

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670683

研究課題名(和文)腎組織幹細胞の誘導・分離に基づく腎再生研究基盤の確立

研究課題名(英文) Induction and isolation of renal stem cells and establishment of foundation for renal regeneration research.

研究代表者

渡部 昌実 (Watanabe, Masami)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：70444677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞やES細胞といった分化万能性細胞を用いることなく腎部分再生を可能にする為に本課題では腎組織幹細胞の樹立を目的とした研究を実施した。尿細管細胞由来の腎組織幹細胞の候補株が複数株樹立され、また継代数を重ねた状態でも細胞保存・維持が可能であることを確認した為、ヌードマウスに移植し、腫瘍形成性についての解析を加えた。その結果、腎組織幹細胞においては、iPS細胞のような腫瘍形成性を認めなかった。また、糸球体内皮細胞由来の腎組織幹細胞の候補株についても樹立を終え、腎組織幹細胞候補株について血管内皮特異的マーカーの発現等の解析を行った結果、一部の株についてVE-CADHERINの発現を確認した。

研究成果の概要(英文)：We herein aimed to establish human renal stem cells for renal regeneration research, without using iPS and ES cells. We established several clones of renal stem cells derived from primary proximal tubular cells by transfecting iPS four factors. The tumorigenicity was not observed in the renal stem cells when subcutaneously inoculated into nude mice. We also established clones of renal stem cells derived from the glomerular endothelial cells, and confirmed VE-CADHERIN expression in the renal stem cells.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：再生医学 腎臓 再生 幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞の樹立後、既に5年が経過(研究開始時)し、今後いかにこの発見を再生医薬品開発・臨床応用につなげるかが喫緊の課題となっている。岡山大学の我々のグループでは、現在までに、膀胱平滑筋細胞や尿路上皮細胞等の再生研究で成果を挙げてきた。一方で、泌尿器科領域では、腎臓機能再生に大きな期待が寄せられている。

従来の腎再生研究では、ES・iPS細胞からの順行性分化誘導法を利用され、ヒトiPS細胞から中間中胚葉細胞の分化誘導が既に報告されている。しかしながら、腎発生過程に沿って目的の腎組織幹細胞(腎機能再生に必要な自己増殖能を持つ幹細胞)を一つ一つ発生順を追って作成し応用する手法には大きな困難が伴う。これは、極めて希少な細胞から成る腎組織で、発生段階のどこに目的の幹細胞が存在するのか未知であり、また分化誘導した幹細胞を選別・分離する技術も確立されていないからである。

## 2. 研究の目的

近年のES(胚性幹)・iPS(人工多能性幹)細胞の発見により、泌尿器科領域において腎臓再生に大きな期待が寄せられている。しかしながら腎機能を担う腎小体・尿管の再生につながる腎組織幹細胞の樹立は未だ為されていない。本研究では、これら分化万能性細胞を用いることなく腎部分再生を可能にする為に、本研究では腎組織幹細胞を樹立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

市販の正常腎臓由来の初代培養細胞(尿管系および血管内皮系細胞としてそれぞれ培養)に山中4因子

(OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC)をトランスフェクションして、iPS細胞までさかのぼることのできなかった細胞クローンを尿管系および血管内皮系幹細胞の候補株として分離した。これらの腎組織幹細胞の候補株について、幹細胞としての永久の自己複製能を50継代まで培養することにより確認すると同時に、腎組織幹細胞として必須の胎生期分化誘導因子と考えられるOsr1, WT1, Pax2等について、発現マーカーとしての検証を加えた。

さらに、得られた尿管系および血管内皮系幹細胞から成る腎組織幹細胞について、これらの幹細胞の多分化能を検証する為の実験を行った。腎小体の発生の過程では、後腎間葉細胞からメソ腎細胞、腎足細胞、尿管系細胞(近位尿管、遠位尿管、ホウライ嚢を構成)が分化誘導され、一方、血管前駆細胞から糸球体血管内皮細胞が発生することが分かっている。すなわち、腎機能の最小単位である「機能的腎小体」の再生にはこれらの4種の細胞群の再生が必要であると考えられる。この学術的背景を踏まえると、我々が本申請研究で樹立を予定している尿管系幹細胞および血管内皮系幹細胞は、それぞれが後腎間葉細胞および血管前駆細胞として機能するものであるとも考えられる。具体的には、マウスにこれらの腎組織幹細胞を移植し、生体内での機能的腎小体の再生を組織学的に検証する実験を行った。今後、ヒト由来の腎組織幹細胞群の動物生体内での腎小体への形態学的分化が確認されれば、どの人工幹細胞からこういった腎小体構成細胞が発生するのかを細胞トレイ用マーカーを用いて組織学的に解析する方針である。また、同所性にマウス・ラットの腎臓内に移植した腎組織幹細胞が移植後どのような機序で腎小体に分化誘導し、さらに、実際に腎機能障害を有する動物に移植することにより腎機能が改善されるかどうかを検証することとしている。文献的には特定のヒト間葉系幹細胞をラットの発

生期腎臓領域に打ち込むことによりヒトとラットの細胞が混じり合った腎臓様組織が作り出されており (Proc Natl Acad Sci U S A 102:3296-3300, 2005)、実際にヒトの腎臓機能再生では、腎臓組織幹細胞の生体内移植により、その最小単位「機能的腎小体」の再生に直結させる新技術が不可欠であると判断される。我々のこれまでの研究により、山中4因子により初代培養細胞から誘導された幹細胞の Epigenetic memory による各由来組織への分化志向性が明らかとなっており、本研究ではこの逆行性幹細胞誘導法の実験手法を用いてヒト腎臓組織幹細胞の樹立を試みた。

#### 4 . 研究成果

本研究では、泌尿器科領域での腎臓再生を踏まえた誘導性組織特異的幹細胞 (induced tissue-specific stem cells: iTS 細胞) の樹立を目指した。一般的には iTS 細胞とは、永遠の自己複製能を持ち、しかも iPS 細胞や他の幹細胞と比べて容易に当該目的臓器細胞に分化誘導が可能で、かつ奇形腫形成が無く ES/iPS 細胞で懸念される未分化細胞残存による腫瘍形成の心配が無い、そういった幹細胞群を指す。本研究の成果としては、尿細管細胞由来の腎臓組織幹細胞の候補株が複数株樹立され、また継代数を重ねた状態でも細胞保存・維持が可能であることを確認した。また、血管内皮細胞由来の腎臓組織幹細胞の候補株についても樹立を終え、それぞれの腎臓組織幹細胞候補株について血管内皮特異的マーカーの発現等の解析を行った結果、一部の株について VE-CADHERIN の発現が確認できた。これらのヒト腎臓を構成する正常細胞由来の腎臓組織幹細胞の樹立により、将来的にこれらの細胞を直接的に患部に移植する再生医療や、さらには ex vivo での各臓器再生にこれらの細胞を有効利用できる可能性が高い。また本研究で用いた逆行性幹細胞誘導法により様々

な iTS 細胞が樹立されれば、iPS 細胞と同様に、再生医療の分野、特に該当する各組織・臓器の再生の観点から、極めて有用な幹細胞となることが期待される。

#### 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)

[雑誌論文](計 9件)

Islet Culture/Preservation Before Islet Transplantation.  
Cell Med. 2015 Aug 26;8(1-2):25-29.  
Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Kurima K, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M.  
doi: 10.3727/215517915X689047.

Cryopreservation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells.  
Cell Med. 2015 Aug 26;8(1-2):3-7.  
Miyagi-Shiohira C, Kurima K, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M, Noguchi H.  
doi: 10.3727/215517915X689100.

Induction of tissue-specific stem cells by reprogramming factors, and tissue-specific selection.  
Cell Death Differ. 2015 Jan;22(1):145-55.  
Hirofumi Noguchi, Issei Saitoh, Takako Tsugata, Hitomi Kataoka, Masami Watanabe, Yasufumi Noguchi.  
doi: 10.1038/cdd.2014.132.

Potential Factors for the Differentiation of ESCs/iPSCs Into Insulin-Producing Cells.  
Tsugata T, Nikoh N, Kin T, Saitoh I,

Noguchi Y, Ueki H, Watanabe M, James Shapiro AM, Noguchi H.  
Cell Med. 2014 Dec 12;7(2):83-93.  
doi: 10.3727/215517914X685178.

Establishment of a pancreatic stem cell line from fibroblast-derived induced pluripotent stem cells.

Takashi Kuise, Hirofumi Noguchi, Hiroshi Tazawa, Takashi Kawai, Masaya Iwamuro, Issei Saitoh, Hitomi Usui Kataoka, Masami Watanabe, Yasufumi Noguchi and Toshiyoshi Fujiwara .  
Biomed Eng Online. 2014 May 27;13:64.  
doi: 10.1186/1475-925X-13-64.

Comparison of Incubation Solutions Prior to the Purification of Porcine Islet Cells.

Kawai T, Noguchi H, Kuise T, Nakatsuka A, Katayama A, Imagawa N, Kataoka HU, Saitoh I, Noguchi Y, Watanabe M, Fujiwara T.  
Cell Med. 2013 Oct 21;6(1-2):9-14.  
doi: 10.3727/215517913X674180.

Comparison of New Preservation Solutions, HN-1 and University of Wisconsin Solution, in Pancreas Preservation for Porcine Islet Isolation.

Katayama A, Noguchi H, Kuise T, Nakatsuka A, Hirota D, Kataoka HU, Kawai T, Inoue K, Imagawa N, Saitoh I, Noguchi Y, Watanabe M, Wada J, Fujiwara T.  
Cell Med. 2013 Oct 21;6(1-2):3-8.  
doi: 10.3727/215517913X674171.

Isolation Efficiency of Mouse Pancreatic Stem Cells Is Age Dependent.

Kuise T, Noguchi H, Saitoh I, Kataoka HU,

Watanabe M, Noguchi Y, Fujiwara T.  
Cell Med. 2013 May 14;5(2-3):69-73.  
doi: 10.3727/215517913X666503.

Culture Conditions for Mouse Pancreatic Stem Cells.

Noguchi H, Saitoh I, Kataoka HU, Watanabe M, Noguchi Y, Fujiwara T.  
Cell Med. 2013 May 14;5(2-3):63-8.  
doi: 10.3727/215517913X666495.

〔学会発表〕(計 2件)

岡山大学泌尿器科における腎尿路系細胞の再生に関する研究, 第14回 日本再生医療学会総会, 渡部昌実, 野口洋文, 那須保友, 公文裕巳: 2015.3.21, パシフィコ横浜

尿路性器癌における癌増悪因子: CD147 (Emmprin)を標的とした抗癌免疫・再生療法に関する基盤研究, 第14回 日本再生医療学会総会, 渡部昌実, 野口洋文, 那須保友, 公文裕巳: 2015.3.21, パシフィコ横浜

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡部 昌実

(WATANABE MASAMI)

岡山大学・岡山大学病院・教授

研究者番号：70444677

(2)研究分担者

野口 洋文 (NOGUCHI HIROFUMI)

琉球大学・医学部・教授

研究者番号：50378733

杉本 盛人 (SUGIMOTO MORITO)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：30613161

植木 英雄 (UEKI HIDEO)

岡山大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：90537218

賀来 春紀 (KAKU HARUKI)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：60346426