

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16227

研究課題名(和文) iPS細胞から誘導した腹膜中皮細胞移植治療の有用性の検討

研究課題名(英文) Peritoneal mesothelial cell transplantation therapy derived from iPS cells

研究代表者

加藤 憲 (Kato, Tadashi)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：20644305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜中皮細胞(PMC)の発生の系譜に沿って、まず側板中胚葉(LPM)ステージまで分化させてからPMCへ誘導したところ、誘導したPMC(iPMCs)はPMCマーカーの蛋白質であるCK-18、MSLN、WT1が発現していた。さらにiPMCsを継代すると、低分子には透過性を示すが、高分子には低透過性しか示さない均一な成熟細胞集団が形成され、細胞形態も初代培養PMCと類似していた。また物質の半透過性も有しており、腹膜透析における腹膜機能低下も改善し得ることが期待できる結果であった。メチルグリオキサールを用いることによって腹膜機能低下モデルマウスに対するiPMCs投与の有用性の検討が今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今まで生理学的機能を有したPMCを誘導した報告がなく、細胞移植による効果が期待できる。さらにPMCの物質透過における分子細胞学的機序や障害因子もあまり分かっていないが、今回申請者はヒトiPS細胞からPMCを誘導することで、その評価を可能とした。iPS細胞からPMCを誘導した報告自体が未だないが、予備実験において誘導法は確立している。さらにその手法を応用して細胞移植を行うことや、PMCの分子細胞学的機序を検討することを目的としており非常に新規性が高い。腹膜透析患者における再生医療や、疾患モデル、腹膜透析液を改良するツールとして今後の治療に対し大きく貢献すると考える。

研究成果の概要(英文)：Following the developmental lineage of PMCs, they were first differentiated to the lateral plate mesoderm (LPM) stage and then induced to PMCs. The induced PMCs (iPMCs) expressed the PMC marker proteins CK-18, MSLN, and WT1. Further passaging of iPMCs resulted in the formation of a uniform mature cell population that was permeable to small molecules but only low permeable to macromolecules, and the cell morphology was similar to that of primary cultured PMCs. The cell morphology was similar to that of primary cultured PMCs, and the semi-permeability of the material was promising for improving peritoneal dysfunction in peritoneal dialysis. Future work will focus on the usefulness of iPMCs administration to a mouse model of peritoneal hypofunction by using methylglyoxal.

研究分野：腎臓内科

キーワード：iPS細胞 腹膜中皮細胞 腹膜透析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腹膜中皮細胞(PMC)は扁平上皮様細胞の単層構造を呈し、腹腔内で腹膜中皮を形成する。腹膜中皮細胞層は微生物や腫瘍細胞に対するバリア機能を果たすことが知られている(Mutsaers SE. et al. *Respirology* 2002;7(3):171-191)。また、腹膜中皮は、透過性バリアとしても機能するため、この性質を利用し、腹膜透析が行われている。しかし、高浸透圧、高血糖、および酸性溶液である透析液に長期的に曝露された腹膜は、しばしば軽度の慢性炎症および腹膜の損傷を引き起こし、次第に中皮細胞が傷害され、線維症を起こすことがある(Krediet RT. et al. *Kidney Int* 1999;55(1):341-356)。その結果、被嚢性腹膜硬化症(EPS)が発症する場合がある。EPS の発症は稀ではあるが、腹膜透析の致命的な合併症であり、腹膜透析の中止と血液透析への移行を余儀なくされる(Moinuddin Z. et al. *Front Physiol* 2014;5:470)。EPS の原因として癒着があり、腹膜透析液における浸透圧物質に腹膜中皮細胞が曝露されることによって生じる。癒着を防ぐための解決策の 1 つは、漿膜修復の促進を補助することである(Mutsaers SE. et al. *Fertil Steril* 2016;106(5):1018-1024)。腹膜修復を補助する方法として、非ヒト動物モデルの腹膜の損傷部位に中皮細胞を注入する方法が報告されており、注入した中皮細胞は中皮が再生される際、その部位に付着して組み込まれるといわれている(Hekking LH. et al. *Perit Dial Int* 2003;23(4):323-330)。

今回、申請者の研究グループは新規に iPS 細胞から生理的機能をもった PMC の誘導法を開発した。この誘導法を用いることで多量の PMC を得ることが出来るため、腹膜中皮の損傷を予防または回復させることを目的とした細胞移植実験を行うことが可能となる。さらに、誘導した PMC を用いることで、腹膜中皮の物質通過能の機序や障害する物質を解析することも容易となり、既存の腹膜透析液を改良するための一助となる in vitro での解析も可能となる。

本研究における学術的問いは「iPS 細胞から誘導した PMC を腹腔内投与することで、生着し腹膜の障害を予防・回復することが出来るか。また腹膜の透過性の機序およびそれに関わる因子は何か。」ということである。それらを解明するため iPS 細胞から誘導した PMC を健常マウスおよび EPS モデルマウスの腹腔内へ投与し腹膜の性状を評価する。

2. 研究の目的

本研究では iPS 細胞を用いた腹膜中皮の再生および腹膜中皮への障害に影響を及ぼす因子を解明することを目的とする。今まで生理学的機能を有した PMC を誘導した報告がなく、細胞移植による効果が期待できる。さらに PMC の物質透過における分子細胞学的機序や障害因子もあまり分かっていないが、今回申請者はヒト iPS 細胞から PMC を誘導することで、その評価を可能とした。iPS 細胞から PMC を誘導した報告自体が未だないが、予備実験において誘導法は確立している。さらにその手法を応用して細胞移植を行うことや、PMC の分子細胞学的機序を検討することを目的としており非常に新規性が高い。腹膜透析患者における再生医療や、疾患モデル、腹膜透析液を改良するツールとして今後の治療に対し大きく貢献すると考える。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞からの PMC 誘導法の確立

PMC は発生段階において中胚葉由来の臓器であり初期中胚葉、側板中胚葉となり、そこから PMC や心外膜へ分化する過程をたどる。過去の文献において、iPS 細胞から心外膜を誘導報告があるため(Dharini Iyer. et al. *Development* 142: 1528-1541, 2015)、それと同様の手法を用いて iPS 細胞から側板

中胚葉まで誘導し、その後 PMC へ誘導する方法を検討する。

(2) 誘導 PMC の腹膜への生着能の評価

GFP または TdTomato などの標識をプラスミドベクターで iPS 細胞へ導入する。導入した iPS 細胞から腹膜中皮細胞を誘導し、生理食塩水で懸濁して、マウス腹腔内へ投与する。移植細胞数は 1×10^6 程度を 1mL の生理食塩水で懸濁したものから開始し、忍容性をみて細胞数を増加させ必要量を検討していく。健常なマウスに生着することが確認出来た場合、小切開を腹膜に加えることで物理的に腹膜に障害を与えた上で誘導した PMC の懸濁液を腹腔内へ投与し、細胞移植による創傷治癒効果があるかどうかをみる。

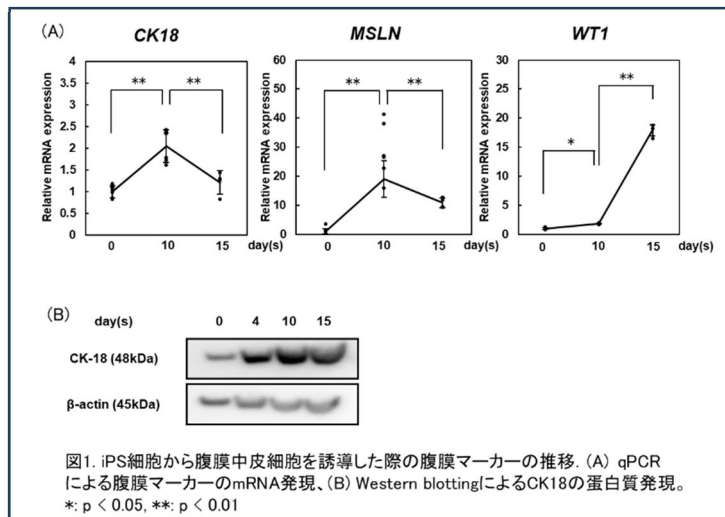
(3) EPS モデルマウスの作成および誘導 PMC による予防・治療効果および機序の評価

メチルグリオキサールを腹腔内投与することで EPS モデルマウスを作成した報告があり、それに則ってモデルマウスを作成し、腹膜中皮細胞移植により回復がみられるかを検討する。まず予備実験として 20mM メチルグリオキサールを 0.1~1mL 程度腹腔内投与し、健常マウスと腹膜厚を比較することでモデルマウスが作成できていることを確認する。

4. 研究成果

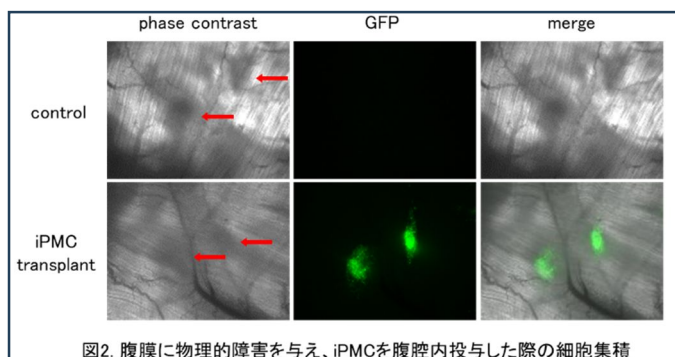
(1) ヒト iPS 細胞からの PMC 誘導法の確立

iPS 細胞から心外膜を誘導した過去の報告を参考に iPS 細胞から側板中胚葉まで誘導した(Dharinlyer. et al. Development 142: 1528-1541, 2015)。その後複数の分化誘導法を検討し、腹膜中皮細胞マーカーである CK-18、Mesothelin、WT1 が上昇する誘導法を同定した。本誘導法を用いることにより、各分化段階における mRNA 発現が発生段階に即して認められており、本手法によってより生体発生に適合した形で分化誘導されていることを確認した(図 1)。



(2) 誘導 PMC の腹膜への生着能の評価

iPS 細胞に GFP をプラスミドベクターで導入した。導入した iPS 細胞から腹膜中皮細胞を誘導し、生理食塩水で懸濁して、マウス腹腔内へ 1×10^7 個投与したが、健常なマウスに生着することは確認出来なかった。障害を加えることで生着を得られる可能性があると考え、まず物理的に腹膜に障害を与えた上で誘導した PMC(iPMC)の懸濁液を腹腔内へ投与した。腹膜に小切開を加えた後に iPMC の懸濁液を腹腔内へ投与したが、切開部より液が漏れてしまい評価困難であった。そのため創部をさらに



小さくするため 20G 針で穿刺をした後に iPMC 懸濁液を投与したところ、腹膜障害部位のみに iPMC が集積していることが確認出来た(図 2)。

(3) EPS モデルマウスの作成および誘導 PMC による予防・治療効果および機序の評価

BALB/c Slc-nu/nu を用いて、まず 20mM メチルグリオキサールを腹腔内投与した後に腹膜機能を行った。投与量として 2mL を連日腹腔内投与したが忍容性がなく生存しなかったため、40mM メチルグリオキサールを週 2 回 1mL ずつ 3 週間にわたって投与した。腹膜機能をみるために腹膜平衡機能検査を行った。吸入麻酔下で 2.5%グルコースを溶解した生理食塩水 5mL をマウス腹腔内へ投与し、1 時間後に投与した液を採取してグルコース濃度の変化率を評価した。結果メチルグリオキサール投与群においてグルコース濃度が有意に低く、腹膜機能が低下していることが確認出来た。次に 1×10^7 の細胞を投与し、腹膜機能が回復するかどうか評価したが、有意な変化は認められなかった(図 3)。

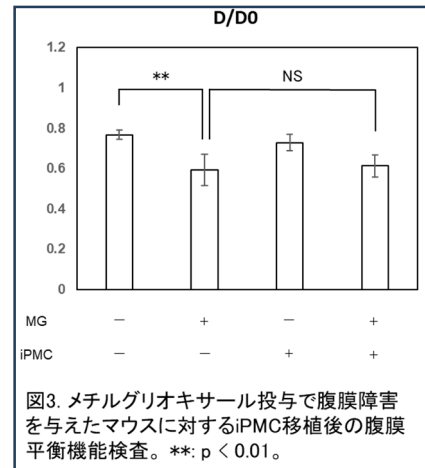


図3. メチルグリオキサール投与で腹膜障害を与えたマウスに対するiPMC移植後の腹膜平衡機能検査。**: p < 0.01。

(4) 今後の展望と課題

現在我々の作成したメチルグリオキサールによる腹膜障害モデルマウスでは腹膜機能障害が軽度であったため、腹膜中皮細胞移植に対する効果が十分にみられなかった可能性がある。また今回使用したマウス種が BALB/c Slc-nu/nu という T 細胞の機能をおとした免疫不全マウスであり、生着が不十分であった可能性も考えられる。そのため、化学障害モデルマウス作成の протоколを変更しメチルグリオキサール投与量を増量することでより重度の腹膜機能障害をおこし変化をみやすくすること、およびマウス種を C.B-17/lcr-scid/scidJcl という T 細胞、B 細胞ともに機能をおとしたものを用いることでより生着率を上げることで腹膜機能の回復がみられるか検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤 憲, 本田 浩一, 人見 浩史
2. 発表標題 腹膜中皮細胞再生医療の展望
3. 学会等名 第68回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤 憲, 本田 浩一, 人見 浩史
2. 発表標題 ヒトiPS細胞から生物学的機能を有する腹膜中皮細胞の誘導
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023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
研究協力者	人見 浩史 (Hitomi Hirofumi) (70346641)	関西医科大学 (34417)	

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
---------	---------