

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15546

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた難治遺伝性腎疾患に対する新規病態モデルの開発

研究課題名(英文) Development of a novel pathological model for intractable hereditary kidney disease using human iPS cells

研究代表者

前 伸一 (Mae, Shin-ichi)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：50749801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性多発性嚢胞腎(autosomal dominant polycystic kidney disease; ADPKD)は、進行性に多数の腎嚢胞が形成されることにより腎腫大が生じ、末期慢性腎不全に至る疾患である。ADPKDにおける腎嚢胞は、尿細管および集合管に由来し、集合管からより多くの嚢胞が形成されると考えられている。そこで、ヒトiPS細胞から集合管を派生させる胎生組織である尿管芽を分化誘導する方法を開発した。また、ADPKDの原因遺伝子であるPKD1をノックアウトしたヒトiPS細胞を樹立し、集合管細胞を選択的に作製する方法の開発も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未だ確立されていないヒトiPS細胞から幾度も分枝する尿管芽組織を作製し、集合管細胞を分化誘導する方法を開発したことが新規性に富んでおり、ADPKDのみならず、集合管系譜に生じる腎疾患のモデル作製研究への応用が期待される。今後は、ヒトに応用可能な新規の腎嚢胞モデルを確立することで、これまで明らかにされていない腎嚢胞を発生させる腎細胞種の同定に至ることが期待される。将来的には、その細胞を標的として、ADPKDを含む嚢胞性腎疾患における腎臓再生を促す薬剤や腎臓の生理機能を制御する薬剤の開発などの革新的な再生医療の実現に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is a disease that causes renal enlargement due to progressive formation of many renal cysts, leading to end-stage chronic renal failure. Renal cysts in ADPKD are derived from renal tubules and collecting ducts and it is believed that more cysts form from collecting ducts. Therefore, we developed a method to induce differentiation of ureteral bud, which is the embryonic tissue that derives collecting ducts from human iPS cells. In addition, we established PKD1 knock out human iPS cell lines, and developed methods for selectively producing collecting duct cells from ureteric bud.

研究分野：再生医学

キーワード：ヒトiPS細胞 常染色体優性多発性嚢胞腎 尿管芽 腎集合管

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性嚢胞腎 (polycystic kidney disease; PKD) は、進行性の多数の腎嚢胞形成とその結果として生じる腎腫大によって、透析療法や腎移植などの腎代替療法が必要な末期腎不全を引き起こす疾患である。PKD は常染色体優性多発性嚢胞腎 (autosomal dominant PKD; ADPKD) と常染色体劣性多発性嚢胞腎 (autosomal recessive PKD; ARPKD) に大別される遺伝性疾患である。ADPKD は、腎嚢胞だけでなく、肝嚢胞や脳動脈瘤などの重篤な合併症を発症する。一方、ARPKD では腎嚢胞に加え、先天性肝線維症、肝嚢胞、肺低形成などの合併症が認められる。本邦における患者総数は約 3 万人、世界中では 1,000 万人以上と推定されている。しかし、両疾患とも腎嚢胞形成機序は依然として説明できない点が多く、有効な治療法が確立されていないため、患者には腎代替療法や対症療法が施されているのが現状である。そこで、PKD に対する新規の医薬品や医療技術を開発することが課題として挙げられるが、そのためには腎嚢胞形成を再現するヒトに応用可能な新規病態モデルを確立し、治療薬探索、薬剤腎毒性評価系などの研究へ発展させることが必要である。

生体から採取した罹患細胞もしくは組織由来する初代培養細胞は、疾患研究において非常に有用なツールであるが、その採取は困難であり、表現型が変化することも多い。また、マウスなどのモデル動物は、疾患の病態解明や先天奇形の解析などに幅広く用いられているが、ヒトとの遺伝子数の違いや、体の大きさの違いによる薬物動態の差異などの影響から、適切なモデルであるか否かを解釈することが難しい。これらの理由から、モデル動物で見出された知見をヒトに適用可能か検証するための病態モデルを開発することが不可欠である。そこで、申請者は、ヒトのすべての体細胞に分化しうる性質を有する iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) を用いて罹患組織を作製することが、病態モデル作製研究の問題点を解決するための有効な手段となるのではないかと考えた。

ヒト iPS 細胞を用いて病態モデル作製研究を行うためには、標的とする疾患が発症する時期の罹患細胞種をヒト iPS 細胞から分化誘導することが重要である。ADPKD のほとんどは *PKD1* もしくは *PKD2* 遺伝子のナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライシング異常などによって引き起こされ、加齢とともに腎機能の低下を認めることが多い。しかし、そのような ADPKD 患者においても、胎児期にはすでに腎嚢胞形成が起きていることが示唆されている (Grantham JJ., 2010)。*PKD1* および *PKD2* 遺伝子は、それぞれ Polycystin-1 (PC1)、Polycystin-2 (PC2) タンパク質をコードしており、腎発生過程において、PC1 および PC2 はネフロン前駆細胞である C 字体や S 字体、および尿管芽でわずかに発現が認められ、成熟した近位尿細管、遠位尿細管、髄質集合管などで強く発現していることが知られている (Lechner MS., 1997; Chapin HC., 2010)。そして、ADPKD における腎嚢胞は、尿細管および集合管由来し、集合管からより多くの嚢胞が形成されると考えられている (Osathanondh V., 1964; Heggö O., 1966; Baert L., 1978)。これらのことから、ADPKD の原因遺伝子が発現する発生期の腎集合管組織をヒト iPS 細胞から作製することが、適切な病態モデル作製につながるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

前述の背景に基づいて本研究では、ヒト iPS 細胞から機能的な腎集合管組織の作製方法を確認すること、遺伝子改変ヒト iPS 細胞を樹立し、新規腎嚢胞モデルを開発することを目的とした。

最近、ヒト iPS 細胞から ADPKD の罹患細胞種である集合管細胞を一部に含む腎組織の作製が報告されたが (Takasato M., 2015)、未だ機能的に構築された集合管組織の作製には至っていない。これまでに申請者は、研究代表者として本事業の若手研究 (B) において、ヒト iPS 細胞から腎集合管を派生する胎生組織である前方中間中胚葉を作製する方法を開発している (投稿準備中、特許出願準備中)。そこで、本課題ではその成果を発展させ、発生生物学の知見を基に、中腎管 (ウォルフ管)、尿管芽を経て、集合管組織を作製する方法を開発することを目指した。ADPKD は *PKD1* もしくは *PKD2* 遺伝子の片アレルにおける遺伝的な変異に加え、もう一方のアレルに体細胞変異が起こることで嚢胞が形成される発症機序が考えられている (Qian F., 1996; Pei Y., 2001; Harris PC., 2010)。近年、クリスパー (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat; CRISPR)/Cas9 システムを用いて特定の遺伝子を改変する遺伝子ターゲティング技術が発達しており、単一遺伝子疾患の患者由来 iPS 細胞から遺伝子修復によりアイソジェニックな iPS 細胞を樹立することも可能となっている。そこで、*PKD1* ノックアウトヒト iPS 細胞を樹立し、腎集合管組織の作製を行い、腎嚢胞形成を引き起こすと考えられている細胞内 cyclic AMP (cAMP) 濃度上昇をバソプレシンにより促すことで病態モデルを作製できるか検証することができるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

(1) 前方中間中胚葉から中腎管への分化誘導法の確立

転写因子 *Osr1* は中間中胚葉で普遍的に発現しているが、中腎管に分化することでその発現が消えることが知られている (James RG., 2006)。また、表皮外胚葉からの Bmp シグナルが前方中間中胚葉から中腎管への分化に影響していることが示されており (Obara-Ishihara T., 1999)、中腎管は FGF8 発現の強い胚後方に向かって伸長すると考えられている (Atsuta Y., 2015)。さらに、前方中間中胚葉は Activin A や FGF9 処理によって、OSR1 陽性の前腎や中腎の前駆細胞

にも分化すると考えられているため (Takasato M., 2014; Lam A.Q., 2014) それらの前駆細胞への分化を抑制することが不可欠である。そこで、申請者がすでに樹立している OSR1-GFP レポーターヒト iPS 細胞株 (Mae S., 2013) とフローサイトメトリーを用いて、OSR1 陽性前方中間中胚葉から OSR1 陰性細胞を分化誘導可能な増殖因子の濃度、処理期間を検証する。そして、PCR や免疫染色によって分化誘導した OSR1 陰性細胞が中腎管と同様のプロファイルを呈しているか否かを検証する。

(2) 中腎管細胞から尿管芽オルガノイドの作製

自己組織化を促すことで組織構築を行う浮遊培養法が確立されており、組織構築には連続上皮構造の形成が重要な過程であることが報告されている (Eiraku M., 2011)。腎集合管の発生過程で最も早期に形成される連続上皮構造は中腎管であることから (Costantini F., 2010)、中腎管組織を作製することが集合管組織形成のために必要ではないかと考えられる。また、上皮性の管腔構造形成は、Wnt3a と EGF による Rac の活性化と Rho の抑制によって YAP/TAZ が核内に移行することで引き起こされることが示されている (Matsumoto S., 2014)。これらの知見から、既報の浮遊培養法を応用し、WNT3A などの上皮化因子を用いることで、中腎管様の単層連続上皮構造を作製することを試みる。

さらに、マウスやラットなどのモデル動物から単離した中腎管は、生体外におい GDNF および FGF などの増殖因子で処理することによって、尿管芽の発芽を認めることがすでに知られており、その尿管芽を分枝させる 3 次元培養法も確立されている (Rosines E., 2007)。そこで、これらの培養法を応用することにより、ヒト iPS 細胞由来中腎管組織から分枝する尿管芽を作製する方法を開発する。

(3) 尿管芽細胞から集合管細胞への分化誘導法の開発

集合管は、分枝した尿管芽の幹 (trunk) が成熟することによって形成されるため、尿管芽 trunk 細胞を分化誘導することが必要である。分枝する尿管芽は、先端 (tip) が組織幹細胞の役割を担い、新たな tip 細胞と trunk 細胞を供給する。また、Wnt/ β -カテニンシグナルによって tip 細胞の幹細胞らしさが維持されていることが知られている。そこで、Wnt/ β -カテニンシグナルを阻害することによって、発芽した尿管芽組織から効率良く尿管芽 trunk 細胞を経て、AQP (aquaporin) 2 陽性集合管主細胞を分化誘導することができるか検証する。

(4) PKD1 ノックアウト iPS 細胞株の樹立

ADPKD の腎嚢胞は、遺伝的な変異に加え、体細胞変異が起こることで形成される 2 ヒット理論が考えられているが、その正否は未だ議論の余地がある。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて、PKD1 遺伝子の片アレルもしくは両アレルに変異を導入し、PKD1 ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞と PKD1 ノックアウトヒト iPS 細胞を樹立する。

(5) PKD1 ノックアウト iPS 細胞から腎集合管細胞の作製と腎嚢胞形成の再現

ヒト多能性幹細胞から腎系譜細胞を分化誘導する場合、細胞株によって内在性の BMP 発現や WNT3A の感受性が異なるため、細胞株毎に最適な増殖因子の濃度を検討する必要があることが示されている (Morizane R., 2015)。そこで、樹立する PKD1 ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞と PKD1 ノックアウトヒト iPS 細胞、およびアイソジェニックなヒト iPS 細胞から腎集合管細胞への分化誘導可能な増殖因子の条件を検討する。そして、作製した集合管細胞を用いて、嚢胞を作製することが可能か否かを検証する。

4. 研究成果

(1) 前方中間中胚葉から中腎管への分化誘導法の確立

ヒト iPS 細胞は、Activin A と Wnt シグナルのアゴニストである CHIR99021 で処理することによって、前方原始線条細胞へ分化誘導することができる。さらに、FGF8 とレチノイン酸のアゴニストである TTNPB を用いることにより、前方原始線条は OSR1, GATA3, PAX2, LHX1, HOXB4 を発現する前方中間中胚葉に分化誘導される。

胚発生において、中腎管細胞は中間中胚葉よりも背側に形成されることが知られている。背側の表皮外胚葉で Wnt、腹側の内胚葉で BMP4 が発現していることに着目し、それらの増殖因子シグナルの濃度勾配によって、背側化を誘導することができるのではないかと考えた。中間中胚葉で普遍的に発現し、中腎管では発現が抑制される OSR1 を指標とし、Wnt および BMP シグナルの活性化と阻害の組み合わせを検討したところ、CHIR99021 と BMP シグナル阻害剤である LDN193189 を用いることで、OSR1 発現が抑制されることが分かった。また、OSR1 発現が抑制された細胞は中腎管マーカーである GATA3 や PAX2 を発現していることも確認できた。これらのことから、Wnt および BMP シグナルの濃度勾配モデルは、前方中間中胚葉の背側化による中腎管細胞の誘導に有効であることが考えられる。

また、中腎管は FGF8 が強く発現している胚後方に向かって伸長することが知られているため、CHIR99021 および LDN193189 と FGF8 を組み合わせたと、Ki67 陽性で活発に増殖する中腎管細胞を前方中間中胚葉から作製することができることが分かった。さらに、GDNF を加えることも中腎管細胞の分化を促すために有効であることも明らかとなった。このようにして確立した

分化誘導法では、ヒト iPS 細胞から約 7 割の効率で中腎管細胞を分化誘導することが可能であった。

(2) 中腎管細胞から尿管芽オルガノイドの作製

(1) で作製することが可能となった細胞は、上皮マーカーである E-CADHERIN をほとんど発現していないことから、伸長する中腎管先端の性質を有しているのではないかと考えた。上皮細胞から成る中腎管から尿管芽が発芽するため、中腎管細胞の上皮化を促すことが必要である。細胞塊形成が自己組織化のために重要なステップであること (Eiraku M., 2011) に着目し、細胞低接着プレートを用いて、中腎管細胞塊の作製を試みた。驚くべきことに、中腎管細胞同士が凝集して上皮化し、分化誘導できていない不要な細胞が凝集した中腎管細胞を覆っていたことから、細胞塊作製は中腎管細胞の凝集と上皮化に有効であることが分かった。さらに、中腎管上皮細胞塊の周囲を覆う不要な細胞はピペティングをすることにより、簡便に取り除くことができた。

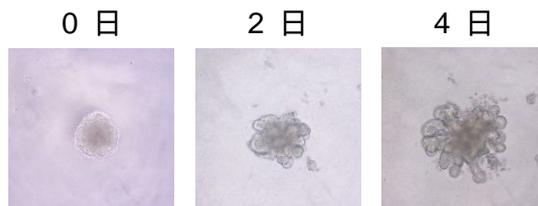


図 1. 中腎管細胞から尿管芽オルガノイドの作製

GDNF や FGF は、マウスなどの実験動物から単離した中腎管から *in vitro* において尿管芽を誘導する因子として知られている。そこで、分化誘導できていない不要な細胞を除去した中腎管上皮細胞塊をマトリゲルで封入し、GDNF および FGF1 を含む培地で培養したところ、尿管芽様の発芽構造が形成されることが分かった。そのような発芽構造は、tip が RET 抗体で染色され、trunk は CK8 および 19 陽性であった。しかし、作製した尿管芽は、その特徴である分枝がほとんど認められなかった。

分枝形態形成は、胚発生において、腎臓だけでなく様々な器官形成に必要なプロセスである。普遍的に、間葉細胞と上皮細胞の相互作用が分枝形態形成を促すことが知られているが、各器官は少しずつ異なる細胞機構を有しており、それぞれが特徴的な分枝パターンを有する (Davies JA., 2002)。尿管芽では常に内腔が存在しながら分枝が生じるが (Meyer TN., 2004)、作製した尿管芽構造には内腔は認められない。そこで、内腔を有する尿管芽オルガノイドを作製することが、分枝形態形成に繋がるのではないかとこの着想に至った。近年、細胞外基質の硬さと組織形成は密接に関連していると考えられている。そこで、中腎管上皮細胞塊を封入するマトリゲルの濃度を検討したところ、低濃度において単層連続上皮から成り、管腔を有する尿管芽オルガノイドを作製可能であることが分かった (図 1)。作製できた尿管芽オルガノイドは、これまで認められなかった幾度も繰り返される分枝を行った。この結果は、内腔を有する尿管芽オルガノイドの作製が分枝形態形成に繋がることを示唆している。

(3) 尿管芽細胞から集合管細胞への分化誘導法の開発

尿管芽の分枝構造における trunk が集合管に分化し、tip では非対称分裂により自己複製もしくは trunk に分化する 2 種類の細胞系譜が産生される。また、tip の自己複製には Wnt/ β -カテニンシグナルが重要であることが知られている。そこで、Wnt/ β -カテニンシグナルを阻害することによって、tip から trunk への分化を促すことができるのではないかと考えた。(2) で作製した尿管芽オルガノイドを酵素処理によって単一の細胞にまで解離し、Wnt シグナル阻害剤である IWR-1 を含む培地で平面培養を試みたところ、免疫染色によって trunk マーカーである AQP2 発現を確認することができた。さらに、TGF β シグナル阻害剤である A83-01 を組み合わせることによってアポトーシスが抑制されることが分かった。しかし、バソプレシン受容体などの発現が認められなかったことから、成熟集合管の作製には至っていないと考えられる。

(4) PKD1 ノックアウト iPS 細胞株の樹立

ADPKD では、PKD1 遺伝子における遺伝的な変異に加え、体細胞変異が起こることで腎嚢胞が形成される 2 ヒット理論が考えられている。そこで、ドキシサイクリンとデキサメタゾンで処理することにより、CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子編集を可能にするシステム (Ishida K., 2018) を用いて、体細胞変異を任意に導入可能な iPS 細胞株を樹立することを試みた。まず、piggyBac ベクターを用いて、上記のシステムを細胞に導入し、作製した iPS 細胞から腎集合管細胞を分化誘導可能であることを確認した。次に、ドキシサイクリンとデキサメタゾンで処理することによって、PKD1 ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞と PKD1 ノックアウトヒト iPS 細胞を樹立することに成功した。樹立した iPS 細胞は、塩基が欠損したことにより PKD1 遺伝子内に未成熟終

止コドンが形成される変異を有していることが分かった。

(5) PKD1 ノックアウト iPS 細胞から腎集合管細胞の作製と腎嚢胞形成の再現

樹立した *PKD1* ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞と *PKD1* ノックアウトヒト iPS 細胞は、どちらも尿管芽オルガノイドへ分化誘導することが可能であった(図 2)。さらに、尿管芽細胞から AQP2 陽性集合管細胞を分化誘導することにも成功した。さらに、尿管芽オルガノイドを IWR-1 と A83-01 で処理することにより、AQP2 陽性集合管細胞を含むオルガノイドを作製した。しかし、嚢胞形成などの ADPKD の病態を再現するまでには至らなかった。

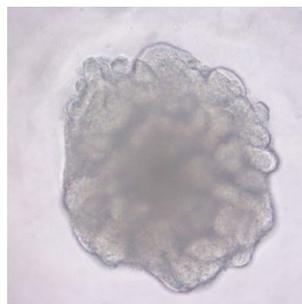


図 2. PKD1 ノックアウト iPS 細胞由来尿管芽オルガノイド

本研究課題の期間に、ヒト iPS 細胞から分枝形態形成を行う尿管芽オルガノイドを作製することが可能となり、AQP2 陽性集合管細胞へ分化させる方法も開発できたことは大きな進歩である。しかし、腎発生早期の未熟な細胞であることから、成熟集合管を分化誘導する方法の確立が急務である。そして、今後は *PKD1* ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞と *PKD1* ノックアウトヒト iPS 細胞を用いて、ADPKD に対する病態モデル作製の可能性を模索することが必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Mae SI, Ryosaka M, Osafune K.

Protocol to generate ureteric bud structures from human iPS cells.

Methods in molecular biology, 査読有, 1926, 2019, 117-123

DOI: 10.1007/978-1-4939-9021-4_10

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

〔学会発表〕(計 1 件)

前 伸一

ヒト iPS 細胞を用いた新規腎嚢胞病態モデルの開発

第 26 回嚢胞性腎疾患研究会、2018 年 10 月 19 日、リファレンス西新宿(東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称:尿管芽組織誘導方法

発明者:長船健二/前伸一/兩坂誠

権利者:国立大学法人京都大学

種類:PCT

番号:PCT/JP2018/042567

出願年:2017 年

国内外の別: 国外

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。