

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2011～2012  
課題番号：23790937  
研究課題名(和文) 腎不全治療への臨床応用を目指したヒト多能性幹細胞から腎前駆細胞への分化誘導  
研究課題名(英文) Development of differentiation methods from human pluripotent stem cells into renal progenitor cells  
研究代表者  
豊原 敬文 (TOYOHARA TAKAFUMI)  
京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員  
研究者番号：60594182

## 研究成果の概要(和文)：

研究期間中に、申請者はOSR1-GFP knock-in human iPS cellのSIX2遺伝子座にtdTomatoを相同組換え法によりknock-inしたヒトiPS細胞ダブルレポーター株を樹立し、ヒト多能性幹細胞由来中間中胚葉から腎前駆細胞への分化誘導プロトコルの確立に関して、化合物や成長因子の組み合わせによって約30%の腎前駆細胞を作製することに成功した。新たに開発した誘導プロトコルを用いて作製した腎前駆細胞が生体内腎前駆細胞と同様の遺伝子発現や発生生物学的機能を有することを確認した。

## 研究成果の概要(英文)：

During the study period, we have generated double reporter human iPSC lines (OSR1-GFP/SIX2-tdTomato double knock-in hiPSC lines). We have also established a differentiation protocol for inducing human OSR1(+) IM cells into SIX2(+) cells using a combinational treatment of growth factors, which produces up to 30% SIX2(+) cells. These SIX2(+) cells expressed other marker genes for nephron progenitors and have similar developmental potential to those in embryos.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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、腎前駆細胞、SIX2

## 1. 研究開始当初の背景

CKD (chronic kidney disease; 慢性腎臓病) は世界中で人口の 10%を超えると報告されている (Go, A. S. *et al.*, 2004)。CKD 患者では尿毒症物質が蓄積して高血圧、腎臓障害の原因となり、予後を増悪させるため (Zoccali, C. *et al.*, 2001)、新たな腎不全物質の排泄方法の必要性が指摘されてきた。申請者は、主に腎近位尿細管に存在するヒト腎臓特異的有機アニオントランスポーターSLC04C1 が腎不全物質を排泄し、高血圧や心肥大を是正する重要なトランスポー

ターであることを初めて明らかとした (Toyohara, T. *et al.*, 2009)。

さらに臨床応用を目指し、高脂血症薬であるスタチンが、SLC04C1 の発現を増強すること、腎不全モデルラットにスタチンを投与すると SLC04C1 の発現が増強し、腎不全物質の排泄が増加することを明らかとし、臨床での応用を模索する段階に至っている。

しかし、げっ歯類や培養細胞ではトランスポーターの発現がヒトと異なっている事が報告されており、臨床応用のためには、ヒトの生理的な条件で SLC04C1 の動態を検討する

ことが望ましい。そこで、申請者は、様々な種類の細胞に分化できるヒト ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞から SLC04C1 を発現する腎尿細管細胞を作製することで、申請者の行ってきた尿毒症物質の排泄機構の詳細な検討及び臨床応用が可能となるとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

発生生物学の知見によると、腎臓は初期の胚葉の一種である中間中胚葉から発生する (Mugford, J. W. *et al.*, 2008)。さらに、研究協力者である長船らによってマウスの胎児腎臓に成体腎臓を構成する糸球体、尿細管等の多種類の上皮細胞に分化しうる多能性前駆細胞が存在することも示されている (Osafune, K. *et al.*, 2006)。ヒトにおいてもほぼ同じ発生過程で腎臓が形成されることが予想されるので、ヒト多能性幹細胞から尿細管細胞を効率よく作製する際の重要なステップは、最初の多能性幹細胞から中間中胚葉 (腎臓と副腎皮質、生殖腺に分化する)、さらに、中間中胚葉から腎前駆細胞 (糸球体、尿細管細胞などに分化する) を選択的に形成することと考えられるが、その分化誘導法は未だに確立されていない。

中間中胚葉に最も早期かつ特異的な発現をするマーカー遺伝子の一つに転写因子 *Osr1* (Odd-skipped related 1) があり、lineage tracing 実験によって、*Osr1* 陽性細胞が実際に成体腎臓を構成するほぼすべての細胞に分化することが示されている (Mugford, J. W. *et al.*, 2008)。さらに、マウス胎児を用いた lineage tracing 実験によると、長船らが同定したマウス胎児の腎前駆細胞に最も特異的なマーカー遺伝子の一つは核内転写因子 *Six2* であることが知られている (Osafune, K. *et al.*, 2006; Self, M. *et al.*, 2006; Kobayashi A. *et al.*, 2009)。よって、ヒト多能性幹細胞から尿細管細胞を派生させる腎前駆細胞を分化誘導する際には、*SIX2* の発現を指標とすることが、適切なストラテジーであると考えた。

研究協力者の長船らは、既に *OSR1* 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 (*OSR1-GFP knock-in hiPS cell*) を樹立し、成長因子や低分子化合物を用いて、*OSR1* 陽性細胞を 90%以上の高効率で分化誘導することに成功している (Mae S. *et al.*, 2013)。

また、既報によると、ヒト ES 細胞から増殖因子及び化合物の組み合わせ処理を用いて試験管内で作製された膵臓の細胞培養系では、 $\beta$  細胞の重要な生理機能であるグルコ

ース刺激に対するインスリン分泌反応がほとんど認められないこと等、試験管内で作製された臓器細胞は生体内のものと一致しない性質を示す可能性が報告されている (D'Amour, K. *et al.*, 2006)。よって、ヒト多能性幹細胞から試験管内で腎臓細胞を作製する際にも、各ステップで作製された細胞 (中間中胚葉、腎前駆細胞) に関して、発生生物学的、生理学的機能などが、生体内のものと同じであるかを綿密に検証し、次のステップに移行するべきと考えた。

このため、申請者は

(1) ヒト多能性幹細胞から形成された *OSR1* 陽性中間中胚葉細胞から、*SIX2* 陽性腎前駆細胞を効率よく分化誘導するプロトコルを確立する。

(2) 分化誘導した *SIX2* 陽性腎前駆細胞の、発生生物学的、生理学的機能の綿密な検証を行う。

を、本研究期間の目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究期間に申請者は、大きく分けて、次の4つの研究方法を用いた。

(1) 増殖因子や低分子化合物を用いて「ヒト多能性幹細胞由来の中間中胚葉から腎前駆細胞」への分化誘導の最適化プロトコルを確立する。

(2) 誘導率の評価法として、*SIX2* 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、*SIX2* の遺伝子座に赤色蛍光蛋白質 (tdTomato) を導入したレポーターヒト iPS 細胞株を樹立する。

(3) ヒト多能性幹細胞より分化誘導した *SIX2* 陽性細胞が、生体内の腎前駆細胞と同様の生理学的および発生生物学的機能を有するか否かを検証する。フローサイトメトリーを用いて誘導された *SIX2* 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移植実験を行う。

(4) ヒト ES 細胞やマウス iPS 細胞においても、同じ分化誘導プロトコルが同様に機能するか否か検討する。

#### 4. 研究成果 <2011年度>

2011年度は(1) ヒト多能性幹細胞由来中間中胚葉から腎前駆細胞への分化誘導プロトコールの確立、(2) 腎前駆細胞マーカー遺伝子SIX2のレポーターiPS細胞株の樹立を目標とした。

##### (1) ヒト多能性幹細胞由来中間中胚葉から腎前駆細胞への分化誘導プロトコールの確立

研究協力者の長船らが開発した誘導法を用いてiPS細胞より分化誘導したOSR1陽性細胞に対して、当研究室が有する約40種類の増殖因子、および約8,000種類の低分子化合物を試し、SIX2陽性細胞の分化誘導剤の探索を行った。当初は抗ヒトSIX2抗体を用いた免疫染色法とイメージアナライザーを組み合わせて、抗ヒトSIX2免疫染色像の定量的解析方法を確立し、SIX2分化誘導剤の探索を行った。さらに、下記のSIX2-tdTomatoレポーター細胞株が完成してからは、より感度の高いレポーター細胞株を用いた高速スクリーニングを行っているが、明らかなSIX2分化誘導剤は発見できなかった。

##### (2) 腎前駆細胞マーカー遺伝子SIX2のレポーターiPS細胞株の樹立

OSR1-GFP knock-in human iPS cellのSIX2遺伝子座にtdTomatoを相同組換え法により knock-inしたヒトiPS細胞ダブルレポーター株を樹立した。このレポーター細胞株を胚様体形成による3次元培養法で分化誘導することで、5%前後のSIX2陽性細胞を単離することに成功し、Single cell RT-PCR、免疫染色法によりtdTomato陽性細胞にSIX2が発現することを確認した。

#### <2012年度>

2012年度は、2011年度に到達が困難であった(1) ヒト多能性幹細胞由来中間中胚葉から腎前駆細胞への分化誘導プロトコールの確立に加えて、(3) ヒト多能性幹細胞より分化誘導したSIX2陽性細胞が、生体内の腎前駆細胞と同様の生理学的および発生生物学的機能を有するか否かを検証した。さらに、フローサイトメトリーを用いて誘導されたSIX2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移植実験を行った。さらに、(4) ヒトES細胞やマウスiPS細胞においても、同じ分化誘導プロトコールが同様に機能するか否かを検討することを目標とした。

##### (1) ヒト多能性幹細胞由来中間中胚葉から腎前駆細胞への分化誘導プロトコールの確立

化合物や成長因子の組み合わせによって約30%の腎前駆細胞を作製することに成功した。

(3) ヒト多能性幹細胞より分化誘導したSIX2陽性細胞が、生体内の腎前駆細胞と同様の生理学的および発生生物学的機能を有するか否かの検証

フローサイトメトリーを用いて誘導されたSIX2陽性細胞を生存させたまま単離し、遺伝子発現解析や移植実験を行った。新たに開発した誘導プロトコールを用いて作製した腎前駆細胞が生体内腎前駆細胞と同様の遺伝子発現を有し、尿細管様構造の形成などの発生生物学的機能を有することを確認した。さらに移植実験でも成体腎組織に生着し、管腔構造を形成することを確認している。マイクロアレイ解析に関しては、誘導プロトコールの最適化を行ってから施行予定であり、準備はほぼ完了している。

(4) ヒトES細胞やマウスiPS細胞においても、同じ分化誘導プロトコールが同様に機能するか否かの検討

現在施行中の段階である。

研究期間全体として、iPS細胞から腎前駆細胞への分化誘導プロトコールの確立には成功し、作製した腎前駆細胞の評価も概ね実施あるいは準備を完了している。腎前駆細胞作製に関する本研究成果は、これまでに全く報告のない研究成果であり、非常に意義のある内容であると考えられる。

#### 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)

[学会発表] (計1件)

Takafumi Toyohara, Yukiko Yamagishi, Shin-Ichi Mae, Tatsuyuki Inoue, Toshikazu Araoka, Tomoko Kasahara, Shinya Yamanaka, Hidenori Nakajima, Kenji Osafune.

DEVELOPMENT OF DIFFERENTIATION METHODS FROM HUMAN IPSCS/ESCS INTO NEPHRON PROGENITOR CELLS

International Society for Stem Cell

Research 11th Annual Meeting

2013年06月12日～2013年06月15日

ボストン

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

豊原 敬文 (TOYOHARA TAKAFUMI)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：60594182

(2)研究協力者

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