

## 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 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790786

研究課題名（和文） 腎臓再生を目指したヒト iPS 細胞から中胚葉への分化誘導

研究課題名（英文） Directed differentiation of human iPS cells into nephrogenic mesoderm towards regenerative medicine strategy for kidney diseases

研究代表者

長船 健二（OSAFUNE KENJI）

京都大学・iPS 細胞研究所・准教授

研究者番号：80502947

研究成果の概要（和文）：腎臓を派生させる胎生組織である「中間中胚葉」のマーカー遺伝子である核内転写因子 OSR1 のレポーターヒト iPS 細胞株の樹立に成功し、フローサイトメトリーを用いた定量的解析や単離を可能とした。そして、増殖因子の組み合わせ処理にてヒト iPS 細胞から 90%以上の高効率にて中間中胚葉細胞を分化誘導する方法を確立した。これらのヒト中間中胚葉細胞は、腎臓、副腎皮質、生殖腺など中間中胚葉由来臓器の構成細胞に分化しうる能力を有することも確認した。

研究成果の概要（英文）：We have succeeded in generating reporter human iPS cell lines for OSR1 gene, which is a specific marker for an embryonic germ layer, the intermediate mesoderm (IM) that gives rise to kidney. By using combinatorial treatment of growth factors, we have established highly efficient differentiation methods to induce human iPS cells into IM cells at an induction rate of more than 90%. We have also confirmed that these human IM cells can differentiate into cells constituting IM derivative organs, such as kidney, adrenal cortex and genitals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：iPS 細胞、中間中胚葉、腎臓、分化誘導、再生

## 1. 研究開始当初の背景

現在本邦において、末期慢性腎不全により透析療法を受けている患者総数は 28 万人以上、透析医療費は年間 1 兆 3,000 億円を越え、実に全医療費の約 4%を占めている。原因腎疾患に対する有効な治療法がないことや高齢化社会も相まって、今後も増加し続けることが予想されており、腎不全は医学的のみならず

医療経済的にも大きな問題である。毎年、約 3 万人の新規透析患者が発生する一方で、根治的な治療法の一つである腎移植施行は年間 1 千例にも満たず、腎移植におけるドナー臓器不足は深刻な問題であり、需要に対し供給が全く追いついていない現状である。

一方、発生生物学の知見に基づいた再生医学研究が、近年盛んに行われており、無限の

増殖能と多分化能を有する ES 細胞 (embryonic stem cell; 胚性幹細胞) や iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell; 人工多能性幹細胞) から、移植療法に使用可能な主要臓器への分化誘導を行った数多くの報告がある。しかし、腎臓への分化誘導の報告は少なく、現在までのところ、その方法は確立されていない。

## 2. 研究の目的

腎疾患に対する再生医療の開発は、医学的のみならず医療経済的にも急務であるが、現在までのところ、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞から試験管内で腎臓系譜の細胞を効率よく分化誘導する方法は確立されていない。申請者の最終目標は、「ヒト iPS 細胞から試験管内で作製した腎細胞を用いた再生医療開発」であるが、本研究期間内では、その最初のステップである、「ヒト iPS 細胞」から腎臓を派生させる発生初期の組織である「中間中胚葉」を分化誘導する方法の確立を行う。

## 3. 研究の方法

増殖因子の組み合わせ処理を用いて「ヒト iPS 細胞から中間中胚葉」への分化誘導の最適化プロトコルを確立する。誘導率の評価法として、中間中胚葉の特異的マーカー遺伝子 OSR1 の抗体染色像の画像解析による発現細胞数の定量化システムを構築する。さらに、核内転写因子である OSR1 の遺伝子座に緑色蛍光蛋白質 (GFP) を導入したレポーターヒト iPS 細胞株を樹立し、フローサイトメトリーを用いて誘導された OSR1 陽性細胞を生存させたまま単離し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析や免疫不全マウス腎被膜下やマウスおよびニワトリ胚組織への移植実験を行い、生体内の中間中胚葉と同様の生理学のおよび発生生物学的機能を有するか否かを検証する。また、確立された分化誘導プロトコルが、ヒト ES 細胞やマウス iPS 細胞においても同様に中間中胚葉を効率よく誘導するか否かを検証する。

## 4. 研究成果

腎疾患に対する再生医療の開発は、医学的のみならず医療経済的にも急務であるが、現在までのところ、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞から試験管内で腎臓系譜の細胞を選択的に分化誘導する方法は確立されていない。この目的の達成のため、まずヒト iPS 細胞から腎臓を派生させる胎生組織である「中間中胚葉」の細胞を分化誘導する方法の開発を行った。そして、独自の増殖因子の組み合わせ処理にて中間中胚葉を 90% 以上の高効率にて分化誘導する方法を確立した。次に中間中胚葉のマーカー遺伝子である核内転写因子 OSR1 のレポーターヒト iPS 細胞株の樹立に成功し、

フローサイトメトリーを用いてヒト iPS 細胞由来の OSR1 陽性中間中胚葉細胞を単離することを可能とした。そして、それらの細胞と Osr1-GFP ノックインレポーターマウスの胎児から単離された Osr1 陽性中間中胚葉とを比較解析することによって、両者が類似した遺伝子発現を示すことが判明した。また、ヒト iPS 細胞から誘導された OSR1 陽性細胞を単離し、試験管内での長期培養や免疫不全マウス精巣への移植によって、それらの細胞が腎臓、副腎皮質、生殖腺など中間中胚葉由来臓器の構成細胞に分化可能であることも確認した。さらに、器官培養の系においてマウス胎児腎細胞との共培養を行ったところ、三次元の尿細管様構造を形成することも明らかになった。しかし、申請者らが開発したヒト iPS 細胞から中間中胚葉への分化誘導法は、ヒト ES 細胞には同様に有効であるが、マウス iPS 細胞に対しては有効ではないことも判明した。以上、ヒト iPS 細胞から生体内のものと同等の発生生物学的機能を有する中間中胚葉細胞を作製する方法を確立した。本研究の成果は、腎臓のみならず副腎や生殖腺など中間中胚葉由来臓器の再生医療の進展に大いに貢献するものであると考える。

## 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 12 件)

1. Osafune K. iPS cell technology-based research for the treatment of diabetic nephropathy. *Seminars in Nephrology*. 査読有. 2012. in press.
2. Osafune K. *In vitro* regeneration of kidney from pluripotent stem cells. *Experimental Cell Research*. 査読有. 2010, 316(16): 2571-7. DOI:10.1016/j.yexcr.2010.04.034
3. 長船 健二. iPS細胞を用いた糖尿病腎症に対する再生医療の開発. 内分泌・糖尿病・代謝内科 (科学評論社). 査読無. 印刷中.
4. 長船 健二. iPS細胞を用いた腎疾患治療薬の開発研究. 遺伝子医学MOOK (メディカルドゥ社). 査読無. 印刷中.
5. 長船 健二. iPS細胞を用いた糖尿病性腎症の最新治療. 日本臨床・最新臨床糖尿病学 (下) (日本臨床社). 査読無. 印刷中.
6. 長船 健二. iPS細胞: 腎臓への分化誘導. 腎と透析 (東京医学社). 査読無. 72 (2): 209-13, 2012.
7. 長船 健二. iPS細胞技術を用いた腎再生と臨床応用. 医学のあゆみ (医歯薬出版). 査読無. 239(14): 1379-84, 2011.
8. 長船 健二, 山中 伸弥. 人工多能性幹 (iPS) 細胞の樹立とその臨床応用. 最新内科学 (西村

書店) . 査読無. 印刷中.

9. 長船 健二. iPS細胞を用いた腎臓再生と新規腎疾患モデルの作製. 医学のあゆみ (医歯薬出版) . 査読無. 236(13) : 1191-2, 2011.

10. 長船 健二. 幹細胞から腎臓への分化誘導. Annual Review 腎臓2011 (中外医学社) . 査読無. 67-73, 2011.

11. 長船 健二. iPS細胞技術を用いた腎臓再生医療の開発. 腎と透析 (東京医学社) . 査読無. 69 (3) : 368-73, 2010.

12. 長船 健二. iPS細胞作製の最先端と作製されたiPS細胞株間の特性差異についての最新の知見. 実験医学増刊 (羊土社) . 査読無. 28(2) : 55-61, 2010.

[学会発表] (計 13 件)

1. 長船 健二. シンポジウム1. 腎臓を創る一乗り越えるべき課題とその方策. 腎臓再生に向けたヒトiPS細胞から中間中胚葉への高効率分化誘導法の開発. 第55回日本腎臓学会学術総会. 2012年6月1日. パシフィコ横浜 (神奈川県) .

2. 前 伸一、庄野 朱美、塩田 文彦、小川 誠司、McMahon Andrew P.、山中 伸弥、長船 健二. ヒトiPS細胞から腎構成細胞に分化しうる中間中胚葉への高効率分化誘導法の確立. 第55回日本腎臓学会学術総会. 2012年6月1日. パシフィコ横浜 (神奈川県) .

3. 荒岡 利和、豊原 敬文、塩田 文彦、前 伸一、黒瀬 裕子、太田 章、山中 伸弥、長船 健二. 低分子化合物を用いたヒトiPS細胞から中間中胚葉への高効率分化誘導法の開発. 第55回日本腎臓学会学術総会. 2012年6月1日. パシフィコ横浜 (神奈川県) .

4. 前 伸一、長船 健二. ヒト多能性幹細胞から腎臓系譜に分化する中間中胚葉細胞の高効率な分化誘導法の確立. 日本組織培養学会第85回大会. 2012年5月17-18日. 京都大学百年時計台記念館百周年記念ホール (京都) .

5. 長船 健二. 教育講演2. 腎再生研究の進歩. 第41回日本腎臓学会西部学術大会. 2011年9月30日. あわぎんホール (徳島県郷土文化会館) (徳島) .

6. 長船 健二. シンポジウム1. iPS細胞の臨床応用を目指して. iPS細胞技術を用いた腎臓再生医療の開発. 第21回日本サイトメトリー学会学術集会. 2011年6月25日. 京都市国際交流会館 (京都) .

7. Mae SI, Shono A, Shiota F, Yasuno T, Nishimura N, Arai S, Takahashi K, Matsubara A, Nakayama N, Ogawa S, McMahon AP, Yamanaka S, Osafune K. Induction and monitoring of intermediate mesoderm from human iPSCs and ESCs. 9th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research. June15-18, 2011. Metro Toronto Convention Centre, Toronto, Ontario,

Canada.

8. 長船 健二. よくわかるシリーズ1. iPS細胞. 第54回日本腎臓学会学術総会. 2011年6月16日. パシフィコ横浜 (神奈川県) .

9. 長船 健二. iPS細胞技術を用いた糖尿病と糖尿病性腎症の解決に向けた研究. Leading-edge Lectures-1. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会. 2011年5月20日. さっぽろ芸術文化の館 (北海道) .

10. 長船 健二. iPS細胞技術を用いた慢性腎臓病・糖尿病・肝不全に対する再生医療開発に向けた研究. ミニシンポジウム4. 内分泌代謝疾患と再生医療. 第84回日本内分泌学会学術総会. 2011年4月22日. 神戸国際展示場 (兵庫) .

11. 長船 健二. シンポジウム4. 最先端研究. iPS細胞技術を用いた腎臓再生医療の開発. 第40回日本心臓血管作動物質学会. 2011年2月5日. かがわ国際会議場・サンポートホール高松 (香川) .

12. 前 伸一、長船 健二、佐々木 克典. 低分子化合物を用いたマウスES細胞由来中間中胚葉の分化誘導. 第42回日本臨床分子形態学会総会・学術総会. 2010年9月24日. 東レ総合研修センター (静岡) .

13. 長船 健二. シンポジウム2. 臨床応用に向けた腎臓再生. 幹細胞から腎臓への分化の戦略. 第53回日本腎臓学会学術総会. 2010年6月16日. 神戸ポートピアホテル (兵庫) .

[図書] (計 1 件)

1. Osafune K and Yamanaka S. Elsevier. Stem cells in regenerative processes; Induced pluripotent stem cells. Regenerative nephrology, 2010, pp203-15.

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

1. 名称 : ヒト多能性幹細胞から中間中胚葉細胞への分化誘導方法

発明者 : 長船 健二/荒岡 利和

権利者 : 国立大学法人京都大学

種類 : 特許

番号 : 61/577, 345

出願年月日 : 2011/12/19

国内外の別 : 国外

2. 名称 : 相同組換えにより遺伝子改変された多能性幹細胞の簡便な検出法

発明者 : 山中 伸弥/長船 健二

権利者 : 国立大学法人京都大学

種類 : 特許

番号 : 特願 2011-204950

出願年月日 : 2011/12/19

国内外の別 : 国内

3. 名称：ヒト多能性幹細胞から中間中胚葉細胞への分化誘導方法

発明者：長船健二/梶原 正俊/前 伸一

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：61/451,825

出願年月日：2011/7/21

国内外の別：国外

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長船 健二 (OSAFUNE KENJI)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：80502947

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：