

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09258

研究課題名(和文)患者由来iPS細胞の腎分化系を用いたARPKDの病態モデル作製

研究課題名(英文)Generation of ARPKD disease models using renal differentiation of patient-derived iPS cells

研究代表者

長船 健二 (OSAFUNE, Kenji)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：80502947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から前方中間中胚葉とウォルフ管(中腎管)の細胞を70%以上の高効率で分化誘導し、さらにゲルの中での三次元培養を行うことで発芽と分岐を示し、尿管芽のマーカー遺伝子であるGATA3, RET, CK19, PAX2, CALB1などを発現する尿管芽様組織を作製する分化誘導法を確立した。さらに、ARPKD患者体細胞から樹立したiPS細胞株を本分化誘導法により尿管芽様組織に分化することにも成功し、現在、健康人由来iPS細胞から作製した尿管芽組織との比較を行い、尿管芽の段階でARPKDに生じる異常の有無と集合管へのさらなる分化誘導を行っている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have succeeded in inducing human iPS cells into anterior intermediate mesoderm cells and Wolffian duct (nephric duct) cells at the induction rate more than 70% in two-dimensional adherent cultures and established the method to generate ureteric bud (UB)-like tissues in three-dimensional cultures using gels from the induced Wolffian duct cells. The generated UB-like tissues exhibited their typical biological features, budding and branching, and the expression of marker genes, such as GATA3, RET, CK19, PAX2 and CALB1. Furthermore, we have succeeded in generating the UB-like tissues from iPS cells derived from the patients with autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) by applying the established differentiation method. We are currently examining the disease phenotypes in the UB-like tissues by comparing their counterparts generated from control iPS cells and developing the differentiation method to induce collecting ducts from UB-like tissues.

研究分野：再生医学

キーワード：ヒトiPS細胞 腎臓 中間中胚葉 尿管芽 集合管 ARPKD

1. 研究開始当初の背景

現在本邦において、末期慢性腎不全により透析療法を受けている患者総数は 30 万人以上となっており、透析医療費は年間 1 兆 5 千億円を越え、腎疾患は医学的のみならず医療経済的にも大きな問題を引き起こしている。多くの腎疾患において、その病態解明とそれに基づく治療法開発は進んでいない。なかでも最も頻度の高い遺伝性腎疾患であり腎臓に進行性に多数の嚢胞を形成し腎機能不全を引き起こす、常染色体優性多発性嚢胞腎 (autosomal dominant polycystic kidney disease; ADPKD) や常染色体劣性多発性嚢胞腎 (autosomal recessive polycystic kidney disease; ARPKD) などの嚢胞性腎疾患の病態機序の解明や根治的治療薬の開発研究の進展が期待されている。

一方、近年、無限の増殖能と全身の細胞種への分化能を有する iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell; 人工多能性幹細胞) から分化誘導された特定細胞種の移植によって臓器機能の回復を図る再生医療が注目を集めているが、細胞療法に加えて iPS 細胞を用いて難治性疾患の病態解明や治療薬開発を目指す「疾患モデル作製研究 (disease modeling)」が実施可能となった。それは、難治性疾患の患者体細胞より樹立された疾患の発症に關与する遺伝情報を有する iPS 細胞 (疾患特異的 iPS 細胞) を *in vitro* において、その病気で傷害される罹患細胞種へ分化誘導することにより病態を再現する疾患モデルを作製し、詳しい病態解析や治療薬探索を行う研究のことである。現在までに、さまざまな難治性疾患において患者体細胞からの iPS 細胞の樹立と疾患モデルを作製する研究が盛んに行なわれている。一方、これまで、ADPKD、ARPKD とともに主にマウスなどの疾患動物モデルを用いて研究が行われてきたが、完全な病態解明までには至らず、根治的な治療薬も開発されていないため、動物モデルと相補的に使用できるヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* の疾患モデルの開発が期待されている。

iPS 細胞を用いた ADPKD、ARPKD の疾患モデルを開発するためには、発生過程を再現して、両疾患において腎嚢胞を発生させる細胞種である腎集合管を分化誘導する必要がある。腎臓発生の知見によると、胎生初期の胚葉組織の一種である中間中胚葉から「後腎間葉」と「尿管芽」と呼ばれる 2 つの胎生腎組織が発生し、その相互作用によって後腎間葉はネフロンのうち糸球体から遠位尿管管までの部位に分化する。一方、尿管芽は集合管より下部の尿路系を構築する (Saxen L, 1987)。申請者らは、ヒト iPS 細胞から中間中胚葉を高効率に分化誘導する方法を確立した (Mae SI. et al., 2013)。また、近年、ヒト iPS 細胞由来の中間中胚葉から後腎間葉に含まれるネフロン前駆細胞を分化誘導する方法やそれより糸球体と尿管管を含む腎組織の形成が報告されているが (Takasato M. et al.,

2014; Taguchi A. et al., 2014; Lam AQ. et al., 2014; Kang M. et al., 2014)、尿管芽や集合管への分化誘導は報告が依然少なく未確立のままである。

2. 研究の目的

本研究では、特に ARPKD に焦点を絞り、ヒト iPS 細胞から同疾患で傷害される腎細胞種である胎生期腎臓の尿管芽細胞を経て、それより派生する集合管細胞への高効率分化誘導法を確立する。また、ヒト iPS 細胞由来の尿管芽や集合管細胞をフローサイトメトリーを用いて単離するための特異的な細胞表面抗原を同定する。そして、ARPKD 患者由来 iPS 細胞をそれらの傷害腎細胞種へ分化誘導することによって、ARPKD の腎嚢胞形成を再現する新規疾患モデルの開発を目指す。最終目標として、新規の治療標的分子となりうる病態関連分子の同定や腎嚢胞形成を模倣する培養系を構築することによって、腎嚢胞形成を阻害する治療薬のスクリーニング系開発に繋げる。

3. 研究の方法

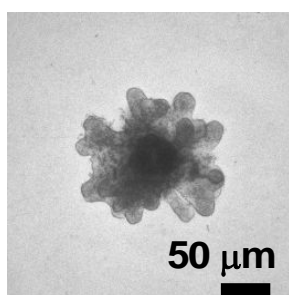
腎臓発生の知見に基づき、増殖因子および低分子化合物ライブラリの探索を行い、申請者らが既に開発しているヒト iPS 細胞から中間中胚葉を経て、約 40% の効率で分化誘導される尿管芽細胞の分化誘導効率を 100% 近くまで高める方法を開発する。さらに、ヒト iPS 細胞由来の尿管芽細胞から集合管細胞への分化誘導法を開発し、細胞表面抗原の探索によってモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーによる尿管芽や集合管細胞の単離法を開発する。それらの方法を用いて ARPKD 患者由来 iPS 細胞と対照である健常日本人由来の iPS 細胞から分化誘導した尿管芽および集合管細胞を単離し、遺伝子発現の比較解析による ARPKD 病態関連分子の同定、尿管芽集合管分化系のどの時点で異常が生じるかの解析や尿管芽分枝の異常や集合管の拡張など *in vivo* の病態を再現する *in vitro* 培養系の確立を行い、新規治療標的分子の同定や治療薬スクリーニング系の開発に繋げる。

4. 研究成果

独自の二次元培養法を開発し、ヒト iPS 細胞から OSR1、GATA3、PAX2 などのマーカー遺伝子を発現する前方中間中胚葉とウォルフ管 (中腎管) の細胞を共に 70% 以上の高効率で分化誘導し、さらにウォルフ管細胞の細胞塊のゲル中での三次元培養を行うことで発芽と分枝を示し、尿管芽のマーカー遺伝子である GATA3、RET、CK19、PAX2、CALB1 などを発現する尿管芽様組織を作製する分化誘導法を確立した (図 1; Mae SI., Ryosaka M. et al., 2018)。形成された尿管芽様組織は、生体内のものと同様に先端部 (tip) に RET、CALB1、幹部 (trunk) に CK19 を発現し、先端

部と幹部に分かれている極性を有することも確認した。さらに、ARPKD 患者体細胞から樹立した iPS 細胞株を本分化誘導法により尿管芽様組織に分化することにも成功した。加えて、これらの尿管芽様組織を長期間培養することにより、一部に集合管マーカー遺伝子を発現する細胞が出現することを確認した。また、RNA sequencing 解析により尿管芽細胞を単離できる細胞表面抗原を同定し、その分子に対するモノクローナル抗体を用いて ARPKD 患者由来 iPS 細胞から分化誘導した尿管芽細胞を単離できることも確認した。現在、健常日本人由来 iPS 細胞から作製した尿管芽様組織との比較を行い、尿管芽の段階で ARPKD に生じる異常の有無の検討を行っている。また、ヒト iPS 細胞由来の尿管芽様組織から集合管様組織への分化誘導法の開発を行っている。

(図 1)



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 16 件)

奥村詩織、前伸一、長船健二、腎臓病患者由来 iPS 細胞の活用、カレントセラピー、査読無、36(3)巻、2018、87

長船健二、ゲノム編集と iPS 細胞、日本腎臓学会誌、査読無、60(1)巻、2018、15 - 20

片桐直子、長船健二、iPS 細胞による腎再生にむけた AI の活用、腎臓、査読無、40 巻、2018、28 - 31

Mae SI, Ryosaka M, Toyoda T, Matsuse K, Oshima Y, Tsujimoto H, Okumura S, Shibasaki A, Osafune K, Generation of branching ureteric bud tissues from human pluripotent stem cells、Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、495(1)、2018、954-961
DOI:10.1016/j.bbrc.2017.11.105

辻本啓、長船健二、iPS 細胞を用いた腎臓再生、最新医学、査読無、72(12)巻、2017、1726-1732

長船健二、iPS 細胞を用いた腎再生療法の未来：他分野との比較、腎臓内科・泌尿器科、査読無、5(6)巻、2017、532 - 538

長船健二、iPS 細胞による再生と臓器移植、移植、査読無、52(1)、2017、1 - 6

末田 伸一、長船 健二、iPS 細胞を用いた腎疾患に対する再生医療の展望、医学のあゆみ、査読無、257 巻、2016、1141-1145

落合 美由希、長船 健二、腎疾患と iPS 細胞、臨床免疫・アレルギー科、査読無、65 巻、2016、588-592

長船 健二、iPS 細胞を用いた成人血管病関連疾患に対する再生医療開発と病態解析に関する研究、最新医学、査読無、71 巻、2016、169-175

長船 健二、iPS 細胞研究の臨床への応用 -透析関連領域を中心に-、大阪透析研究会会誌、査読無、34 巻、2016、1 - 6

兩坂 誠、長船 健二、iPS 細胞を用いた腎臓再生と腎疾患治療への応用、腎臓内科・泌尿器科、査読無、3 巻、2016、153 - 159

長船 健二、iPS 細胞を用いた腎疾患モデル作製と新規治療薬開発、PHARMSTAGE、査読無、15 巻、2015、10 - 13

安野 哲彦、長船 健二、中島 衡、腎疾患研究における iPS 細胞の利用 (疾患特異的 iPS 細胞) 腎と透析、査読無、15 巻、2015、941 - 944

居神 麻衣子、長船 健二、iPS 細胞を用いた腎臓再生と疾患モデルへの応用、バイオマテリアル - 生体材料 -、査読無、33 巻、2015、218 - 223

笠原 朋子、長船 健二、iPS 細胞を使った腎臓疾患研究、病理と臨床、査読無、33 巻、2015、587 - 591

[学会発表](計 9 件)

Modeling polycystic kidney disease using iPS cells, 長船 健二, ISN Frontiers Meetings 2018. (招待講演) (国際学会)

PKD 疾患モデル開発に向けたヒト多能性幹細胞を用いた尿管芽組織の作製、兩

坂誠, 第 17 回 PKD 研究会, 2018.

iPS 細胞を用いた腎再生研究の現状と展望, 長船健二, 第 67 回日本泌尿器科学会中部総会 シンポジウム 3. 講演, 2017. (招待講演)

腎臓病と iPS 細胞, 長船健二, 第 10 回日本獣医腎泌尿器学会学術集会・総会. 記念講演, 2017. (招待講演)

再生医療, 長船健二, 第 62 回日本透析医学会学術集会・総会. 特別講演, 2017. (招待講演)

iPS 細胞を用いた細胞療法の開発と疾患モデル作製研究, 長船健二, 第 62 回日本透析医学会学術集会・総会. シンポジウム 18 「再生医療最前線」, 2017. (招待講演)

教育講演 4 「腎臓の再生」, 長船健二, 第 60 回日本腎臓学会学術総会, 2017. (招待講演)

iPS 細胞を用いた腎臓の再生, 長船健二, 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム 1 「臓器・組織の再生と治療への応用」, 2017. (招待講演)

From human pluripotent stem cells to early nephron, Kenji Osafune, 52nd ERA-EDTA Congress, 2015 年 05 月 28 日 ~ 2015 年 05 月 31 日, ExCeL London, London, UK. (招待講演)(国際学会)

〔図書〕(計 3 件)

Little MH, Osafune K, Elsevier, Kidney Transplantation, Bioengineering and Regeneration, 2017, 937-955.

Osafune K, Elsevier, Kidney Development, Repair and Regeneration, 2015, 473-490.

Osafune K, Springer, Pediatric Nephrology, 2016, 525-569.

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ヒト iPS/ES 細胞から効率良く尿管芽組織を作製することに成功
<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/171129-190000.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長船 健二 (OSAFUNE, Kenji)
京都大学・iPS 細胞研究所・教授
研究者番号：8 0 5 0 2 9 4 7

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

()