

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591183

研究課題名(和文) ヒト腎臓細胞由来 iPS 細胞による次世代人工腎臓作成の試み

研究課題名(英文) Artificial kidney established by human kidney derived iPS cells

研究代表者

菱川 慶一 (Hishikawa, Keiichi)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50255460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、文部科学省再生医療の実現科プロジェクト-iPS拠点事業において、ヒト腎臓由来iPS細胞には腎臓細胞としての細胞記憶が残されており、これにはDNAメチル化の異なる遺伝子群が関与していることを見いだした。本研究では腎臓由来iPS細胞の細胞記憶を担うターゲット遺伝子を同定し、ヒトiPS細胞から効率良く腎臓構成細胞を分化誘導する方法の確立した。第二にヒトiPS細胞から分化誘導された腎臓構成細胞を用い、Lanzaらの報告したデバイスを用いてSCIDマウスに移植し、次世代人工腎臓作成の為に基礎データ収集を試みたが、Lanzaらの報告の再現は困難であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we firstly identified key genes that determine memory of kidney derived iPS cells. By using these genes, we induced kidney cells efficiently from iPS cells. Finally, we tried to establish artificial kidney that was reported by Lanza et al. However, we could not reproduce the device by using human kidney derived iPS cells.

研究分野：再生医学

キーワード：幹細胞 iPS cells メチル化

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、文部科学省再生医療の実現プロジェクト-iPS 拠点事業において、ヒト腎臓由来 iPS 細胞には腎臓細胞としての細胞記憶が残されており、これには DNA メチル化の異なる遺伝子群が関与していることを見いだした。一方、Lanza らはクローン牛を用い、クローン腎臓の構成細胞を埋め込み型デバイスへ播種し、ウシにおける埋め込み型腎臓ユニットの作成に成功している (Nature Biotechnology, 2002)。即ち、ヒト iPS 細胞から分化誘導された腎臓構成細胞を用いれば、Lanza らの報告したデバイスを用いて、次世代人工腎臓作成が理論上可能である。

2. 研究の目的

自己の腎臓構成細胞が大量に得られれば、ハイブリッド型や埋め込み型等の次世代人工腎臓の開発が可能となるが、ヒト腎臓細胞を一般的な培養方法で大量に得る事は困難である。一方、ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞と違い、患者自身から樹立することが可能である。例えば、申請者の再生医療の実現化プロジェクト(東京大学 iPS 拠点事業)における経験から、腎生検で得られる少量の組織から、ヒト腎臓由来 iPS 細胞は十分樹立可能である。Lanza らのクローン牛の報告をヒトに応用する場合、患者腎臓由来 iPS 細胞から大量の腎臓構成細胞を分化誘導すれば、クローン人間を作成することなく、患者自身の腎臓構成細胞が得られ、ハイブリッド型や埋め込み型次世代人工腎臓の開発の為に条件を整うと言える。本研究では3年間の研究期間の間に、1)ヒト腎臓由来 iPS 細胞から高効率に腎臓構成細胞を分化誘導する条件を最適化し、2)分化誘導した腎臓構成細胞を Lanza らと同様のデバイスへ蒔き、小動物(SCID マウス)に埋め込むことにより、次世代人工腎臓作成を目的とする。

3. 研究の方法

A: ヒト腎臓細胞由来 iPS 細胞の樹立 (連携研究者中内との共同研究)

- 1、**ウイルス産生**: 山中4因子を導入する為に Plat-E 細胞に4因子のベクターと pSVGL-1 を transfection し、48時間御に得られたウイルスを回収する。
- 2、**遺伝子導入**: Polybrene 4 μ g/ml の存在下で、24時間ウイルス液中でヒト腎臓細胞を培養し、4因子を導入する。遺伝子を導入したヒト腎臓細胞は6日間維持培養用の培地で培養し、6日目に MEF (mouse embryonic fibroblast)へ播種し、その後 ES 細胞用培地で培養する。
- 3、**コロニー選択**: 一日おきに培地を交換し、14-21日コロニー形成を観察し、メサンギウム細胞、近位尿細管細胞それぞれから24コロニーを選択する。
- 4、**クローンの選択**: 得られたクローンのコ

ロニーの未分化能を確認するため、ALP、Oct、Nanog、SSEA-3、SSEA-4、TRA1-60、TRA1-81 の染色を行う。24コロニーのうち、染色が良好なクローンを12個ずつ選択する。

- 5、**未分化能の確認**: 選択したクローンの未分化能を PCR (Oct, Nanog, Rex-1)、FACS (Oct, SSEA-3, SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81) で評価し、メサンギウム細胞、近位尿細管細胞それぞれから、12クローンのうち、上位6クローンを選択する。

B: 新規に樹立したヒト腎臓細胞由来 iPS 細胞の包括的遺伝子発現解析 (連携研究者油谷との共同研究)

未分化マーカーの発現確認のみでは新規に樹立したヒト腎臓由来 iPS 細胞12クローンの初期化評価は不十分であり、包括的遺伝子発現により評価を行う。申請者は iPS 拠点事業において、ヒト ES 細胞 (KhES-1,2,3) および京大山中研究室で樹立された iPS (253G1) が非常に近いマイクロアレイプロファイルを示す事を確認しており、新規に樹立した iPS 細胞とこれらの遺伝子発現を比較することにより、正しく初期化されているか検証する。マイクロアレイ解析は連携研究者油谷の指示により実施する。

- 1、新たに樹立した12クローンから RNA を抽出し、Affimetrix 社 Human Genome U133A Plus2.0 によりマイクロアレイ解析を行う。
- 2、1で得られた発現プロファイルの Hierarchical clustering を行い、初期化を評価する。

C: 包括的 DNA メチル化解析による腎臓由来 iPS における細胞記憶規定遺伝子の同定

準備段階の研究において、ヒト腎臓由来 iPS 細胞は線維芽細胞由来 iPS 細胞と異なり、分化誘導条件 (activin+retinoic acid) で Sac を形成し、Sac 形成時において、腎臓系統の遺伝子が高発現していることが明らかとなっている。ヒト線維芽細胞由来 iPS、ヒト腎臓細胞由来 iPS の未分化状態、Sac 形成状態での包括的 DNA メチル化解析を行い、腎臓系統への分化において、メチル化が解除される遺伝子、メチル化が維持される遺伝子上位5遺伝子を同定する。

A: 腎臓への分化誘導決定遺伝子の選定

- 1、腎臓由来 iPS 細胞を activin+retinoic acid で分化誘導し、Sac 形成時点で RNA を抽出し、腎臓系統マーカー発現を PCR で確認する。
- 2、ヒト線維芽細胞由来 iPS 細胞 (12クローン)、ヒト腎臓由来 iPS 細胞 (12クローン) の未分化状態 (feeder 上で培養) および PCR で腎臓系統マーカー発現を確認した Sac 形成状態での DNA を抽出する。
- 3、得られた DNA を Illumina 社 Human Methylation27 を用いて Infinium 解析を行い、腎臓系統へ分化誘導の際、メチル

化が解除される遺伝子、維持される遺伝子を同定する。

D:腎臓由来 iPS 細胞から腎臓構成細胞への分化誘導

Infinium 解析で得られた遺伝子を特異的かつ強制的に OFF あるいは ON とすることにより、腎臓由来 iPS 細胞から効率良く腎臓構成細胞を分化誘導する。さらに、分化誘導された細胞を既報のデバイスに播種し、SCID マウスへ移植することにより、次世代人工腎臓として機能するか評価する。

- 1、 脱メチル化(活性化)すべき 5 遺伝子に関しては、iPS 樹立時と同様に PlatE 法を用い、レトロウイルスにより強制発現させる。メチル化が維持される(不活性化) 5 遺伝子については、siRNA を用いて遺伝子発現を抑制する。
- 2、 1 の処置後、2-4 週間培養し、腎臓系統のマーカー発現を real time PCR で評価し、siRNA およびレトロウイルスの条件を最適化する。
- 3、 2 で最適化された条件で、更に 2-8 週間分化誘導を行い、組織染色により腎臓構成細胞への分化を検証する。
- 4、 3 で得られた細胞を Lanza らの報告した以下のデバイスへ播種し、SCID マウスへ移植する。移植後 4-8 週で、リザーバ内の尿産生、ユニット内の腎臓組織形成を検証する。

4. 研究成果

A: ヒト腎臓細胞由来 iPS 細胞の樹立

メサンギウム細胞、近位尿細管細胞それぞれから、12 クロノンを得た、上位 6 クロノンを選択した。

B: 新規に樹立したヒト腎臓細胞由来 iPS 細胞の包括的遺伝子発現解析

新規に樹立した iPS 細胞とこれらの遺伝子発現を比較し、新たなクロノンが正しく初期化されている事を確認した。

C: 包括的 DNA メチル化解析による腎臓由来 iPS における細胞記憶規定遺伝子の同定

ヒト線維芽細胞由来 iPS、ヒト腎臓細胞由来 iPS の未分化状態、Sac 形成状態での包括的 DNA メチル化解析を行い、腎臓系統への分化において、メチル化が解除される遺伝子、メチル化が維持される遺伝子上位 5 遺伝子を同定した。

D:腎臓由来 iPS 細胞から腎臓構成細胞への分化誘導

C で得られた遺伝子を特異的かつ強制的に OFF あるいは ON とすることにより、腎臓由来 iPS 細胞から効率良く腎臓構成細胞を分化誘導する事に成功した。一方、分化誘導された細胞を既報のデバイスに播種し、SCID マウスへ移植することにより、次世代人工腎臓

として機能するか試みたが、生着せず、今後の課題が残された。

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 5 件)

Basic helix-loop-helix transcriptional factor MyoR regulates BMP-7 in acute kidney injury. Kamiura N, Hirahashi J, Matsuzaki Y, Idei M, Takase O, Fujita T, Takato T, Hishikawa K. Am J Physiol Renal Physiol. 2013 May 1;304(9):F1159-66.

- 2 Immunomodulation with eicosapentaenoic acid supports the treatment of autoimmune small-vessel vasculitis.' Hirahashi J, Kawahata K, Arita M, Iwamoto R, Hishikawa K, Honda M, Hamasaki Y, Tanaka M, Okubo K, Kurosawa M, Takase O, Nakakuki M, Saiga K, Suzuki K, Kawachi S, Tojo A, Seki G, Marumo T, Hayashi M, Fujita T. Sci Rep. 2014 Sep 18;4:6406.

[学会発表](計 10 件)

第 13 回日本再生医療学会総会 2014 年 3 月 4 日(火)~6 日(木)(国立京都国際会館)

「腎上皮細胞由来 iPS 細胞と線維芽細胞由来 iPS 細胞の比較による腎系統特異的分化誘導法の検討」3 月 4 日(火)

高瀬 敦、出射 真奈、宮本 寛治、吉川 真弘、高戸 毅、菱川 慶一

第 14 回日本抗加齢医学会総会(大阪国際会議場)2014 年 6 月 6 日(金)~8 日(日)

「Epigenetic Memory を利用した腎上皮細胞由来 iPS 細胞の腎系統特異的分化誘導法の試み」高瀬 敦、出射 真奈、高戸 毅、南学 正臣、菱川 慶一

第 14 回日本再生医療学会総会(パシフィコ横浜)2015 年 3 月 19 日(木)~21 日(土)

「腎臓由来 iPS 細胞を用いた 2 つの腎系統特異的分化誘導法の検討」高瀬 敦、辻村 太郎、出射 真奈、宮本 寛治、吉川

真弘、南学 正臣、高戸 毅、菱川 慶一

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

菱川慶一 (HISHIKAWA, Keiichi)

東京大学・大学院医学研究科・特任准教授

研究者番号：50255460

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

藤田敏郎 (FUJITA, Toshiro)

東京大学・先端研・特任教授

研究者番号：10114125

中内啓光 (NAKAUCHI, Hiromitsu)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：40175485

油谷浩幸 (ABURATANI, Hiroyuki)

東京大学・先端研・教授

研究者番号：10202657