

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07043

研究課題名(和文)慢性腎臓病における腎臓老化の病態解析とネフロン前駆細胞を用いた細胞療法の開発

研究課題名(英文) Pathological analysis of kidney aging and development of cell therapy using nephron progenitor cells in CKD

研究代表者

荒岡 利和 (Araoka, Toshikazu)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：40437661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ヒトiPS細胞由来ネフロン前駆細胞(hiPSC-NPCs)の高効率な拡大培養法を開発することで、腎疾患に対するhiPSC-NPCsを用いた細胞療法を実現することである。研究代表者は、hiPSC-NPCsを100倍以上に拡大培養する方法を開発し、さらに、hiPSC-NPCsの拡大培養効率を約20～30%上昇させる低分子化合物を複数同定した。また、NPCに特異的な細胞表面抗原マーカーを同定した。研究代表者は、拡大培養したhiPSC-NPCsの細胞移植によって、急性腎障害モデルマウスの腎障害を治療し、さらに、慢性腎障害モデルマウスの腎障害を改善し、腎臓線維化、腎臓老化を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎障害に対して有効な薬剤の開発は十分ではなく、慢性腎臓病患者および透析患者数は増加の一途をたどっているため、新たな治療法の実現が急務である。一方、腎疾患に対するヒトiPS細胞由来ネフロン前駆細胞(hiPSC-NPCs)の細胞療法の臨床応用に向けて、高効率かつ安価なhiPSC-NPCsの拡大培養方法の開発が課題であった。本研究において、hiPSC-NPCsの拡大培養法を開発し、急性腎障害の腎機能の改善および慢性腎臓病における腎機能の改善、腎臓の線維化および老化の進行を抑制することに成功した。これらの成果は、hiPSC-NPCsを用いた新規治療法の臨床応用の実現に向けて大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose is to realize cell therapies using human iPS cell-derived nephron progenitor cells (hiPSC-NPCs) for kidney diseases by developing efficient expansion culture methods for hiPSC-NPCs. We have developed expansion culture methods for hiPSC-NPCs more than 100-times and identified multiple low weight molecular compounds that increase hiPSC-NPCs by about 20-30%. Furthermore, we have identified the specific surface marker for nephron progenitor cells (NPCs) and succeeded in purifying the NPC fractions from multiple human iPS cell lines. We have improved renal function in a mouse model of acute kidney injury using expanded hiPSC-NPCs. In addition, we have improved renal function and suppressed the progression of renal fibrosis and aging in a mouse model of chronic kidney disease.

研究分野：腎臓再生学

キーワード：ネフロン前駆細胞 拡大培養 慢性腎臓病 急性腎障害 低分子化合物 腎臓老化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、慢性腎臓病 (CKD; chronic kidney disease) の原因の一つとして、腎臓の老化が注目されており (Raymond NT., 2007; Coresh J., 2007)、腎臓老化の抑制が次世代の CKD の治療ターゲットとして認識されつつある。一方、iPS 細胞からネフロン前駆細胞 (NPCs; nephron progenitor cells) を作製する試みが精力的になされており (Taguchi A., 2014; Takasato M., 2015; Morizane R., 2015; Toyohara T., 2015)。申請者らを含めた 3 グループが、ヒト中絶胎児腎由来 NPCs 及びヒト iPS 細胞由来 NPCs (hiPSC-NPCs; human iPS cell-derived NPCs) の移植治療がマウスの急性腎障害 (AKI; acute kidney injury) を改善することを報告している (Toyohara T., 2015; Imberti B., 2015; Araoka T., Cell Stem Cell, 2016)。しかし、CKD に対する報告は未だない。現在のところ、CKD に対する細胞移植療法の先行研究として、間葉系幹細胞 (MSCs; mesenchymal stem cells) を用いた報告 (Peired AJ., 2016) があるが、MSCs が腎臓組織以外へ分化した報告 (Kunter U., 2007) や、MSCs に発現する Gli1 の間質線維化への関与の報告 (Kramann R., 2015) さらには、MSCs が子宮頸がんの悪性化 (Chen YC., 2019) や、乳癌の転移を促進する可能性 (Rosario CO., 2020) が報告されており、腎臓組織に特異的に分化し、線維化や癌化の報告のない hiPSC-NPCs を用いた腎疾患に対する細胞療法の確立に期待が寄せられている。しかしながら、hiPSC-NPCs を用いる際の問題点として、NPCs の分化誘導に必要な試薬類のコストが高いことや、ヒト ES 細胞株を用いた分化誘導研究においてすでに報告されているように (Osafune K., 2008)、iPS 細胞株の違いによる NPCs への誘導効率の差も報告されている。そのため、低い誘導効率で得られた hiPSC-NPCs を拡大培養によって大量に安定的に供給しようとする試みがなされている (Brown AC., 2015; Tanigawa S., 2015; Araoka T., Cell Stem Cell, 2016) が、未だ確立されていない。したがって、hiPSC-NPCs の純化方法および拡大培養方法を確立し、低コストで同じ品質の細胞を大量に供給するシステムを構築し、CKD および腎臓老化に対する新たな細胞移植療法の基盤を確立することが必要である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、hiPSC-NPCs の CKD および腎臓老化に対する治療効果を明らかにし、さらに、hiPSC-NPCs の拡大培養を可能にする培養条件を確立するとともに、hiPSC-NPC の純化方法および細胞増殖を促進する新たな低分子化合物を同定することである。

### 3. 研究の方法

#### (1)hiPSC-NPCs の拡大維持培養を可能にする培養条件の確立

ヒト中絶胎児腎由来 NPCs を拡大維持培養する培養条件 (hNPSR 培地) (Araoka T., Cell Stem Cell, 2016) はすでに確立しているが、ヒト中絶胎児腎由来 NPCs と違い、hiPSC-NPCs の heterogeneity が高いため、1 継代までしか培養を維持できなかった。そこで、研究代表者らが開発した hiPSC-NPCs の新規分化誘導方法 (Tsujiimoto H., 2020) を用いて、NPC マーカー OSR1 および SIX2 のレポーターヒト iPS 細胞を hiPSC-NPCs に分化誘導後、複数の低分子化合物および成長因子の組み合わせによって培養を行い、OSR1 および SIX2 の発現を指標に、拡大培養を可能にする培養条件をスクリーニングした。次に、拡大培養した hiPSC-NPCs の細胞移植療法による治療効果の確認のために、シスプラチン誘発性 AKI モデルマウスの腎被膜下に細胞移植を行い、腎機能 (血清クレアチニン、尿素窒素) および腎臓組織の病理学的所見 (HE 染色、PAS 染色) の変化を評価した。

#### (2)hiPSC-NPCs の細胞増殖を促進する低分子化合物の同定

従来の誘導法 (Araoka T., 2014, Toyohara T., 2015) を用いて誘導した hiPSC-NPCs の分化誘導効率を増加させる低分子化合物 (シグナル経路不明) の構造解析を行った。次に、構造解析から得られたシグナル経路に対する低分子化合物を、新規誘導法で誘導した hiPSC-NPCs に添加し、hiPSC-NPCs への分化誘導効率の変化を確認した。また、上述の拡大維持培養法に、同定した低分子化合物を添加し、細胞増殖効果について評価した。

#### (3)hiPSC-NPCs に特異的な細胞表面マーカータンパクの同定

新規誘導法で作製した hiPSC-NPCs に特異的な細胞表面マーカーを、RNA シークエンスのデータセット (Tsujiimoto H., 2020) から複数抽出し、それぞれに対して特異的な抗体による hiPSC-NPCs の純化を、フローサイトメトリーを用いて行った。次に、同定した細胞表面マーカーを用いて純化した hiPSC-NPCs の腎臓組織への分化誘導能を評価した。さらに、純化した hiPSC-NPCs の腎疾患に対する治療効果を評価するために、上述の培養条件で拡大培養後に、シスプラチン誘発性 AKI モデルマウスの腎被膜下に細胞移植を行い、腎機能 (血清クレアチニン、尿素窒素) および腎臓組織の病理学的所見 (HE 染色、PAS 染色) の変化を評価した。

#### (4)hiPSC-NPCs の CKD および腎臓老化に対する治療効果の検証

新規誘導法で作製した hiPSC-NPCs をアリストロキア酸誘発性 CKD モデルマウスの腎被膜下に細胞移植し、腎機能 (血清クレアチニン、尿素窒素) および腎臓組織の線維化 (Masson-Trichrome 染色、 $\alpha$ -SMA 染色) および老化マーカー遺伝子の発現 (p16, p21, PAI-1, IL-6, Atf3, MMP13 など) の変化を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) hiPSC-NPCs の拡大維持培養を可能にする培養条件の確立

hNPSR 培地では、1 継代しか NPC マーカー SIX2 の発現を維持できなかったが、新たに同定した CFY 培地 (CHIR99021、FGF9、Y-27632) によって、2 継代後も NPC マーカータンパク (OSR1, SIX2) (図 1) および NPC マーカー遺伝子の発現が維持されており (図 2)、腎オルガノイドへの分化能も保持されることが明らかとなった。また、継代毎に約 10 倍の細胞増殖効果が得られ (図 3)、拡大培養した hiPSC-NPCs をシスプラチン誘発性 AKI モデルマウスの腎被膜下に細胞移植することで、腎機能および腎臓組織の病理学的変化が有意に改善することが明らかとなった (図 4)。本研究によって、拡大培養により安価に大量に作製した hiPSC-NPCs は、継代前の hiPSC-NPCs の有する治療効果および腎オルガノイドへの分化能を保持できることが明らかとなった。これらの成果は、hiPSC-NPCs を用いた腎疾患に対する細胞療法の臨床応用の実現に向けて大きく貢献するものである。また、大量の腎オルガノイドの作製が可能となることから、培養皿上で、ヒトの腎臓組織を用いた、治療薬スクリーニングおよび薬物毒性試験が可能となるため、新規治療薬の開発を促進する効果も期待できる。

##### (2) hiPSC-NPCs の細胞増殖を促進する低分子化合物の同定

hiPSC-NPCs の細胞増殖率を約 20~30% 増加させる低分子化合物 (TBK1 阻害剤、JAK2 阻害剤、STAT6 阻害剤) を同定した (図 5)。しかしながら、同定した低分子化合物に、hiPSC-NPCs の分化誘導効率の上昇効果を認めなかった。低分子化合物が、成長因子に比べて安価で活性が安定していることから、これらの成果は、拡大培養法した hiPSC-NPCs の供給をより容易にする画期的な発見であると考えられる。

##### (3) hiPSC-NPCs に特異的な細胞表面マーカータンパクの同定

hiPSC-NPCs に特異的な細胞表面マーカータンパクとして、c-MET (HGFR) を同定した。次に、フローサイトメトリーを用いて、c-MET に対する特異的な抗体によって、hiPSC-NPCs を純化する方法を確立した (図 6)。また、c-MET で純化した hiPSC-NPCs を拡大培養後に、シスプラチン誘発性 AKI モデルマウスの腎被膜下に細胞移植したところ、腎機能および腎臓組織の病理学的変化が改善することが明らかとなった (図 7)。hiPSC-NPCs の分化誘導効率は、ヒト iPS 細胞の株間で大きく異なることが知られている。本成果で得られた、hiPSC-NPCs の純化方法を用いることで、ヒト iPS 細胞の株間の hiPSC-NPCs への分化誘導効率の違いによる治療効果の差をなくし、治療効果が安定した hiPSC-NPCs の供給が可能になる。

##### (4) hiPSC-NPCs の CKD および腎臓老化に対する治療効果の検証

hiPSC-NPCs の細胞移植によって、アリストロキア酸誘発性 CKD モデルマウスの腎機能の悪化および腎臓組織の線維化が抑制された (図 8)。また、老化マーカー遺伝子の発現も hiPSC-NPCs の細胞移植によって有意に抑制された (図 9)。hiPSC-NPCs による CKD に対する治療効果および腎臓老化の抑制効果は世界初の成果である。また、腎臓に分化することを運命づけられた hiPSC-NPCs を安価に大量に作製する技術は、MSCs を腎疾患に対して使用する際の問題点を克服するものであり、これらの成果によって、全く新しい腎疾患に対する治療法の開発が加速すると考えられる。

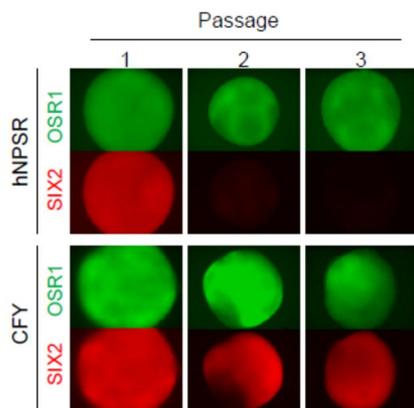


図1, NPCマーカー-SIX2およびOSR1の継代後の発現変化

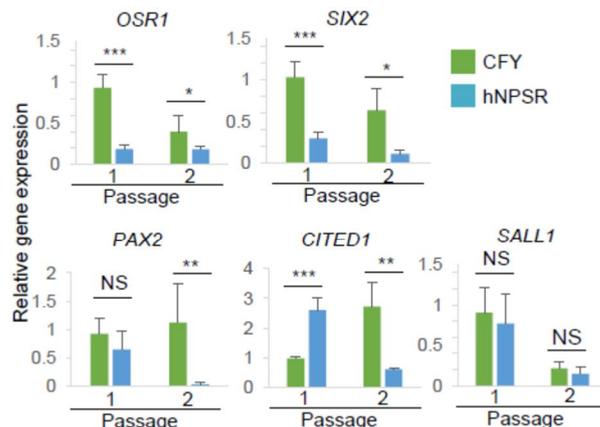


図2, NPCマーカー遺伝子の継代後の発現変化

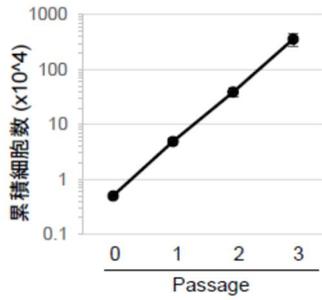


図3, CFY培地による拡大培養後の累積細胞数

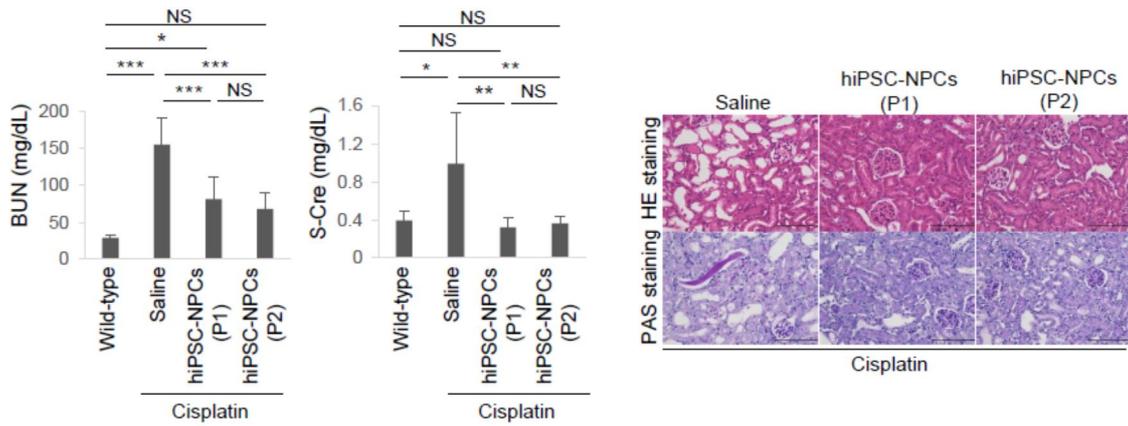
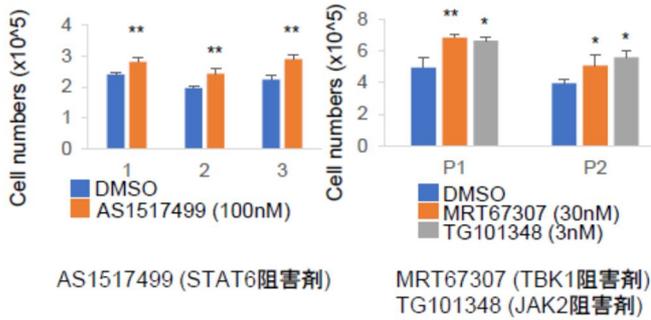


図4, 拡大培養したhiPSC-NPCsのシスプラチン誘発性AKIモデルマウスに対する治療効果



AS1517499 (STAT6阻害剤)

MRT67307 (TBK1阻害剤)

TG101348 (JAK2阻害剤)

図5, 低分子化合物によるhiPSC-NPCsの細胞増殖効果

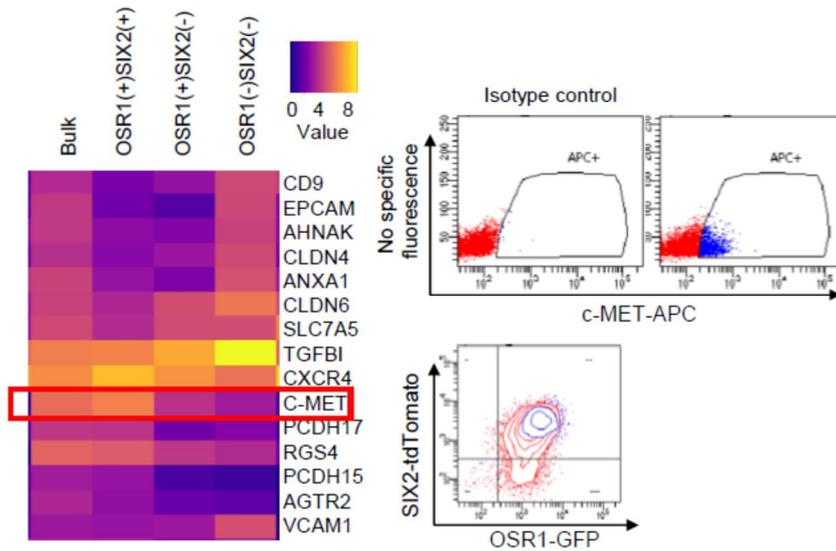


図6, hiPSC-NPCsに特異的な表面マーカー(cMET)の同定

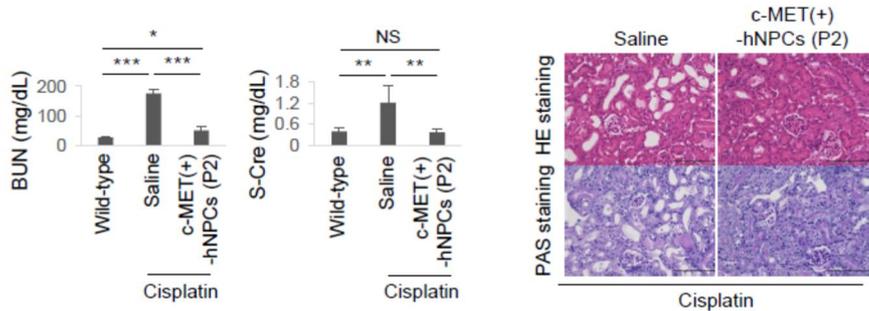


図7, c-METで純化後に拡大培養したhiPSC-NPCsのシスプラチン誘発性AKIモデルマウスに対する治療効果

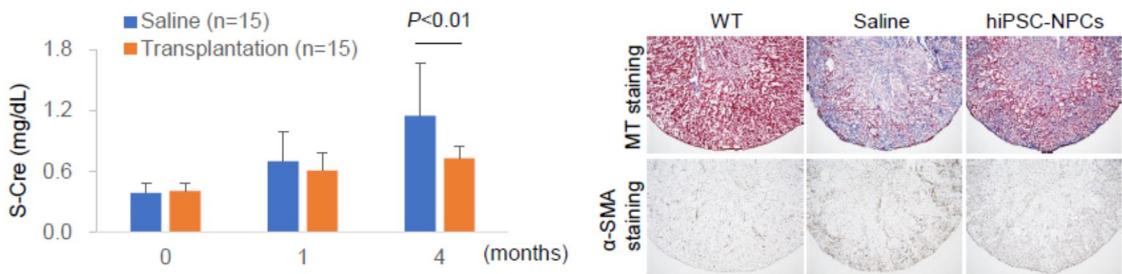


図8, hiPSC-NPCsのアリストロキア酸誘発性CKDモデルマウスに対する治療効果

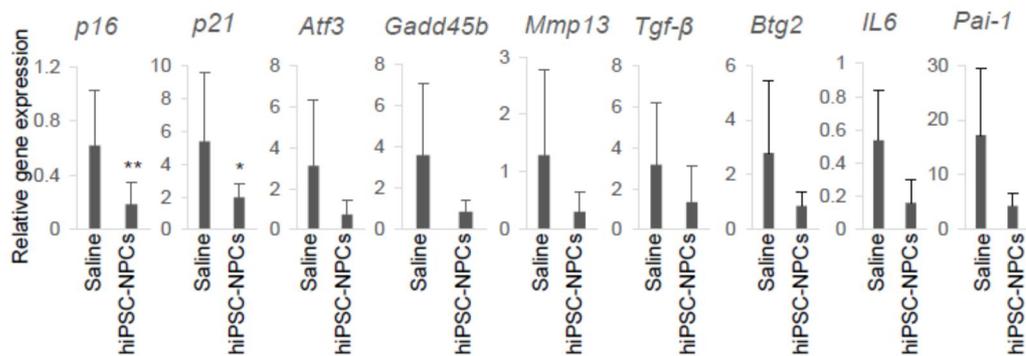


図9, hiPSC-NPCsによる腎臓老化の抑制効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsujiimoto Hiraku, Araoka Toshikazu, Nishi Yohei, Ohta Akira, Nakahata Tatsutoshi, Osafune Kenji	4. 巻 -
2. 論文標題 Small molecule TCS21311 can replace BMP7 and facilitate cell proliferation in in?vitro expansion culture of nephron progenitor cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 荒岡 利和, 長船 健二	4. 巻 26
2. 論文標題 ネフロン前駆細胞を用いた腎疾患に対する再生医療の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organ Biology	6. 最初と最後の頁 73, 84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomohiro Utagawa, Keiko Tanaka, Toshikazu Araoka, Kenji Osafune, Taiji Matsusaka
2. 発表標題 Kidney organoid model of selective podocyte injury
3. 学会等名 American Society of Nephrology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsujiimoto Hiraku, Toshikazu Araoka, Shin-ichi Mae, Makoto Ryosaka, Kenji Osafune
2. 発表標題 Generation of functional human kidney tissues from metanephric nephron progenitors and ureteric bud cells separately differentiated from human iPS Cells
3. 学会等名 American Society of Nephrology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒岡 利和
2. 発表標題 ネフロン前駆細胞の拡大培養法の開発と腎疾患への応用
3. 学会等名 第64回日本透析医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒岡 利和
2. 発表標題 iPS細胞を用いた腎疾患に対する再生医療の開発
3. 学会等名 第2回愛媛県腎疾患研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒岡 利和
2. 発表標題 ネフロン前駆細胞を用いた腎疾患に対する再生医療の開発に向けて
3. 学会等名 第18回京大病院・再生医学研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒岡 利和
2. 発表標題 ネフロン前駆細胞の拡大培養法の開発と腎疾患への応用
3. 学会等名 第63回日本透析医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 MEDIUM FOR EXPANSION CULTURE OF NEPHRON PROGENITOR CELL AND METHOD FOR EXPANSION CULTURE OF NEPHRON PROGENITOR CELL	発明者 辻本啓, 荒岡利和, 長船健二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、62/950,120	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 新規腎前駆細胞マーカーおよびそれを利用した腎前駆細胞の濃縮方法	発明者 荒岡利和、長船健 二、渡辺亮	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-138040	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------