

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591204

研究課題名(和文) ヒト iPS 細胞を用いたエリスロポエチン産生細胞の検討

研究課題名(英文) Generation of erythropoietin-producing cells derived from human iPSCs

研究代表者

人見 浩史 (Hitomi, Hitofumi)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：70346641

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)：生理的で安価な腎性貧血治療法の開発が渴望されている。そこでヒトiPS細胞を用い、エリスロポエチン産生細胞に分化させることに成功した。ヒトiPS細胞由来エリスロポエチン産生細胞は、生体と同様に低酸素に反応してエリスロポエチンを産生し、赤血球前駆細胞の分化を促進した。また腎不全マウスの腎性貧血を改善した。貧血改善効果は市販エリスロポエチン製剤に比較して高効率であった。エリスロポエチン産生細胞分化誘導法の確立は、基礎研究において詳細が明らかとなっていないエリスロポエチン発現機序の解明に有用であるとともに、臨床においてiPS細胞を用いた生理的な腎性貧血治療の可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We established a method to generate erythropoietin (EPO)-producing cells from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) that showed increased EPO expression and secretion in response to low oxygen conditions. The EPO protein secreted from hiPSC-derived EPO-producing cells (hiPSC-EPO cells) induced the erythropoietic differentiation of umbilical cord blood progenitors in vitro. Furthermore, injection of EPO protein from hiPSC-EPO cells improved renal anemia in adenine-induced renal failure mice. In conclusion, hiPSC-EPO cells may provide a novel therapeutic agent for anemia.

研究分野：腎臓内科学、再生医学、薬理学

キーワード：再生医学 移植・再生医療 iPS細胞 エリスロポエチン 腎性貧血

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓代替療法として透析療法は確立された医療であり、我が国においては、およそ 30 万人がこれにより腎臓機能を代替されている。しかしながら、現在行われている透析療法では、腎臓の機能を全て補完することは出来ない。その代表的な病態として、エリスロポエチンの欠乏に伴う腎性貧血が挙げられる。近年、腎性貧血に対しては、遺伝子組み換え技術で合成されたエリスロポエチン製剤が広く用いられている。これにより輸血療法を主体とする従来の治療と比較し、腎性貧血のコントロールは容易になり、ウイルス感染や鉄過剰の問題が改善された。しかし現在行われている間歇的なエリスロポエチン投与は非生理的と考えられる。また、必要量のエリスロポエチンが投与されていない症例も少なくない。腎性貧血は心血管イベントの発症と密接に関連していることが知られ、十分なエリスロポエチン投与により、これらが抑制される可能性が示唆されている。一方で、エリスロポエチンの過剰投与により、脳や心血管疾患のリスクがむしろ増大することも報告されており、エリスロポエチンの適正投与量については未だ議論が多い。そのためエリスロポエチンの投与において、より生理的な調節が必要とされているが、現在の治療では満たされていない。また慢性腎不全患者数は増加の一途を辿っている。腎臓代替療法を必要とする患者数の増加に伴い、エリスロポエチン製剤を投与される患者数も増加している。遺伝子組み換えエリスロポエチン製剤の需要は全世界で増加しており、薬剤販売額の統計においても常に上位を占めている。そのため我が国のみならず、多くの国の医療経済に対する負担は大きく、安価なエリスロポエチン補充を含む腎性貧血の治療が渴望されている。

エリスロポエチンは腎臓と肝臓で産生され、骨髄における赤血球系の産生に関与していることが知られていたが、発現調節機構と産生する細胞については明らかとなっていなかった。最近、エリスロポエチン産生細胞が腎臓の傍尿細管で同定され、その発現機序も徐々に解明されてきた。そこでエリスロポエチン産生細胞を生体材料として用いることで、生理的で安価な腎性貧血治療に用いる可能性が模索されてきた。しかしながら、エリスロポエチン産生細胞をヒト腎臓から単離培養することが困難であるという問題点も指摘されている。

一方、iPS 細胞の技術は、再生医療を実現するために重要な役割を果たすと期待され、国内外の多くの科学者が臨床応用に向け研究を行っている。iPS 細胞は様々な組織や臓器を構成する細胞への分化が可能な多能性幹細胞である。iPS 細胞からエリスロポエチン産生細胞を分化誘導することは、生体材料として有用と考えられるが、いまだ分化誘導法の報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究課題はヒト iPS 細胞からエリスロポエチン産生細胞を分化誘導し、これを生体に導入することにより、エリスロポエチンの生理的な補充を行うことを可能にすることを目的とする。そのため実験は、ヒト iPS 細胞に種々の刺激を加えることにより、エリスロポエチン産生細胞を分化誘導する。エリスロポエチン産生細胞が誘導できた場合、産生されたエリスロポエチンの機能評価や産生機構の解明を行う。最終的には、ヒト iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞の腎性貧血の改善効果を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) エリスロポエチン産生細胞の分化誘導

ヒト iPS 細胞からエリスロポエチン産生細胞を分化誘導する。ヒト iPS 細胞に種々の刺激を加え、エリスロポエチン産生細胞に分化させる。培養液または細胞溶解液のエリスロポエチン発現を、PCR、Western blot 法、免疫染色法、ELISA を用いて確認する。

### (2) エリスロポエチンの機能評価

産生されたエリスロポエチンが生理的な機能を有するか確認する。血球分化の標準的評価法であるコロニーアッセイを用いて骨髄前駆細胞にエリスロポエチン産生細胞の培養液を反応させ、赤血球系譜に効率よく分化を誘導するかを評価する。臨床で用いられているエリスロポエチン製剤と比較し、力価の強いエリスロポエチンを分泌させる条件を検討する。さらに低酸素培養条件でエリスロポエチン発現に対する影響を検討する。

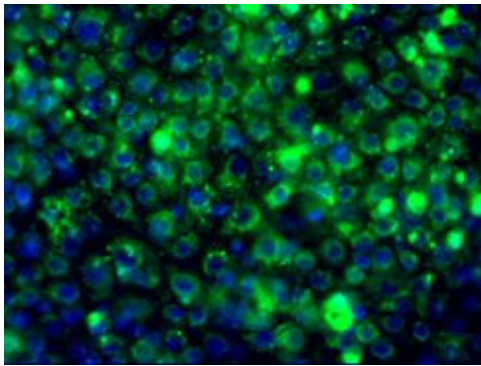
### (3) 腎性貧血モデルに対する影響

ヒト iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞から産生されたエリスロポエチンの貧血に対する影響を検討する。腎性貧血はマウスにアデニンを投与することで作製する。赤血球産生能を末梢血で評価する。腎性貧血の改善効果を市販エリスロポエチン投与と比較検討する。

## 4. 研究成果

### (1) エリスロポエチン産生細胞の分化誘導

ヒト iPS 細胞に種々の刺激を加え、エリスロポエチン産生細胞に分化させることに成功した。ヒト iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞はエリスロポエチン mRNA および protein を発現していた (図参照)。また培養液中にエリスロポエチンの分泌を認めた。種々の iPS 細胞でエリスロポエチン産生細胞を分化誘導が可能であり、ヒト ES 細胞や、マウス iPS/ES 細胞からエリスロポエチン産生細胞を分化誘導した。



(図) ヒト iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞質にエリスロポエチン(緑)の発現を認める。

## (2) エリスロポエチンの機能評価

エリスロポエチンは造血組織における赤血球前駆細胞の増殖と分化を促進しているため、この生理機能をコロニーアッセイで評価した。エリスロポエチン産生細胞の培養上清は市販エリスロポエチン製剤と同様に、ヒト臍帯血から得た CD34 陽性細胞を赤芽球系へ誘導した。生体内ではエリスロポエチンは血液の酸素分圧に反応して、その産生が調節されている。そこで低酸素培養条件下で、エリスロポエチン産生の影響を検討した。ヒト iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞は、低酸素に反応してエリスロポエチンを産生し、細胞外への分泌も増加した。

## (3) 腎性貧血モデルに対する影響

マウスにアデニンを経口投与することで中等度腎不全と腎性貧血を認めた。エリスロポエチン産生細胞の培養上清は腎性貧血を改善した。貧血改善効果は市販エリスロポエチン製剤に比較して高効率であった。

## (4) 今後の展望

エリスロポエチン産生細胞分化誘導法の確立は、基礎研究において詳細が明らかとなっていないエリスロポエチン発現機序の解明に有用であるとともに、臨床において iPS 細胞を用いた生理的な腎性貧血治療の可能性を示唆している。生理的で安価な腎性貧血治療のため、エリスロポエチン産生細胞の臨床応用を目指し現在も研究を行っている。

## 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 21 件)

Hitomi H (他 15 名、8 番目) Functional analysis of iPSC-derived myocytes from a patient with carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;448:175-81. 査読あり  
10.1016/j.bbrc.2014.04.084.

Hitomi H (他 9 名、2 番目) High sodium augments angiotensin II-induced vascular smooth

muscle cell proliferation through ERK 1/2-dependent pathway. *Hypertens Res* 2014;37:13-8. 査読あり  
10.1038/hr.2013.108.

Hitomi H (他 12 名、10 番目) Chymase activities and survival in endotoxin-induced human chymase transgenic mice. *Int J Med Sci*. 2014;11:222-5. 査読あり  
10.7150/ijms.7382.

Hitomi H (他 10 名、4 番目) Hyperglycemia causes cellular senescence via a SGLT2- and p21-dependent pathway in proximal tubules in the early stage of diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications* 2014;28:604-11. 査読あり  
10.1016/j.jdiacomp.2014.05.010.

Hitomi H (他 8 名、2 番目) Roles of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Type 1 and Intracellular pH in Angiotensin II-Induced Reactive Oxygen Species Generation and Podocyte Apoptosis. *J. Pharmacol. Sci.* 2013;122:176-83. 査読あり  
10.1254/jphs.12291fp

Hitomi H (他 8 名、2 番目) Role of (pro)renin receptor in angiotensin II-dependent and -independent EGF receptor transactivation. *Front Biosci* 2013;E5:697-705. 査読あり  
10.2741/e650

Hitomi H (他 11 名、4 番目) Aberrant activation of the intrarenal renin-angiotensin system in the developing kidneys of type 2 diabetic rats. *Horm Metab Res*. 2013;45:338-43. 査読あり  
10.1055/s-0032-1331256

Hitomi H (他 13 名、5 番目) Effects of angiotensin II AT1 receptor blockade on high fat diet-induced vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in Dahl salt-sensitive rats. *J. Pharmacol. Sci.* 2013;12:95-102. 査読あり  
10.1254/jphs.12169fp

Hitomi H (他 12 名、5 番目) Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Does Not Suppress Renal Angiotensin II Levels in Angiotensin I-Infused Rats. *J. Pharmacol. Sci.* 2013;122:103-8. 査読あり  
10.1254/jphs.13045fp

Hitomi H (他 9 名、6 番目) Aldosterone aggravates glucose intolerance induced by high fructose. *Eur J Pharmacol* 2013;720:63-8. 査読あり  
10.1016/j.ejphar.2013.10.051

Hitomi H (他 10 名、3 番目) Calcium channel blocker enhances beneficial effects of an angiotensin II AT1 receptor blocker against cerebrovascular-renal injury in type 2 diabetic mice. *PLoS One* 2013;8:e82082. 査読あり  
10.1371/journal.pone.0082082

Hitomi H (他 9 名、10 番目) Aldosterone Induces Vascular Insulin Resistance by Increasing Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor and Hybrid Receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:257-63. 査読あり  
10.1161/ATVBAHA.111.240697

Hitomi H (他 9 名、4 番目) Aldosterone does not contribute to renal p21 expression during the development of angiotensin II-induced hypertension in mice. *Am J Hypertens*

2012;25:354-8. 査読あり

10.1038/ajh.2011.224.

Hitomi H (他 17 名、11 番目) Early treatment with olmesartan prevents juxtamedullary glomerular podocyte injury and the onset of microalbuminuria in type 2 diabetic rats. *Am J Hypertens.* 2012;25:604-11. 査読あり  
10.1038/ajh.2012.1.

Hitomi H (他 13 名、9 番目) Renal sympathetic denervation suppresses de novo podocyte injury and albuminuria in rats with aortic regurgitation. *Circulation.*

2012;125:1402-13. 査読あり

10.1161/CIRCULATIONAHA.111.064097.

Hitomi H (他 8 名、5 番目) Add-On Aliskiren Elicits Stronger Renoprotection Than High-Dose Valsartan in Type 2 Diabetic KKAY Mice That Do Not Respond to Low-Dose Valsartan. *J Pharmacol. Sci.* 2012;119:131-8. 査読あり

10.1254/jphs.12031FP

Hitomi H (他 10 名、5 番目) N-type calcium channel inhibition with cilnidipine elicits glomerular podocyte protection independent of sympathetic nerve inhibition. *J. Pharmacol. Sci.* 2012;119:359-67. 査読あり

10.1254/jphs.12075FP

Hitomi H (他 11 名、5 番目) Oxidative stress-induced glomerular mineralocorticoid receptor activation limits the benefit of salt reduction in Dahl salt-sensitive rats. *PLoS One* 2012;7:e41896. 査読あり

10.1371/journal.pone.0041896.

Hitomi H (他 7 名、6 番目) Multiphoton Imaging of the Glomerular Permeability of Angiotensinogen. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:1847-56. 査読あり

10.1681/ASN.2012010078.

Hitomi H (他 7 名、3 番目) Aldosterone induces p21-regulated apoptosis via increased synthesis and secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human proximal tubular cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012;119:359-363. 査読あり

10.1111/j.1440-1681.2012.12001.x.

<sup>21</sup> Hitomi H (他 8 名、7 番目) Important aspects of urine sampling for angiotensinogen measurement: time and preservation conditions in healthy individuals. *Tohoku J Exp Med.* 2012;228:333-9. 査読あり

10.1620/tjem.228.333

〔学会発表〕(計 7 件)

人見浩史他 iPS 細胞からエリスロポエチン産生細胞への分化誘導、第 4 回日本腎臓リハビリテーション学会、2014.3.30、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

人見浩史他 iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞の腎性貧血改善効果の検討、第 36 回日本高血圧学会総会、2013.10.25、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

人見浩史他 iPS 細胞を用いた腎臓病治療の可能性、平成 25 年度香川県医学会、2013.10.6、坂出グランドホテル(香川県・坂出市)

人見浩史他 iPS 細胞および ES 細胞を用いたエリスロポエチン産生細胞分化誘導法の確立、第 56 回日本腎臓学術総会、2013.05.10、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

人見浩史他 iPS 細胞および ES 細胞を用いたエリスロポエチン産生細胞分化誘導法の確立、第 86 回日本内分泌学会、2013.04.25、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

人見浩史他 ヒト iPS 細胞および ES 細胞を用いたエリスロポエチン産生細胞分化誘導法の確立、第 3 回日本腎臓リハビリテーション学会、2013.3.24、とちぎ健康の森(栃木県・宇都宮市)

人見浩史他 尿中アンジオテンシノーゼン排泄量はメタボリック症候群患者におけるオルメサルタンの腎保護予測マーカーとなりうる、第 35 回日本高血圧学会総会、2012.9.20、ウェスティンナゴヤキャッスル(愛知県・名古屋市)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: エリスロポエチン産生細胞の誘導方法

発明者: 人見浩史他

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2013/060878

出願年月日: 2013 年 4 月 4 日

国内外の別: 国外(PCT)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kms.ac.jp/~yakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

人見 浩史 (HITOMI HIROFUMI)

香川大学・医学部・助教

研究者番号: 70346641