとした。腎不全群、健常群の iPSCs を既報に従ってネフロン前駆細胞 (NPCs) へ分化誘導を行った。誘導効率を免疫染色 (WT1、PAX2、Six2) FACS (ITGA8+/PDGFRA-) を用いて評価した。

#### (2) NPCs の Sorting ならびに透析群間と健常群間での NPCs 比較

iPSCs から分化させた細胞塊は NPCs 以外の細胞も含まれるため、両群から NPCs を分離しその性質を比較することとした。分離は、マグネット付き抗体を NPCs へと付着させ、マグネットの中を通すことにより行った。具体的には、ITGA8 陽性細胞を positive selection した後、PDGFRA 陰性細胞を negative selection し、ITGA8+/PDGFRA- の NPCs を抽出した。

#### (3) 透析群と健常群 iPSC 由来ネフロンの比較

次に透析群ならびに健常群 iPSCs を分化させた細胞塊をマウス胎仔脊髄と共培養を行い、ネフロンへと分化させた。ネフロンへと分化したところを顕微鏡下にて切りとり、健常群と透析群間で遺伝子発現の比較を行った。

#### (4) 透析群と健常群 iPSC 由来糸球体の血管誘導能の比較

生体内で尿を濾過するためには、糸球体の中に血管が引き込まれる必要がある。腎不全環境下の細胞は健常群に比べて血管新生能・誘導能が低下することが過去に報告されている。そこで、透析患者 iPSCs 由来糸球体の血管新生能を健常群と比較した。マウス胎仔脊髄と共培養を開始した透析患者ならびに健常者由来 iPSC 由来の細胞塊を、3 日目にマウス胎仔脊髄ごと免疫不全マウスの腎臓被膜下に移植を行った。得られた糸球体にホストの血管内皮細胞がどの程度侵入しているかを比較することで両群の iPSC 由来糸球体の血管誘導能の比較を行った。

#### (5) 慢性腎不全環境下で iPSC 由来 NPCs をネフロンへと分化させることができるか

申請者らは、再生した腎臓を慢性腎不全患者に移植することを想定している。そこで尿毒症物質を培養液に加えた環境下で、マウス胎仔脊髄とヒト iPSC 由来 NPCs を共培養し、ネフロンへと分化することができるか検証を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 透析患者、健常者由来 iPSC 細胞の樹立およびネフロン前駆細胞への誘導

各 iPSC の特性は表 1 の通りである。NPCs への分化誘導効率の比較を免疫染色 (WT1、PAX2、Six2)、FACS (ITGA8+/PDGFRA-) を用いて評価したところ両群において分化誘導効率が同等であることが示された。

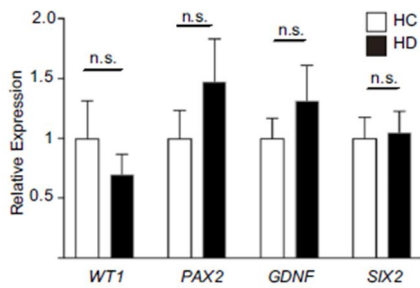
(表 1)

	Healthy controls (HC)			Haemodialysis patients (HD)		
Identifier in the study	HC-1, 2	HC-3	HC-4	HD-1	HD-2, 3	HD-4
iPSC line No.	1401#7, #15	1406 #22	201B7	HD1 #11	HD2 #6, #7	HD5 #6
Age <sup>a</sup>	60s	50s	36	39	65	50
Sex	Male	Male	Female	Female	Male	Male
Duration of RRT (months)				46	57	85
Cause of CKD				CGN	DMN	RPGN
Cell source	PBMCs	PBMCs	Fibroblasts	PBMCs	PBMCs	PBMCs
Vector	Episomal plasmid	Episomal plasmid	Retrovirus	Episomal plasmid	Sendaivirus	Episomal plasmid
Reprogramming factors	SOX2, OCT3/4, KLF4, L-MYC, LIN28, p53-shRNA	SOX2, OCT3/4, KLF4, L-MYC, LIN28, p53-shRNA	SOX2, OCT3/4, KLF4, c-MYC	SOX2, OCT3/4, KLF4, L-MYC, LIN28, p53-shRNA	SOX2, OCT3/4, KLF4, c-MYC	SOX2, OCT3/4, KLF4, L-MYC, LIN28, p53-shRNA

#### (2) NPCs の Sorting ならびに透析群間と健常群間での比較

Sorting により全細胞塊にしめる ITGA8+/PDGFRA-分画を 30%から 90%まで濃縮することに成功した。実際に Sorting 後の細胞は WT1、PAX2、SIX2、GDNF といった NPC marker を強く発現していた。透析群ならびに健常群間で NPC の遺伝子発現の比較を行った所、両群ともその発現に有意差は認めなかった(図 1)。マグネットが付着した状態の NPCs の分化能を検証するため、マウス胎仔脊髄と共培養を行い、ネフロンへの分化能の検証を行い、ネフロンへと問題なく分化できることも確認した。

(図 1)



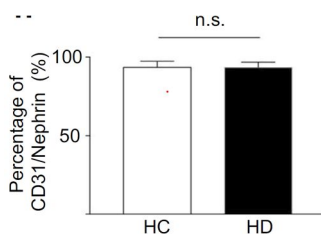
### (3) 透析群と健常群 iPSC 由来ネフロンの比較

透析群と健常群 iPSCs から誘導したネフロンにおいてネフロン特異的マーカーの発現差は認められなかった。実際に透析患者 iPSC 由来ネフロンは、組織学的にも糸球体から近位ならびに遠位尿細管構造を確認することができた。電子顕微鏡レベルでは、足細胞の間隙に幼弱ながらスリット膜の確認することができた。

### (4) 透析群と健常群 iPSC 由来糸球体の血管誘導能の比較

移植後 9 日目に回収した。回収時、組織サイズは移植前に比べ増大しており、表面には毛細血管の侵入を認めた。組織学的にも、移植前に比べてより成熟した糸球体を認め、電子顕微鏡で観察すると内部には赤血球を認め、血管内皮細胞、基底膜、足細胞からなる 3 層構造を確認することができた。移植前に比べ、足細胞の突起はより成熟していた。免疫染色では、ネフリン陽性の基底膜直下に CD31 陽性の血管内皮細胞が侵入していることが確認できた。全糸球体のうち、CD31 が陽性の糸球体をカウントすることで半定量的に血管新生能を評価した。その結果、透析群、健常群 iPSCs 由来糸球体ともに 90%以上で CD31 が陽性であり、両群間に有意差は認めなかった(図 2)。以上のことから、透析患者 iPSC 由来糸球体は健常群と同程度に血管を引き込む力を有することを示すことができた。

(図 2)



### (5) 慢性腎不全環境下で iPSC 由来 NPCs をネフロンへと分化させることができるか

*In Vitro* の検証ではあるが、腎不全環境化でも問題なくネフロンへと分化できることを示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tajiri Susumu, Yamanaka Shuichiro, Fujimoto Toshinari, Matsumoto Kei, Taguchi Atsuhiko, Nishinakamura Ryuichi, Okano Hiroataka James, Yokoo Takashi	4. 巻 8
2. 論文標題 Regenerative potential of induced pluripotent stem cells derived from patients undergoing haemodialysis in kidney regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-33256-7	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田尻 進
2. 発表標題 血液透析患者由来iPS細胞の腎再生利用案
3. 学会等名 2019年日本透析医学会学術集会・総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田尻 進
2. 発表標題 腎臓再生における血液透析患者由来iPS細胞の有用性の検証
3. 学会等名 2019年日本腎臓学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------