

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860674

研究課題名(和文)腎不全への細胞移植療法を目指したヒト多能性幹細胞からネフロン前駆細胞への分化誘導

研究課題名(英文)Development of cell therapy using hiPS-derived nephron progenitors

研究代表者

豊原 敬文 (Toyohara, Takafumi)

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号：60594182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、様々な臓器に分化しうるヒト多能性幹細胞から、腎臓の機能単位であるネフロンの構成細胞を派生させるネフロン前駆細胞への分化誘導法をさらに高効率に改善し、腎不全モデル動物に細胞移植することで、新たな腎不全治療の開発を目指すことを目的としていた。本期間中に、40%前後までネフロン前駆細胞のマーカーであるSIX2の陽性細胞を作製することに成功した。また、このネフロン前駆細胞は、主に近位尿細管に分化することを確認した。このネフロン前駆細胞を急性腎不全モデルマウスに移植することによって、腎障害が改善することも明らかとした。本研究成果は、新たな腎不全治療の開発に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated double reporter hiPSC lines, allowing us to monitor and isolate OSR1+SIX2+ nephron progenitors. We then established a multistep differentiation protocol from hiPSCs into OSR1+SIX2+ nephron progenitors with the induction efficiency nearly 40%. These human nephron progenitors differentiate into multiple renal epithelia including glomerular podocytes and tubular cells, and reconstitute three-dimensional renal structures in vitro and in vivo. Moreover, we found that renal subcapsular transplantation of hiPSC-derived OSR1+SIX2+ nephron progenitors ameliorated acute kidney injury in mice induced by ischemic reperfusion injury. Our results suggest that regenerative medicine strategies for kidney diseases could be developed using the hiPSC-derived renal cells.

研究分野：再生医学、腎生理学

キーワード：再生医学 ネフロン前駆細胞 急性腎不全 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) CKD は世界中で人口の 10%を超えると報告されており (Go, A. S. *et al.*, 2004) CKD が進行し末期腎不全になると、腎臓移植あるいは透析療法を行う必要がある。腎臓移植のドナーが常に不足している本邦では、そのほとんどが透析療法を行っているが、長期間の透析に伴う心血管合併症、日常生活における飲食制限などの患者の QOL の低下や、多額の医療費が必要であることなどの問題点があり、新たな腎不全治療の必要性が指摘されてきた。

(2) 研究協力者である長船らによって、成体腎臓の主要機能単位であるネフロンを構成する糸球体、尿管等の多種類の上皮細胞に分化するネフロン前駆細胞が、マウスの胎児腎臓中に存在することが示されている (Osafune, K. *et al.*, 2006)。また、ヒト成体腎臓内にも同様のネフロン前駆細胞が存在し、横紋筋融解症腎不全モデルマウス、アドリアマイシン腎症モデルマウスに細胞移植することで、腎臓に生着して腎不全が改善することが示されている (Sagrinati, C. *et al.*, 2006; Ronconi, E. *et al.*, 2009)。そこで、申請者は、無限に増殖して、様々な種類の細胞に分化できるヒト多能性幹細胞からネフロンに分化可能なネフロン前駆細胞を作製することで、廃絶した腎組織を再生する細胞移植療法や腎臓再生療法などの新たな腎不全治療法の開発が可能になるとの着想に至った。

2. 研究の目的

発生生物学の知見によると、腎臓は初期の胚葉の一種である中間中胚葉から発生する (Mugford, J. W. *et al.*, 2008)。ヒトにおいてもほぼ同じ発生過程で腎臓が形成されることが予想されるので、ヒト多能性幹細胞からネフロン前駆細胞を効率よく作製する際の重要なステップは、最初の多能性幹細胞から中間中胚葉、さらに、中間中胚葉からネフロン前駆細胞を分化誘導させることと考えられるが、その分化誘導法は未だに確立されていない。中間中胚葉の最も早期かつ特異的なマーカー遺伝子の一つに転写因子 *Osr1* (Odd-skipped related 1) があり、lineage tracing 実験によって、*Osr1* 陽性細胞が成体腎臓を構成するほとんどの細胞に分化することが示されている (Mugford, J. W. *et al.*, 2008)。さらに、マウス胎児を用いた lineage tracing 実験によると、ネフロン前駆細胞に最も特異的なマーカー遺伝子の一つは核内転写因子 *Six2* で

あることが知られている (Kobayashi, A. *et al.*, 2009)。よって、ネフロン前駆細胞を分化誘導する際に、*SIX2* の発現を指標とすることが適切であると考えられた。共同研究者の長船らは、既に *OSR1* 遺伝子座に緑色蛍光蛋白質 (GFP) を相同組み換え法を用いて導入した *OSR1*-GFP レポーターヒト iPS 細胞株を樹立し、アクチビンなどの成長因子や低分子化合物を用いて、*OSR1* 陽性細胞を 90%以上の高効率で分化誘導することに成功している (Mae, SI. in revision; Araoka, T. in preparation)。さらに、申請者は、若手研究(B) (H23-H24) において *OSR1*-GFP レポーターヒト iPS 細胞株の *SIX2* 遺伝子座に赤色蛍光蛋白質(tdTomato)を相同組換え法により導入した *OSR1*-GFP/*SIX2*-tdTomato ダブルレポーターヒト iPS 細胞株の樹立に成功している。また、*SIX2*-tdTomato レポーターヒト iPS 細胞株を用いて、約 60 種類の成長因子、化合物の中から *SIX2* 分化誘導剤のスクリーニングを行い、TGFβ1 と Activin receptor-like kinase (ALK)2 の inhibitor である Dorsomorphin を組み合わせることで、*SIX2* 陽性細胞を 15%前後誘導することに成功している。このため、本研究期間に、申請者は下記の 3 点を行うことを目的とした。

(1)ヒト多能性幹細胞から *SIX2* 陽性ネフロン前駆細胞を、より高効率に分化誘導する成長因子や化合物の探索と分化誘導プロトコルの確立

(2)ヒト多能性幹細胞由来ネフロン前駆細胞と生体内ネフロン前駆細胞との比較、発生生物学および生理学的機能の綿密な検証

(3)ヒト多能性幹細胞由来ネフロン前駆細胞の腎不全病態モデル動物への移植と腎不全改善効果の検証

3. 研究の方法

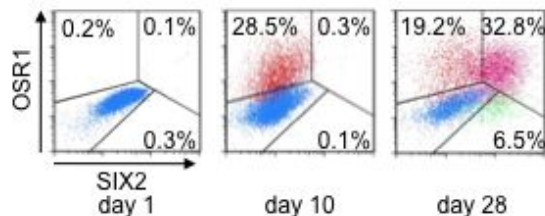
(1) *SIX2*-tdTomato レポーターヒト iPS 細胞株とフローサイトメーター (ベクトン・ディッキンソン社の LSR Fortessa™ HTS option) を組み合わせて、高速かつ定量的に、ヒト多能性幹細胞から *SIX2* 陽性ネフロン前駆細胞を高効率に分化誘導する分化誘導剤の探索を行う。具体的には、我々が発見した TGFβ1 と Dorsomorphin の組み合わせに追加、あるいは変更することで、より高効率に *SIX2* 陽性細胞を作製する方法を探索する。

(2) 遺伝子発現解析や表面抗原マーカーを用いて、ヒト多能性幹細胞由来ネフロン前駆細胞とマウスネフロン前駆細胞との比較を行う。さらに、ヒト多能性幹細胞由来ネフロン前駆細胞を用いて、長期培養、マウス胎児細胞との器官培養、マウス生体内への移植実験を行う。これらから、ヒト多能性幹細胞由来ネフロン前駆細胞が生体内ネフロン前駆細胞と類似した細胞であるかどうか、発生生物学および生理学的観点からの綿密な検証を行う。

(3) ヒト多能性幹細胞由来ネフロン前駆細胞を腎不全病態モデル動物（横紋筋融解症、アドリアマイシン腎症、虚血再灌流急性腎不全、糖尿病性腎症）の腎臓へ細胞移植することで、腎不全改善効果を有するかどうかを検証を行う。

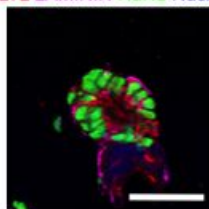
4. 研究成果

(1) に関しては、分化誘導剤の探索から発見された同じく ALK2 の inhibitor である DMH1 を使用することによって、従来の 15%前後から 40%前後まで高効率に SIX2 陽性細胞を作製することに成功した。



(2) SIX2 陽性細胞の中でも、特に OSR1、SIX2 共陽性細胞が、生体ネフロン前駆細胞に近い遺伝子発現をしていることを確認した。さらに、この OSR1、SIX2 共陽性細胞を 3T3Wnt4 細胞やマウス胎児 Spinal cord と共培養、マウス胎生腎臓と器官培養することによって、ネフロンの中でも、主に近位尿細管に分化する性質を有することを確認した。また、免疫不全マウスの fat pad への移植においても、同様に尿細管様構造を形成した。

LTL LAMININ HuNu Nuclei

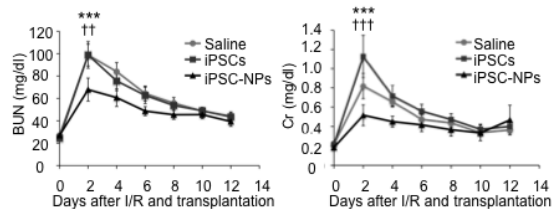


マウス後腎との共培養による尿細管様構造の構築

スケールバー：50 μm

LTL: *Lotus Tetragonolobus* Lectin (近位尿細管マーカー)
 LAMININ: 細胞極性マーカー
 HuNu: human nuclei

(3) に関しては、OSR1、SIX2 共陽性細胞を虚血再灌流急性腎不全モデルマウスの腎被膜下に移植することによって、腎機能のマーカーである血中尿素窒素 (BUN) およびクレアチニン (Cr) の虚血灌流後の上昇が、移植群で優位に低下することを明らかとした。さらに、腎組織障害も改善することを明らかとした。



iPSCs: 未分化 iPS 細胞

iPSC-NPs: iPS 細胞由来ネフロン前駆細胞

一方で、マウスネフロン前駆細胞との表面マーカーの比較検討や、虚血再灌流急性腎不全モデルマウス以外の横紋筋融解症、アドリアマイシン腎症モデルマウスなどに対する治療効果は、本研究期間中には検討ができなかった。特に、急性腎不全ではなく、慢性腎不全モデルである糖尿病性腎症モデルに対する移植は今後検討すべき課題である。

しかし、分化誘導法をさらに高効率に改善し、腎不全モデル動物に細胞移植することで、新たな腎不全治療の開発を目指すという本研究の目的は、本期間中に概ね達成されたものと考えられる。今後さらに臨床応用を目指した研究を進めていく予定である。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

第 57 回日本腎臓学会学術総会
 第 14 回日本再生医療学会総会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
 出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊原 敬文 (TOYOHARA Takafumi)
京都大学 iPS 細胞研究所
特定研究員
研究者番号：60594182

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：