

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591211

研究課題名(和文) ES/iPS細胞の腎尿細管への分化誘導系を用いた腎疾患進展機構の解明

研究課題名(英文) An investigation of mechanism of progression of kidney disease using renal tubular cells differentiated from ES/iPS cells

研究代表者

門川 俊明 (Monkawa, Toshiaki)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：80286484

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)：マウスES細胞に胚様体を形成させ、activinとIGFを添加して培養した後、KSP抗体を用いて、KSP陽性細胞を分離することで腎尿細管細胞へ分化誘導を行った。KSP陽性細胞はMatrigel上で管腔を形成し、Wnt4刺激下で尿細管の各セグメントの性質を獲得した。ヒトES細胞はマウスより分化しにくい、GSK-3阻害剤によってKSP陽性細胞を増やすことができた。

EMTと上皮化の実験モデルのmicroarray解析から、マウス尿細管細胞においてmiR-34cがTGF-によるEMTを抑制することがわかった。miR-34cを片側尿管結紮モデルマウスに投与することで腎臓の線維化が抑制された。

研究成果の概要(英文)：We developed a method of inducing renal tubular cells from mouse embryonic stem cells via the cell purification of kidney specific protein (KSP)-positive cells using an anti-KSP antibody. KSP-positive cells had the capacity to form tubular structures when grown in a 3D culture in Matrigel. Moreover, KSP-positive cells acquired the characteristics of each segment of renal tubular cells through tubular formation when stimulated with Wnt4. Human ES cells were not willing to differentiate into tubular cells compared to mouse ES cells. GSK-3-inhibitor increased KSP-positive cells.

We examined miRNA expression in experimental models of EMT and renal epithelialization using microarray, and found that miR-34c attenuates EMT induced by TGF- in a mouse tubular cell line. To confirm the effects of miR-34c in vivo, we administered the precursor of miR-34c to mice with unilateral ureteral obstruction, and miR-34c decreased kidney fibrosis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓 尿細管 ES細胞 iPS細胞 miRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) ES 細胞と iPS 細胞からの尿細管細胞の分化誘導方法の確立

ES 細胞は、着床前胚の内部細胞塊に由来し、生体のあらゆる細胞に分化する可能性(多能性) ほぼ無限に増殖するという高い増殖能力を持つ。マウスで初めて ES 細胞の樹立に成功し、その後、ヒト ES 細胞株も樹立された。さらに、近年、山中らが樹立した iPS 細胞は、皮膚から採取した線維芽細胞に OCT3/4・SOX2・KLF4・C-MYC の 4 遺伝子を導入することによって、ES 細胞と同様の多能性を獲得した細胞である。ES 細胞で問題となる、免疫拒絶の問題、倫理性的問題を回避できることから、ES 細胞と同様、移植の切り札となると考えられている。しかし、現時点においては ES 細胞や iPS 細胞から腎臓を構成する細胞への効率のよい分化誘導方法は確立していない。

我々は、これまでに ES 細胞から腎臓細胞への分化誘導方法を研究し、腎臓の尿細管全般に発現している Kidney specific protein (KSP) の発現を指標とすると、Activin が ES 細胞の KSP 発現を促進する事を見出し、報告した (Morizane, Biochem Biophys Res Commun, 2009)。しかし、この分化誘導方法で得られる KSP 陽性細胞は 1-5% 程度であり、分化誘導した ES 細胞から KSP 陽性細胞を選別し、純化する必要がある。そこで、Flow cytometry による純化を目的として、KSP の細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体を独自に作成した。この抗 KSP モノクローナル抗体を用い、KSP 陽性細胞の選別に成功した。Flow cytometry で選別した細胞は、AQP2 などの尿細管マーカーを発現するとともに、マトリゲル™ 上で、管腔形成傾向を示すなど、腎臓尿細管上皮細胞であると考えられた。(特許申請済み、特許申請番号：特願 2011-209792)

しかし、Activin と KSP 抗体による選別による分化誘導方法においても、まだ課題が残っている。分取出来る細胞数が十分ではないこと、分取後の細胞の増殖能が高くないこと、いくつかのネフロンセグメントの尿細管上皮が混合していること、などである。したがって、さらに条件を適合させ、マウス ES 細胞からの尿細管上皮細胞分化誘導方法を確立する必要がある。

また、将来の治療応用を考えれば、マウス ES 細胞だけでなく、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞の分化誘導方法も確立しなければならない。ES/iPS 細胞を用いた腎臓尿細管上皮細胞への分化誘導系は、*in vitro* 尿細管誘導系であり、尿細管を場とする腎臓病進行抑制機構の解明のためのきわめて重要なツールであると言える。

また、ヒト iPS 細胞からの尿細管上皮細胞への分化誘導系が確立できれば、疾患そのものの病態解明をすることが出来る。たとえば、多発性嚢胞腎のような遺伝性疾患を有する

患者から iPS 細胞を樹立できれば、多発性嚢胞腎で起こる嚢胞形成を *in vitro* で起こすことが可能になり、嚢胞形成のメカニズム解析や薬剤スクリーニングを行うことができるようになり、嚢胞形成を抑制する治療法の確立を目指すことができる。

(2) CKD 進行抑制のための EMT に関する miRNA の解析

我々は、これまで腎臓の上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) 現象において、Snail が EMT 促進に働くことを見いだしている (Yoshino, Biochem Biophys Res Commun, 2007)。今回、新たな研究手法として、microRNA (miRNA) の発現解析を利用し、効率的に EMT の治療ターゲットとなる遺伝子の同定を行うことを考えている。miRNA は、タンパク質に翻訳されない非コード RNA であり、mRNA の活性を調節する事で、病態生理学的に重要な役割を担っており、臓器の発生や種々の疾患との関連が示されてきている。miRNA はヒト遺伝子 22,000 個に対し、1,000 個と数が少ないため、EMT の病態モデルを用いて関与する miRNA を同定する事が容易である。miRNA は相補的な配列をもつ mRNA に直接結合しその活性を失活させるため、EMT に関する miRNA を同定する事で、EMT の病態に関する新たな因子を探索することができる。腎臓領域においても、糖尿病性腎症による尿細管細胞の上皮間葉移行 (EMT) に、miRNA が関連していることが報告されている (Wang, Diabetes, 2010)。したがって、miRNA を介した尿細管障害のメカニズムを解明することで、CKD の進行を抑制する新たな創薬の可能性が考えられるが、未だそのような研究報告は少ない。

2. 研究の目的

以下の 2 つの研究を並行させておこなう。一つは、ES 細胞と iPS 細胞からの尿細管細胞の分化誘導方法の確立であり、これまでに行ってきたマウス ES 細胞から KSP 抗体を用いる分化誘導方法をさらに効率を上げるとともに、ヒト ES 細胞からの分化誘導方法を確立する。

もう一つは、CKD 進行抑制のための EMT に関する miRNA を発見し、その分子メカニズムを明らかにすることである。具体的には、マウスの片側尿管結紮モデルと、近位尿細管細胞株を用いた TGF β による EMT モデルにおいてマイクロアレイを用いた網羅的な miRNA の発現解析をおこない、候補 miRNA を絞った後、その解析を *in vitro*、*in vivo* で行うことである。

3. 研究の方法

(1) ES 細胞から腎臓尿細管細胞の分化誘導系の確立

我々は、これまでマウス ES 細胞 (CAG-GFP EB3 細胞) を用いて胚様体を介した分化誘導

を行い、誘導因子として Activin 10ng/ml を分化初期から培養 18 日目まで加え、その後、抗 KSP 抗体を用いて KSP 陽性細胞を分取する方法を開発した。しかし、KSP 陽性細胞が少ないこと、また、分取後の増殖能が弱いということが問題であった。

これらを改善するために、Flow Cytometry をおこなう前に、KSP 陽性細胞率を上げるために加えるべき成長因子 (IGF、HGF など) を検討する。また、分取した細胞の増殖能が弱いことに対しては、尿細管上皮細胞の培養に最適な培地、誘導因子、培養皿のコーティングなどの検討する。また、Wnt4 を発現する NIH-3T3 細胞をフィーダーとして培養する方法も検討する。

マウス ES 細胞からの分化誘導と並行して、ヒト ES 細胞からの分化誘導方法も検討する。

(2) micro RNA を介した腎尿細管障害の抑制
マウスの片側尿管結紮モデルと、近位尿細管細胞株を用いた TGF による EMT モデルを用いて、マイクロアレイを用いた網羅的な miRNA の発現解析をおこない、EMT に関わる miRNA を見つける。その候補 miRNA の EMT に対する効果を見るために、*in vitro* (近位尿細管細胞株を用いた TGF による EMT モデル) における miRNA の影響および *in vivo* (片側尿管結紮モデルに候補 miRNA の precursor を投与する) における腎臓の線維化に対する miRNA の影響を検討する。

4. 研究成果

(1) マウス ES 細胞から腎臓尿細管細胞の分化誘導系の確立

マウス ES 細胞を用いて胚様体を介した分化誘導において、誘導因子として Activin 10ng/ml を分化初期から培養 18 日目まで加えていたが、Activin に加え、IGF を添加することで、KSP 陽性細胞率を上げることができるといった結果が得られた。

また、Flow cytometry で分取した KSP 陽性細胞がマトリゲル上で管腔形成傾向を示していたが、その効率が十分ではなかったため、Wnt4 を発現する線維芽細胞上で分取した細胞を培養することによって、管腔形成効率を著しく改善することが出来た。

以上より、マウス ES 細胞からの尿細管細胞への分化誘導方法が確立できたと考え、本研究結果をまとめ、PlosOne 誌に投稿し、論文が受理された。

(2) ヒト ES 細胞から腎臓尿細管細胞の分化誘導系の確立

マウス ES 細胞とヒト ES 細胞では、ヒト ES 細胞の方が分化誘導の高率が悪く、時間がかかるので、マウス ES 細胞とは異なり、GSK-3-阻害剤を用いて一旦中間中胚葉への分化誘導をおこなうことで、比較的短時間で分化させることが可能であることが分かった。その後、マウス ES 細胞と同様に、KSP 抗体を用

いて、KSP 陽性分画をフローサイトメトリーで分取し、ヒト ES 細胞からの KSP を指標とした尿細管細胞への分化誘導方法が確立できた。現在、論文投稿中である。

(3) micro RNA を介した腎尿細管障害の抑制
マウスの片側尿管結紮モデルと、近位尿細管細胞株を用いた TGF による EMT モデルを用いて、マイクロアレイを用いた網羅的な miRNA の発現解析から、EMT に関連する miRNA を検討した。その結果、miR-181b、miR-125b、miR-30e、miR-34c、miR-680、miR-1224 が EMT に関連している事が分かった。これら miRNA のうち、miR-34c が近位尿細管細胞株を用いた *in vitro* の実験において TGF による EMT を抑制することを発見した。さらに、片側尿管結紮モデルを用いた実験においても、miR-34c の投与は、腎線維化を有意に抑制することが明らかとなった。本研究結果をまとめ、Scientific Reports に投稿し、論文が受理された。

さらに、EMT に関連する miRNA として候補にのぼっていた miR-363 について解析をおこなった。miR-363 は miR-34c とは逆に、尿細管細胞の EMT を促進することが示唆された。miR363 のシグナル伝達においては、TWIST1/2 が重要であることまで突き止めたが、今後、この部分についてさらに研究を進めていきたい。

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 2 件)

1. Morizane R, Fujii S, Monkawa T, Hiratsuka K, Yamaguchi S, Homma K, Itoh H. miR-34c attenuates epithelial-mesenchymal transition and kidney fibrosis with ureteral obstruction. Sci Rep. 2014;4:4578. doi: 10.1038/srep04578. 査読有り
2. Morizane R, Monkawa T, Fujii S, Yamaguchi S, Homma K, Matsuzaki Y, Okano H, Itoh H. Kidney specific protein-positive cells derived from embryonic stem cells reproduce tubular structures *in vitro* and differentiate into renal tubular cells. PLoS One. 2014;8(6):e64843. doi: 10.1371/journal.pone.0064843 査読有り

[学会発表](計 6 件)

1. Ryuji Morizane, Toshiaki Monkawa, Shizuka Fujii, Hiroshi Itoh. miR-363 induces transdifferentiation of human tubular cells to mesenchymal phenotype. Kidney Week 2014 年 11 月 14 日, 米国フィラデルフィア

2. Ryuji Morizane, Toshiaki Monkawa, Shizuka Fujii, Hiroshi Itoh. miR-34c attenuates renal fibrosis via Down-Regulation of Jagged1. Kidney Week 2013 年 11 月 11 日、米国アトランタ
3. Shintaro Yamaguchi, Koichiro Homma, Toshiaki Monkawa, Ryuji Morizane, Sayuri Suzuki, Shizuka Fujii, Shu Wakino, Koichi Hayashi, Hiroshi Itoh. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Kidney Specific Protein Positive cells. Kidney Week 2013 年 11 月 11 日、米国アトランタ
4. 山口慎太郎、本間康一郎、門川俊明、森實隆司、鈴木さゆり、藤井静花、脇野修、林晃一、伊藤裕; ヒト ES 細胞を用いた尿細管上皮細胞の分化誘導の試み; 第 56 回日本腎臓学会学術大会; 2013 年 5 月 10 日～12 日; 東京
5. Ryuji Morizane, Toshiaki Monkawa, Shizuka Fujii, Hiroshi Itoh. KSP-Positive Cells Derived from Mouse Embryonic Stem Cells Serve as Progenitors of Renal Tubule Cells. Kidney Week 2012 年 11 月 02 日、米国 San Diego
6. 森實 隆司, 門川 俊明, 伊藤 裕; マウス ES 細胞を用いた尿細管細胞の分化誘導; 第 55 回日本腎臓学会; 2012 年 06 月 01 日; パシフィコ横浜(神奈川)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門川 俊明 (MONKAWA TOSHIAKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80286484

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし