

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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2012～2012
 課題番号：24659454
 研究課題名（和文） ES / iPS 細胞におけるメカニカルストレスによるオルガネラ制御と細胞代謝・分化
 研究課題名（英文） Influence of mechanical stress applied to ES/iPS cells on organelle control and cell metabolism/differentiation
 研究代表者
 伊藤 裕（ITOHI HIROSHI）
 慶應義塾大学・医学部・教授
 研究者番号：40252457

研究成果の概要（和文）：ヒト ES 細胞から腎尿細管細胞への分化誘導法の確立し、その分化過程におけるメカニカルストレスの意義を明らかにすることを目指した。尿細管細胞への分化の指標としては、KSP を用いた。GSK3 阻害薬を用いて中間中胚葉への分化誘導を促進させ、その後 EGF を含む低血清培地により上皮化を促進したところ、KSP 陽性細胞を約 5% 程度得ることに成功した。一方、メカニカルストレスの細胞分化に与える影響を検討するため、ヒト近位尿細管細胞である HKC-8 を用いて条件検討を行ったが、十分なメカニカルストレスを与えるには至っておらず、今後更なる検討を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：Our objective was to establish a method for inducing the differentiation of renal tubular cells from human ES cells, and to clarify the significance of mechanical stress in the process of differentiation. KSP was used as a marker for renal tubular cell differentiation. Differentiation to an intermediate mesoderm was promoted using GSK3 inhibitor. Epithelization was then promoted using a reduced serum medium containing EGF, which successfully yielded approximately 5% KSP-positive cells. We then investigated the influence of mechanical stress on cell differentiation using HKC-8, a human proximal tubular cell, under different conditions. However, it was not possible to apply sufficient mechanical stress. We are therefore planning to conduct further investigations in the future.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：ES 細胞、細胞分化、腎臓細胞、メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで、肥満、糖尿病などの

内分泌疾患から心血管病へ至る連続した疾患群の“流れ”と“連鎖”を把握する概念として“メタボリックドミノ”を提唱している。その病態において、血管構成細胞、腎臓構成細胞、脂肪細胞の細胞分化破綻が、肥満、動脈硬化症、心筋症、腎不全の発症進展に大きく関与することがこれまでに明らかになっている。研究代表者らは、ES/iPS細胞を研究材料として未分化細胞から、これらメタボリックドミノに関与する各種成熟細胞への分科系譜を一貫して検討し、ヒトES細胞ならびにヒトiPS細胞から血管構成細胞や脂肪細胞への分化誘導法を確立し報告している。一方、高血圧症で認められるメカニカルストレスが細胞分化に影響を与えることはこれまでも知られていた。そこで研究代表者は培養細胞のメカニカルストレスを制御することで、細胞代謝の場である細胞内オルガネラと細胞代謝が変化してES/iPS細胞の分化に影響を与える可能性を着想した。すなわち、メカニカルストレス制御装置を用いたES/iPS細胞培養が、細胞分化に新しい効果をもたらす可能性について検討する本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

ヒトES/iPS細胞から腎臓構成細胞への分化誘導法は報告されていなかったため、その確立を目指し、その分化にメカニカルストレスの与える影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒトES細胞から腎尿細管上皮細胞への分化誘導法の確立

尿細管上皮細胞に特異的に発現しているタンパクであるKidney-specific protein(KSP)を分化の指標とした。ヒトES細胞をコラーゲン dish上に展開し、72時間GSK3 阻害

薬であるBIOを作用させ、中間中胚葉を含む間葉系へ分化させ、複数の増殖因子を組み合わせた低血清培地で7日間培養し上皮化を促進した。その間、経時的に中胚葉、中間中胚葉、KSPの遺伝子発現をリアルタイムPCR法で定量した。KSP陽性細胞を独自に作成した抗KSPモノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーで分取し、マトリゲル上で培養し管腔形成能を評価した。

(2) メカニカルストレスが細胞分化に与える影響の検討

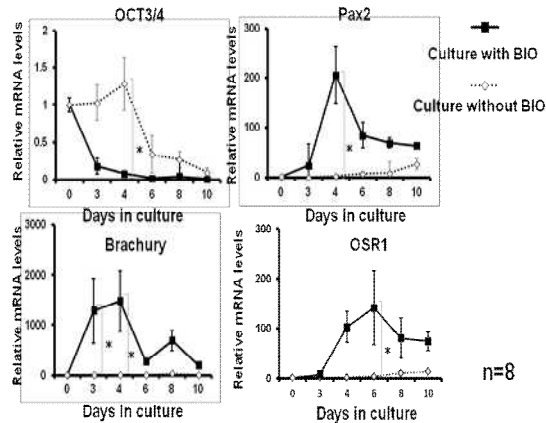
ヒト近位尿細管細胞であるHKC-8を用いた。培地はDMEM/F12(1:1)+FBS(10%)とし、50% confluentとなるまで37℃で専用のシリコンチャンバー(事前にFibronectinにてコーティングを行った)で培養した。ストレッチ株式会社製、生化学用伸展装置STB-140を用いて37℃、連続刺激(10往復/60秒)、休止時間2秒間、伸展長3.20mm 10%で24時間の伸展刺激を与え、その後回収した。PCRにてStretch前後(伸展刺激を与えた群と与えなかった群)で、E-cadherin、 α -SMA、Vimentinの発現変化を評価した。

4. 研究成果

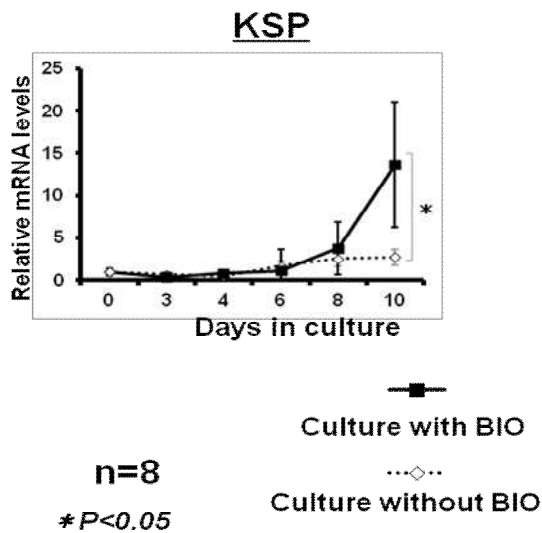
(1) BIO投与において、未分化マーカーであるOCT3/4が低下し、Brachury, Pax2, OSR1といった中間中胚葉から後腎間葉のマーカーの発現が誘導3日目から6日目でピークとなりその後低下した。この変化は、BIO非投与では認めなかった(図1)。一方、KSPは間葉系マーカーが低下した誘導7-8日目より上昇した(図2)。誘導10日目でのFACS解析では、約4%のKSP陽性細胞を認めた(図3)。分取したKSP陽性細胞をマトリゲル上で培養したところ、一部管腔構造を認めた(図4)。こ

のことより、ヒト ES 細胞から分化させた KSP 陽性細胞は尿管上皮細胞としての特性を有している可能性が示唆された。今後、さらに解析を進める予定である。

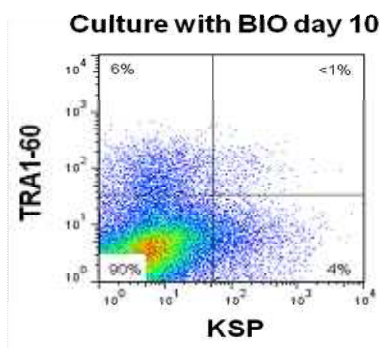
(図 1)



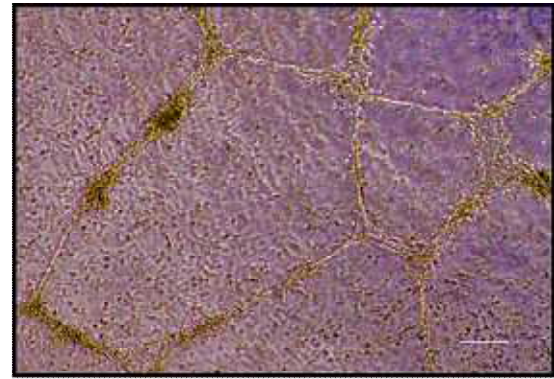
(図 2)



(図 3)



(図 4)



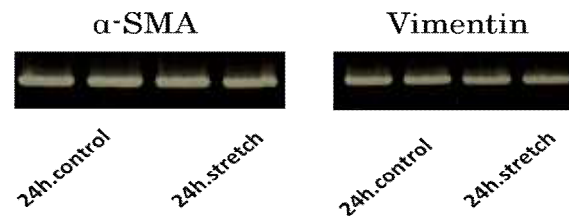
Bar: 500 um

(2) 半定量 PCR において、E-cadherin は伸展刺激後に発現が減少したが(図 5)、 α -SMA、Vimentin の発現には有意差を認めなかった(図 6)。E-cadherin 上流の Snail 1 の発現変化も認めなかったことより、伸展刺激により細胞接着が緩慢になったために E-cadherin のみ発現の減少があったと考察した。

(図 5)



(図 6)



以上の結果より、ヒト ES 細胞から腎尿管細胞への分化誘導法が確立できた一方、メカニカルストレスの条件は改善の必要があり、今後もさらに本研究を推進していく所存である。

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)

ヒト ES 細胞を用いた尿細管上皮細胞の分化誘導の試み

山口慎太郎、本間康一郎、門川俊明、森実隆司、鈴木さゆり、藤井静花、脇野修、林晃一、伊藤裕

第56回日本腎臓学会総会 2013年5月10日
東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 裕 (ITOH HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40252457

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし