

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590878

研究課題名（和文） ヒト腎臓由来 iPS 細胞を用いた NF- $\kappa$ B 制御による新規腎臓再生療法の検討研究課題名（英文） Development of new renal regenerative therapy using human Renal-iPS cells regulated by NF- $\kappa$ B

研究代表者

高瀬 敦 (TAKASE OSAMU)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：60265684

研究成果の概要（和文）：ヒト腎臓由来 iPS (hR-iPS) 細胞と線維芽由来 iPS 細胞での NF- $\kappa$ B 制御、未分化維持・分化誘導機構を検討した。両未分化 iPS 細胞の NF- $\kappa$ B 活性を siRNA にて knockdown したところ、未分化マーカーの発現抑制、逆に分化マーカーの発現増加を認めた。また hR-iPS 細胞の方が腎臓発生分化マーカーの発現が強い傾向にあった。この結果より iPS 細胞の未分化維持機構に NF- $\kappa$ B 活性が関与をしている事、更に hR-iPS 細胞の腎臓再生の可能性を見出した。成果の一部は日本腎臓学会、再生医療学会、海外誌 (PLoS One) などに報告した。

研究成果の概要（英文）：We have investigated about the differentiation toward to kidney using human Renal-iPS (hR-iPS) cells regulated by NF- $\kappa$ B as compared with human Fibroblastic-iPS (hF-iPS) cells. Both iPS cells have shown the activity of NF- $\kappa$ B. As NF- $\kappa$ B activity was knockdown by NF- $\kappa$ B p65 siRNA, the expression of undifferentiated makers decreased, conversely the kidney-associated-differentiated makers increased, especially stronger in hR-iPS than hF-iPS cells. Thus we have suggested that the augmentation of NF- $\kappa$ B signaling maintains the undifferentiated state of human iPS, and hR-iPS cells are easy of differentiation toward to kidney. We have reported a part of outcome at the annual meeting of the Japanese Society of Nephrology, Japanese Society of Regenerative Medicine, and to the Journal of 'PLOS One'.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：(1) 腎臓由来 iPS 細胞 (2) NF- $\kappa$ B (3) siRNA Knockdown (4) HDAC 阻害剤 (5) エピジェネティック・メモリー

## 1. 研究開始当初の背景

再生医学研究は京都大学山中教授によるヒト induced Pluripotent Stem (iPS) 細胞

樹立 (Cell. 2007;131:861-72) により転換点を迎え、これまでヒト ES 細胞による再生医療は倫理面や拒絶反応を含め様々な問題が

残されていたが、iPS 細胞は患者自身の細胞からの樹立が可能で、倫理面や拒絶反応の問題は解決され、iPS 細胞を用いた再生医療の臨床応用が現実的なものとなった。幹細胞の分化誘導に関する研究が盛んに行われるようになったが、未だ腎臓を含め、特定の細胞に特異的分化誘導する方法は確立していない。また iPS 細胞自体の特性や未分化維持機構なども未だ十分には解明されていない。最近、エピジェネティック・メモリー概念が言われるようになり、iPS 細胞の樹立元の細胞に分化しやすいのではないかと報告が続いている。様々な組織、細胞より iPS 細胞が樹立されるようになったが、新たに樹立した iPS 細胞からの分化誘導研究は進んでいない状況である。

## 2. 研究の目的

我々はこれまで核転写因子 NF-κB について研究を行って来たが、最近 NF-κB 活性化と Stem cells との関係が指摘されており、NF-κB を介した幹細胞の分化誘導に関する報告がなされている。本研究では我々が独自に樹立したヒト腎臓由来 iPS 細胞を用い、NF-κB 活性制御による腎臓構成細胞への分化誘導および新規腎臓再生療法の確立をめざす。

## 3. 研究の方法

(1) 新たに樹立したヒト腎臓由来 iPS (hR-iPS) 細胞とヒト線維芽由来 iPS (hF-iPS) 細胞において、形態、発育を顕微鏡下で観察し、未分化マーカー (ALP, Oct3/4, NANOG)、分化マーカー (WT-1, Pax-2 など)、NF-κB 活性を比較検討した。また分化系 iPS 細胞として、feeder 細胞と b-FGF 添加を欠いた通常血清培地にて分化培養し、NF-κB 活性、未分化・分化マーカーを確認した。NF-κB 活性は EMSA 法で、未分化・分化マーカーは ALP 染色や Western blot で検討した。

(2) 更に NF-κB を制御するために両未分化 iPS 細胞に NF-κB p65 siRNA 処置を行い、NF-κB 活性を Knockdown し、未分化・分化マーカーへの影響を同様に検討した。

(3) 両分化 iPS 細胞にエピジェネティクスを修飾する HDAC 阻害剤 (TSA 処置) を施し、分化誘導の差異を検討した。

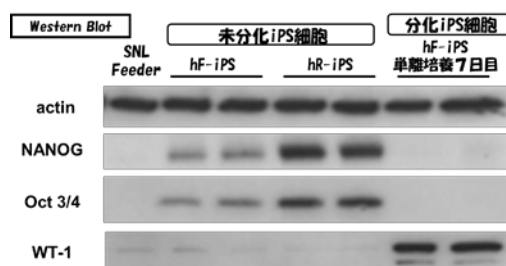
(4) In vivo への応用として、両未分化 iPS 細胞に NF-κB p65 siRNA 処置や TSA 処置をした細胞、していない細胞を、腹腔皮下および腎被膜下へ細胞移植してテラトーマ、腎臓再生について比較検討した。病理組織像は H-E 染色や PAS 染色で観察し、テラトーマの組織

をホモジネートして蛋白抽出し、Western Blot で検討した。

## 4. 研究成果

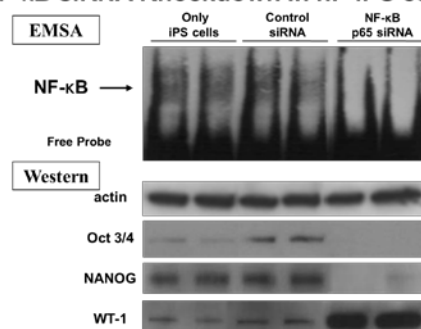
(1) 両未分化 iPS 細胞 (hR-iPS, hF-iPS) は、いずれも発育速度、コロニーの形態に相違はなく、ALP 染色において未分化維持も変化がなかった。共に未分化マーカー (Oct3/4, NANOG) は発現して、分化マーカー (WT-1) の発現はなかった。分化系 iPS 細胞は、両細胞共に NF-κB の活性化低下、未分化マーカーの低下を示し、逆に分化マーカーの発現亢進を認めた。(下図)

### 由来別 iPS 細胞の未分化・分化性



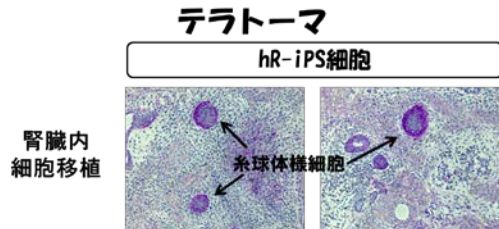
(2) NF-κB を制御するために両未分化 iPS 細胞に NF-κB p65 siRNA 処置を行った。siRNA 処置にて iPS 細胞の NF-κB 活性を Knockdown したところ、それにより未分化マーカーの発現は抑制され、逆に分化マーカーの発現増加を認めた。(下図) 特に hR-iPS 細胞は腎発生分化マーカー (Sall-1, Pax-2, WT-1, AQP-1) が hF-iPS 細胞より発現が強い傾向にあった。

### NF-κB siRNA Knockdown in hF-iPS cells



(3) iPS 細胞の由来元細胞により分化マーカーの発現に違いがあった事より、エピジェネティック・メモリー概念を考慮すると iPS 細胞は由来元細胞系へより強く特異的分化する傾向にある事が考えられた。それらを踏まえて、更に両分化 iPS 細胞にエピジェネティックを修飾する HDAC 阻害剤 (TSA 処置) を施し、分化の差異を検討したところ、hR-iPS 細胞が腎臓発生マーカー (Sall-1, Pax-2) の発現がより強く発現した。

(4) 両未分化 iPS 細胞に NF- $\kappa$ B p65 siRNA 処置または TSA 処置をした iPS 細胞を、腹膜皮下および腎被膜下へ細胞移植したところ、処置での相違は認められなかった。しかし、腹膜皮下よりも腎被膜下への細胞移植、そして hF-iPS よりも hR-iPS 細胞の方が、腎臓分化マーカー (AQP-1、Nephrin、Epo) の発現が強く、テラトーマの一部には糸球体様の腎構成細胞が認められた。(下図)



これらの結果より NF- $\kappa$ B 活性は iPS 細胞の未分化維持に必要である事を世界で初めて発表し、iPS 細胞の未分化維持・分化誘導研究に新たな進展を導くものと考えられた。また hR-iPS 細胞と hF-iPS 細胞との比較検討において、hR-iPS 細胞の方が腎臓発生分化マーカーの発現が強い傾向より、腎臓由来 iPS 細胞の腎臓再生への可能性を見出した。この研究結果は iPS 細胞のエピジェネティック・メモリー概念を裏付ける成果にて、この研究が今後の腎臓再生へ向けての大きな一歩と言える。本研究が新規腎臓再生療法への応用に繋がる事を期待する。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Takase O, Yoshikawa M, Idei M, Hirahashi J, Fujita T, Takato T, Isagawa T, Nagae G, Suemori H, Aburatani H, Hishikawa K. : “The role of NF- $\kappa$ B signaling in the maintenance of pluripotency of human induced pluripotent stem cells.” *PLoS One*. 8(2): e56399, 2013. (査読有)  
Doi: 10.1371/journal.pone.0056399.
- ② Kamiura N, Hirahashi J, Matsuzaki Y, Idei M, Takase O, Fujita T, Takato T, Hishikawa K. : “Basic helix-loop-helix transcriptional factor MyoR regulates BMP-7 in acute kidney injury.” *Am J Physiol Renal Physiol*. 304(9): F1159-66, 2013. (査読有)  
Doi: 10.1152/ajprenal.00510.2012.

- ③ Takase O, Hishikawa K, Kamiura N, Nakakuki M, Kawano H, Mizuguchi K, Fujita T. : “Eicosapentaenoic acid regulates  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  and prevents tubulointerstitial injury in kidney.” *Eur J Pharmacol*. 669(1-3): 128-35, 2011. (査読有)  
Doi: 10.1016/j.ejphar.2011.07.043.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 高瀬敦, 出射真奈, 山本芳子, 高戸毅, 菱川慶一: 「腎上皮細胞由来 iPS 細胞を用いた障害腎への再生医療の試み」: 日本抗加齢医学会総会 (2013 年 6 月 28 日、横浜)
- ② 高瀬敦, 吉川真弘, 菱川慶一: 「3 種類の腎臓由来 iPS 細胞からの腎臓再生の可能性について」: 日本腎臓学会学術総会 (2013 年 5 月 10 日、東京)
- ③ 高瀬敦, 出射真奈, 宮本寛治, 吉川真弘, 高戸毅, 菱川慶一: 「腎臓再生を目指した 3 種類の腎臓由来 iPS 細胞の相違」: 日本再生医療学会総会 (2013 年 3 月 22 日、横浜)
- ④ 高瀬敦, 菱川慶一, 藤田敏郎, 高戸毅: 「Epigenetic Memory からの腎臓由来 iPS 細胞を利用した腎臓再生医療の試み」: 日本再生医療学会総会 (2012 年 6 月 14 日、横浜)
- ⑤ 高瀬敦, 菱川慶一, 出射真奈, 藤田敏郎: 「腎上皮由来、メサングウム細胞由来 iPS 細胞を使った Epigenetic Memory からの腎臓再生の可能性について」: 日本腎臓学会学術総会 (2012 年 6 月 1 日、横浜)
- ⑥ 高瀬敦, 菱川慶一, 出射真奈, 藤田敏郎: 「腎臓由来 iPS 細胞の分化誘導の可能性について」: 日本腎臓学会学術総会 (2011 年 6 月 17 日、横浜)
- ⑦ 高瀬敦, 菱川慶一, 上浦望, 出射真奈, 藤田敏郎: 「iPS 細胞における未分化維持機構への NF- $\kappa$ B の役割」: 日本高血圧学会総会 (2010 年 10 月 17 日、福岡)
- ⑧ 高瀬敦, 菱川慶一, 上浦望, 出射真奈, 藤田敏郎: 「ヒト iPS 細胞における NF- $\kappa$ B 制御分化誘導の解明」: 日本腎臓学会学術総会 (2010 年 6 月 17 日、神戸)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高瀬 敦 (TAKASE OSAMU)  
東京大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号：60265684

(2)研究分担者

菱川 慶一 (HISHIKAWA KEIICHI)  
東京大学・医学部附属病院・特任准教授  
研究者番号：50255460

(3)連携研究者

藤田 敏郎 (FUJITA TOSHIRO)  
東京大学・先端科学技術研究センター・教授  
研究者番号：10114125

油谷 浩幸 (ABURATANI HIROYUKI)  
東京大学・先端科学技術研究センター・教授  
研究者番号：10202657