

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591195

研究課題名(和文) 嚢胞性腎疾患の疾患モデル作製を目指したヒトiPS細胞から腎集合管への分化誘導

研究課題名(英文) Directed differentiation of collecting duct cells from human iPS cells towards the creation of novel in vitro models for cystic kidney diseases

研究代表者

長船 健二(Osafune, Kenji)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：80502947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞(人工多能性幹細胞)から腎細胞を選択的に分化誘導する方法は確立されていない。本研究では、常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)や常染色体劣性多発性嚢胞腎(ARPKD)など腎集合管に病変を生じる疾患に対する疾患モデルを作製するために、ヒトiPS細胞から集合管への分化誘導の開発を目指した。そして、増殖因子等の組み合わせ処理を用いてヒトiPS細胞から尿管芽を経て、効率は低いながらも集合管細胞を一部分化させることに成功した。今後、ヒトiPS細胞から集合管細胞への高効率分化誘導法を確立し、ADPKDやARPKDの患者由来iPS細胞を集合管に分化させることによって新規の疾患モデル作製を目指す。

研究成果の概要(英文)：The directed differentiation methods from human ES or iPS cells into renal lineage cells have not yet been established. In this study, we aimed to develop a differentiation protocol from human iPS cells into collecting duct cells in order to create disease models for autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) and autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). By using combinatorial treatments of growth factors, we partially succeeded in generating collecting duct cells from human iPS cells through intermediate mesoderm and ureteric bud. We will aim to establish an efficient differentiation method to generate collecting duct cells from human iPS cells and create novel in vitro disease models for ADPKD and ARPKD by differentiating the patient-derived iPS cells into collecting duct cells.

研究分野：腎臓再生

キーワード：腎臓 尿管芽 中間中胚葉 集合管 iPS細胞 ES細胞 ADPKD ARPKD

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約 30 万人に達しており、透析医療費は年間 1 兆 5 千億円を越え、実に全医療費の約 5% 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 千例程度と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。よって、腎不全の原因疾患に対する治療法開発やドナー腎臓不足に対する解決策の開発は急務である。

ADPKD や ARPKD など多発性嚢胞腎は、透析療法を必要とする末期慢性腎不全に至る原因疾患のうち 4 番目に頻度の高いものである。ADPKD は糸球体から集合管に至るネフロンのいずれの部位からも発生する嚢胞形成により、一方、ARPKD は集合管からの嚢胞形成により、腎機能が障害され末期腎不全に進行する難治性疾患である。マウスやラットなどの動物モデルを用いた研究が長年なされており治療薬の候補も複数同定されているが、根治的治療法の確立には至っていない。よって、ADPKD や ARPKD に対する動物モデルと相補的に使用できる新規疾患モデルの開発が望まれている。

ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞から分化誘導された特定細胞種の移植によって臓器機能の回復を図る再生医療が注目を集めている。また、細胞療法に加えて iPS 細胞を用いて臨床応用を目指す研究として「疾患モデル作製研究(disease modeling)」が盛んに研究されている。それは、難治性疾患の患者体細胞より樹立された疾患の発症に関与する遺伝情報を有する iPS 細胞(疾患特異的 iPS 細胞)を試験管内で罹患細胞種へ分化誘導することにより病態を模倣する疾患モデルを作製し、病態解析や治療薬探索を行う研究のことである。2008 年のハーバード大研究グループによる神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS) の報告にはじまり、現在までに約 60 の難治性疾患より疾患特異的 iPS 細胞が樹立されている。そして、申請者は既に ADPKD、ARPKD 患者からの疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、両疾患に合併する血管合併症や肝合併症である肝線維症に対する疾患モ

デル作製研究を行っている。しかし、ヒト iPS 細胞からの腎臓構成細胞への分化誘導法が確立されていないため、ADPKD、ARPKD 特異的 iPS 細胞から両疾患の主徴である腎嚢胞に対する試験管内疾患モデルを作製することは可能となっていない。

申請者は、ヒト ES 細胞から臓器を作製する技術と戦略を学んだハーバード大留学より帰国後、2008 年より京都大学 iPS 細胞研究所において、ヒト iPS 細胞を用いた腎臓再生を目指す研究室を主宰している。そして、申請者らは、既に腎臓再生の第一ステップとしてヒト iPS 細胞から腎臓を構成するほぼすべての細胞を派生させる胎生組織である中間中胚葉の細胞を 90% 以上の高効率で分化誘導する方法を開発した (Mae S. et al., 2013)。

申請者は、ヒト iPS 細胞由来の中間中胚葉から尿管芽や集合管細胞を分化誘導する方法を確立すれば、その分化誘導法を ADPKD、ARPKD 特異的 iPS 細胞に適用することによって、両疾患の主徴である腎嚢胞に対する新規の試験管内疾患モデルが作製できるのではないかとこの着想に至った。そして、特に本研究期間においては、ADPKD および ARPKD の腎嚢胞形成を模倣する疾患モデルを作製するために、ヒト iPS 細胞から両疾患に共通する罹患細胞種である腎集合管細胞を分化誘導する方法を確立することに焦点を絞る。

2. 研究の目的

腎臓発生の知見によると、中間中胚葉から「後腎間葉」と「尿管芽」と呼ばれる 2 つの胎生腎組織が発生し、その相互作用によって後腎間葉はネフロンのうち糸球体から遠位尿管芽までの部位に分化する。一方、尿管芽は集合管より下部の尿路系を構築する (Saxen L, 1987)。前述の通り申請者らは、ヒト iPS 細胞から中間中胚葉を高効率に分化誘導する方法を確立した。よって、集合管細胞を作製するためには、2 つのステップ (iPS 細胞由来中間中胚葉 尿管芽 集合管細胞) から構成される分化誘導法の確立が必要であると考えられる。

本研究期間には、「ヒト iPS 細胞由来中間中胚葉から尿管芽」および「尿管芽から集合管細胞」への分化誘導に焦点を絞り、それらのステップを効率よく分化誘導する方法を確立することと、試験管内でヒト iPS 細胞から作製された尿管芽と集合管細胞が生体内のものと同じ生理機能と発生生物学的機能を有するか否かを明らかにすることを行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞由来中間中胚葉から尿管芽マーカー遺伝子陽性細胞を分化誘導する方法の確立

マウスなどの発生生物学の知見によると、尿管芽に特異的に発現するマーカー遺伝子として転写因子 *Sall4* が挙げられる (Sakaki-Yumoto M. et al., 2006)。よって、ヒト iPS 細胞由来中間中胚葉から SALL4 を主要マーカーとして尿管芽の高効率な分化誘導法を確立する。

申請者は、H22-23 年度科学研究費補助金若手研究(B)にてヒト iPS 細胞から腎臓を構成するほぼすべての細胞を派生させる胎生組織「中間中胚葉」を分化誘導する方法を確立した。まず、中間中胚葉の特異的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 細胞株を作製した。そして、その細胞株とフローサイトメトリーを用いた定量的な評価系を用いて増殖因子 activin A, BMP (bone morphogenetic protein; 骨形成因子) 7 と化合物 CHIR99021 の組み合わせ処理にて、ヒト iPS 細胞および ES 細胞から OSR1(+)中間中胚葉を 90 %以上の高効率で分化誘導する方法を確立した (Mae S. et al., 2013; 米国出願済)。

本研究では、上記の方法にて作製された OSR1(+)中間中胚葉細胞に対する約 40 種類の増殖因子と約 5 万種類の低分子化合物の SALL4(+)細胞への誘導効率を SALL4 抗体染色像のイメージアナライザーによる定量的解析を用いて高速に探索する。そして、ヒト iPS 細胞由来中間中胚葉から高効率に SALL4(+)細胞を分化誘導する因子を同定し、その因子を用いた新規の分化誘導法を確立する。

(2) 尿管芽マーカー遺伝子 SALL4 のレポーターヒト iPS 細胞株の樹立

ヒト iPS 細胞から尿管芽マーカー-SALL4 の発現細胞を作製するが、SALL4 は核内に存在する転写因子であるため、固定した後に免疫染色を行わなければその同定ができない。よって、生存させたまま SALL4 陽性細胞を単離するために、前述の申請者らが作製した中間中胚葉マーカー遺伝子 OSR1 のレポーターヒト iPS 細胞株(OSR1-GFP knockin ヒト iPS 細胞株において、さらに SALL4 の遺伝子座に赤色蛍光レポーター (tdTomato) を相同組換え法にて導入したダブルレポーター iPS 細胞株の樹立を行う。一般的にヒト ES 細胞や iPS 細胞は、相同組換えによる遺伝子導入が難しい。しかし、申請者らは、BAC (Bacterial

artificial chromosome)を用いた独自の方法にてヒト iPS 細胞に効率よく相同組換えを起こす方法を開発した (Mae S. et al., 2013; 国内出願済)。この方法を用いて、OSR1-GFP/SALL4-tdTomato ダブルレポーターヒト iPS 細胞株の樹立を行う。

(3) ヒト iPS 細胞から分化誘導された尿管芽マーカー-SALL4(+)細胞の機能の検証

前述のダブルレポーターヒト iPS 細胞株とフローサイトメトリーを用いて、ヒト iPS 細胞から分化誘導された SALL4(+)細胞を生存したまま単離する。そして、マイクロアレイによる詳細な遺伝子発現解析を行い、マウス胎児尿管芽の遺伝子発現と比較検討する。尿管芽に発現することが知られている既知の遺伝子は比較的少ないため、本解析にて新規の尿管芽マーカー候補遺伝子が同定された場合、マウス胎児腎臓の尿管芽での発現を免疫染色あるいは *in situ* hybridization 法にて確認し、新規の尿管芽マーカー遺伝子のリストを作成する。

また、ヒト iPS 細胞から誘導された SALL4(+)細胞を単離し、試験管内でさらに分化させることや免疫不全マウス腎被膜下などへの移植後に *in vivo* の環境で分化させることにより、集合管や腎盂、尿管、膀胱など尿管芽由来器官のマーカー発現細胞に分化するか否かを検証する。併せて、SALL4(+)細胞をマウス胎児腎臓の後腎間葉と共培養し、間葉を糸球体上皮、近位および遠位尿管、ヘンレのループからなるネフロン構造に分化誘導させる尿管芽としての発生生物学的功能を有するか否かを検証する。

以上の検証により、ヒト iPS 細胞から作製された尿管芽マーカー陽性細胞が、生体内の尿管芽と同様の遺伝子発現および発生生物学的功能を有するか否かの綿密な検証を行う。

(4) ヒト iPS 細胞由来尿管芽細胞から腎集合管細胞への分化誘導法の開発

ヒト iPS 細胞から OSR1(+)中間中胚葉を経て分化誘導された SALL4(+)尿管芽細胞を前述の OSR1-GFP/SALL4-tdTomato ダブルレポーター細胞株を用いて生存したまま単離を行う。そして、腎集合管を特異的に染色する DBA レクチン染色像のイメージアナライザーによる定量的解析を用い、SALL4(+)尿管芽細胞を DBA(+)細胞へ高効率に分化誘導する増殖因子または低分子化合物を高速スクリーニングにて同定し、その因子を用いた DBA(+)細胞への分化誘導法の確立を行う。

ヒト iPS 細胞から作製された DBA(+)細胞の集合管細胞としての機能を集合管に特異的な遺伝子 (AQP2, バゾプレシン V2 受容体など) の発現や生理機能の検証により確認する。さらに、マイクロアレイ解析にてマウス集合管細胞との遺伝子発現の比較解析を行う。そして、ヒト iPS 細胞由来の腎集合管が、生体内のものと同等の機能を有するか否かを検討する。

4. 研究成果

H24 年度に、増殖因子と化合物の組み合わせ処理を検討し、ヒト iPS 細胞由来の中間中胚葉から 20-30%程度の効率にて尿管芽マーカー遺伝子である SALL4 の発現細胞を分化誘導する方法を開発した。また、申請者らの開発した BAC を用いたヒト iPS 細胞に対する相同組み換え法にて中間中胚葉マーカーである OSR1 と尿管芽マーカー SALL4 のダブルレポーターヒト iPS 細胞株 (OSR1-GFP/SALL4-tdTomato ダブルノックインヒト iPS 細胞株) を樹立した。そして、未分化状態 iPS 細胞における抗体染色にて、SALL4 と tdTomato の発現が一致することより、本ヒト iPS 細胞株が SALL4 の発現をモニターできることを確認した。

H25 年度には、増殖因子と化合物の組み合わせ方法をさらに改良し、尿管芽細胞の分化誘導効率を 50%以上に向上させる方法を開発した。また、これらの細胞は、尿管芽の特徴である in vitro の培養にて分岐を数回繰り返すことと集合管細胞のマーカー陽性細胞に分化する能力を有することも一部確認した。

H26 年度には、作製した尿管芽細胞のマイクロアレイによる遺伝子発現解析や機能解析を行う予定であったが、新たに報告された腎臓発生の知見と H25 年度までに確立した分化誘導法が一部に一致しない点があることが判明したため、分化誘導法の改良を先に行った。そして、改良した分化誘導法でも尿管芽細胞が誘導され、その一部がさらに集合管のマーカー発現細胞に分化することを確認した。

今後、ヒト iPS 細胞から尿管芽細胞への分化誘導効率をさらに高める改良を続ける。また、誘導された尿管芽細胞のマイクロアレイによる遺伝子発現解析に加え、尿管芽由来器官への分化能やマウス胎児後腎間葉に対する誘導能を検証する。その後、ヒト iPS 細胞由来の尿管芽から集合管細胞への高効率分化誘導法を確立し、ADPKD や ARPKD などの遺

伝性腎疾患の患者由来 iPS 細胞を集合管に分化させることによって同疾患の病態を再現する新規の試験管内腎疾患モデル作製とそれを用いた病態解析、治療薬開発系の確立を目指す。

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 10 件)

1. Mae S, Osafune K. Kidney regeneration from human iPSCs, *Current Opinion in Organ Transplantation* 20(2):171-177, 2015, DOI: 10.1097/MOT.000000000000170, 査読有り.
2. Osafune K. Cell therapy for kidney injury: different options and mechanisms - Kidney progenitor cells. *Nephron* 126(2): 64, 2014, DOI: 10.1038/srep03594, 査読有り.
3. 保科 あずさ、長船 健二. 腎研究最前線 Up date Nephrology再生医療 腎再生, プラクティス Nephrology Frontier (メディカルレビュー社), 14(1): 82-85, 2015, 査読無し.
4. 天久 朝廷、長船 健二. ADPKD患者由来 iPS細胞を用いた疾患モデル作製研究, 腎臓内科・泌尿器科「多発性嚢胞腎ADPKDの新しい展開」(科学評論社), 1(2): 166-172, 2015, 査読無し.
5. 前 伸一、長船 健二. iPS細胞を用いた腎疾患に対する再生医療開発, 医学のあゆみ(医歯薬出版)252(2): 201-206, 2015, 査読無し.
6. 長船 健二. 質疑応答プロからプロへ腎臓領域におけるiPS研究の最前線について, 日本医事新報(日本医事新報社) 100, 2015, 査読無し.
7. 末田 伸一、長船 健二. 多能性幹細胞から3次元臓器へ. 3. iPS細胞からの腎臓再生(中間中胚葉経路), 腎と透析「腎臓再生医療~実現化に向けた新たな取り組み」(東京医学社), 2014, 査読無し.
8. 居神 麻衣子, 豊田 太郎, 長船 健二. 多能性幹細胞を用いた腎臓、膵臓系譜の分化誘導研究の最前線, 実験医学増刊「再生医療まで2015」(羊土社), 33(2): 108(260)-114(266), 2015, 査読無し.

9. 長船 健二, iPS細胞研究の臨床への応用～腎臓領域を中心に～, 臨床病理(日本臨床検査医学会) 63: 265-273, 2015, 査読無し.
10. 人見 浩史、長船 健二, ヒト腎臓再生への挑戦, 生体の科学「器官の発生と再生の基礎」(金原一郎記念医学医療振興財団) 65 (3): 244-248, 2014, 査読無し.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Osafune K. Screening for Novel Compounds Driving Renal Differentiation. Early Programs. Advances in Research Conference-Building a Kidney: From Stem Cells to Function, American Society of Nephrology. Kidney Week 2014, November 11, 2014, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia (USA).
2. 長船 健二. iPS 細胞を用いた腎再生研究の現状と展望, 第 44 回日本腎臓学会西部学術大会, 2014 年 10 月 4 日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市).
3. Osafune K. Directed differentiation of human iPSCs/ESCs into kidney lineages toward the development of regenerative therapy and disease modeling, Asia-Pacific Kidney Development Workshop, September 22, 2014, Skyline Queenstown, Queenstown (New Zealand).
4. Osafune K. Directed differentiation of human iPSCs/ESCs into kidney lineages toward the development of regenerative therapy and disease modeling, 10th Annual Meeting of Korean Society of Stem Cell Research, August 28, 2014, Grand Hilton Hotel in Seoul, Seoul (Korea).
5. 長船 健二. 腎臓発生機構の解明と多能性幹細胞からの腎臓再生, 日本腎臓学会大島賞受賞講演, 第 57 回日本腎臓学会学術総会, 2014 年 7 月 4 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
6. 長船 健二. 患者由来 iPS 細胞を用いた嚢胞性腎疾患の病態解析研究, シンポジウム 3. 「PKD~発症機序解明・新規治療開発からガイドラインへ~」, 第 57 回日本腎臓学会学術総会, 2014 年 7 月 5 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

7. 長船 健二. iPS 細胞を用いた腎細胞と腎組織の再生, 第 59 回日本透析医学会学術集会・総会、シンポジウム 04「腎臓の再生医療を考える」, 2014 年 6 月 13 日, 神戸ポートピア ホテル(兵庫県・神戸市).

8. 長船 健二. iPS 細胞研究の臨床への応用～腎臓領域を中心に～, 日本生化学会北陸支部第 32 回大会、シンポジウム「幹細胞研究の今」, 2014 年 5 月 24 日, 富山大学杉谷キャンパス(富山県・富山市).
9. Osafune K. Directed differentiation of kidney lineage cells from human iPSCs/ESCs, The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology, May 16, 2014, Shinagawa Prince Hotel, Tokyo (Japan).
10. 長船 健二. 臨床応用を目指した iPS 細胞から腎臓への分化誘導, 第 102 回日本泌尿器科学会総会, 2014 年 4 月 24 日, 神戸ポートピア ホテル(兵庫県・神戸市).

〔図書〕(計 2 件)

1. 松井 敏、長船 健二, 多発性嚢胞腎, 遺伝子医学MOOK27「iPS細胞と難病疾患 臨床・創薬応用研究の最新知見」(メディカルドゥ社) 198-202, 2015, 査読無し.
2. 前 伸一、沖田 圭介、長船 健二, iPS細胞への遺伝子導入時における適切なプロトコール、トラブル回避策, 遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発(技術情報協会)6部、6章、6節, 2014, 査読無し.

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・教授
 研究者番号: 80502947