

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23933

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症の治療を目指したヒト多能性幹細胞から糸球体内皮細胞への誘導法の開発

研究課題名(英文) Developing the differentiation methods from pluripotent stem cells to glomerular endothelial cells for diabetic research

研究代表者

豊原 敬文 (Toyohara, Takafumi)

東北大学・医工学研究科・特任助教

研究者番号：60594182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病で生じる腎症において機能不全に陥る細胞の一つとして糸球体内皮細胞が知られているが、糸球体内皮細胞に機能不全が生じる病態については十分に解明されていない。本研究ではヒト多能性幹細胞から糸球体内皮細胞を作製することを目的としていた。糸球体発現成長因子を従来の内皮細胞誘導方法に対してDay 7以降の比較的内皮細胞に誘導されている段階で追加すると糸球体内皮細胞の発現マーカー候補であるDKK2が上昇することが分かった。複数の因子は相乗効果があることが明らかとなった。さらに誘導した細胞に関しては、Laminin 512というコーティング剤を用いるとDKK2の誘導効率を上昇させる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト多能性幹細胞は様々な組織や細胞にも分化することが可能で、無限に増殖することができる。本研究成果をさらに発展させてヒト腎臓にある糸球体内皮細胞が作製可能となれば、糖尿病性腎症をはじめその他の腎症の病態解明や薬剤スクリーニングが飛躍的に進むことが期待される。また腎疾患に対する細胞移植療法の材料となる可能性も将来的には考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to establish differentiation methods from pluripotent stem cells to glomerular endothelial cells for developing new therapy against diabetic nephropathy. We screened some growth factors existing at glomerulus that increase the expression of DKK2, one of the potential markers for glomerular endothelial cells. Some factors induced DKK2 when they were added at the late time point of the previous differentiation method (Patsch et al. Nat Cell Biol., 2015). Some factors also synergistically induced DKK2. DKK2 expression was more upregulated on the laminin 512-coating plate.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：内皮細胞 iPS細胞 腎臓

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症に対する有効な治療法は未だ開発されていない。糖尿病性腎症発症において最も早期に機能不全に陥る細胞の一つとして糸球体内皮細胞が知られているが糸球体内皮細胞に機能不全が生じる病態については未だ十分に解明されていない。

一方で糖尿病性腎症モデル動物を用いた実験には限界がある。マウスやラットは腎症を起こしにくくまたヒトゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study: GWAS) や発現定量的形質遺伝子座 (Expression quantitative trait loci: eQTL) などのヒト遺伝子解析の結果を用いた実験モデルを構築してもヒトと実験動物の遺伝子の違いからうまくゆかない。

ヒト胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell: ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cell: iPS 細胞) から糸球体内皮細胞を作製できれば、上記問題を解決することが可能であるが、内皮細胞は各臓器でその機能に合わせて形状が異なることが知られていることから糸球体特異的な内皮細胞の分化誘導法を開発する必要があった。

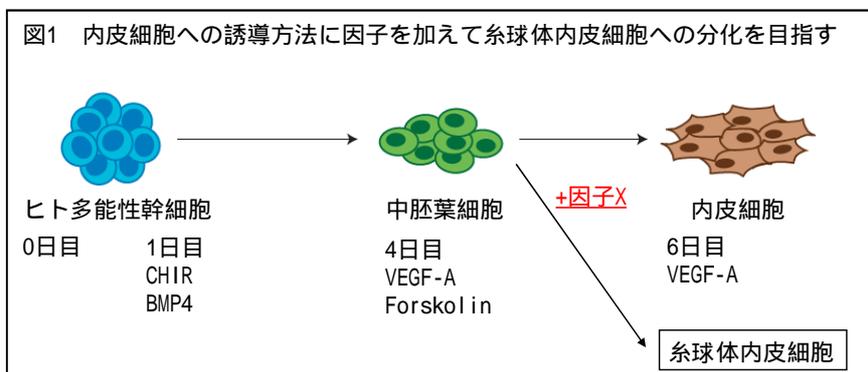
2. 研究の目的

そこで本研究では ES 細胞や iPS 細胞などのヒト多能性幹細胞からヒト糸球体内皮細胞を作製し、糖尿病性腎症における糸球体内皮障害の解明と治療開発を促進することを目的とした。

3. 研究の方法

ES 細胞や iPS 細胞から糸球体内皮細胞を分化誘導する方法を確立するために、下記の二つのアプローチで研究を行った。

(1) 内皮細胞は生体内で均一ではなく各臓器において特徴的な機能や形態を有するが、現在までにヒト多能性幹細胞から“糸球体”内皮細胞を誘導することには誰も成功していない。しかし Harvard 大学の Cowan lab ではヒト多能性幹細胞から高効率に内皮細胞を分化

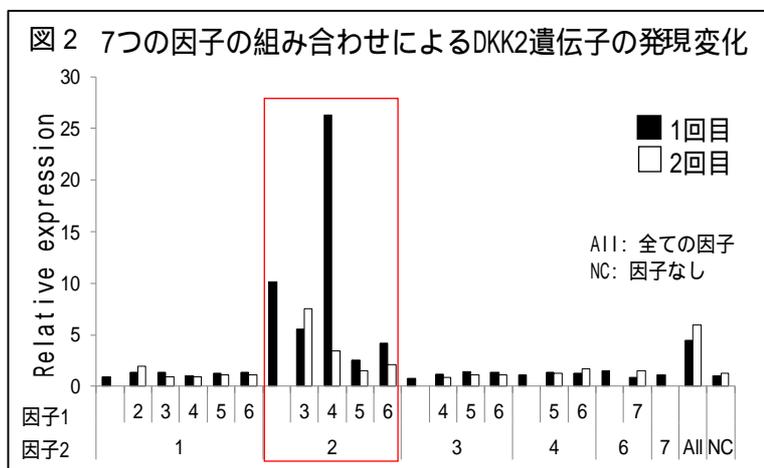


誘導することに成功していた (Patsch et al. Nat Cell Biol., 2015、図 1)。この方法にさらに因子 X を探索し、加えることで糸球体内皮細胞の作製を目指した。因子 X はデータベースから糸球体に存在し、かつパラクライン作用を有することが予想される成長因子を抽出して、網羅的に探索を行うこととした。

(2) マウスの糸球体内皮細胞のマーカー群を示した既報 (Nolan D.J. Dev Cell, 2013) を元に申請者がさらなる検討を行った結果、これまでに糸球体内皮細胞のマーカーとして DKK2 (Dickkopf-related protein 2; Wnt/ catenin シグナルの調節に関与する蛋白質) が有効である可能性に着目していた。そこで、DKK2-GFP レポーター-ES 細胞株を作製し、DKK2 が誘導された時に GFP 発現が強くなる細胞を樹立した。レポーター細胞株を用いて、因子 X の DKK2 発現増強作用をの検討や DKK2 陽性細胞の単離を行うこととした。

4. 研究成果

Harvard Stem Cell Institute の Cowan lab とも情報交換を行い、中胚葉細胞から内皮細胞に分化誘導する途中のどのタイミング (分化誘導日数) でどれくらいの濃度の糸球体発現成長因子を追加すればよいかの条件設定を検討した。Day 5 などの早いタイミングでは遺伝子レベルで見ても DKK2 の発現はあまり上昇せず、因子追加のタイミングは Day 5 などの早いタイミングでは遺伝子レベルで見ても DKK2 の発現はあまり上昇せず、因子追加のタイミングは内皮細



胞への分化系の中で Day 7 以降、2 回目の継代前など比較的遅いタイミングがやはり良いと考えられた。濃度は少なくとも予想される範囲で 4 通り以上の濃度を検討した。また複数の因子を合わせることで DKK2 発現効率の上昇が認められるかどうかの検討も行った。その結果、候補因子のうち二つの候補因子は相乗効果があることが明らかとなった(図 2)。さらに誘導した細胞に関しては、コーティング剤の検討も行い、Laminin 512 を使用した培養が DKK2 の誘導効率を上昇させる可能性が考えられた。誘導した細胞の評価は形態的な評価をまず行ったが、肉眼的には明らかな違いは認められず、さらなる電顕での評価やストレス負荷での細胞の性質を検討する実験については、実験準備は行ったものの、コロナウイルスの感染拡大による研究活動制限の影響もあり十分な違いを見出すまでは実験を進めることができなかった。今回の知見を元にさらに糸球体内皮細胞の誘導方法確立を目指して研究を発展させる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Sato Miku, Harada-Shoji Narumi, Toyohara Takafumi, Soga Tomoyoshi, Itoh Masatoshi, Miyashita Minoru, Tada Hiroshi, Amari Masakazu, Anzai Naohiko, Furumoto Shozo, Abe Takaaki, Suzuki Takashi, Ishida Takanori, Sasano Hironobu	4. 巻 11
2. 論文標題 L-type amino acid transporter 1 is associated with chemoresistance in breast cancer via the promotion of amino acid metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80668-5	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 Oikawa Yoshitsugu, Izumi Rumiko, Koide Masashi, Hagiwara Yoshihiro, Kanzaki Makoto, Suzuki Naoki, Kikuchi Koichi, Matsunashi Tetsuro, Akiyama Yukako, Ichijo Mariko, Watanabe Shun, Toyohara Takafumi et al	4. 巻 15
2. 論文標題 Mitochondrial dysfunction underlying sporadic inclusion body myositis is ameliorated by the mitochondrial homing drug MA-5	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0231064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0231064	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 Mishima Eikan, Ichijo Mariko, Kawabe Takeshi, Kikuchi Koichi, Akiyama Yukako, Toyohara Takafumi, Suzuki Takehiro, Suzuki Chitose, Asao Atsuko, Ishii Naoto, Fukuda Shinji, Abe Takaaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Germ-Free Conditions Modulate Host Purine Metabolism, Exacerbating Adenine-Induced Kidney Damage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 547 ~ 547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins12090547	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 Sasaki Yuri, Mishima Eikan, Kikuchi Koichi, Toyohara Takafumi, Suzuki Takehiro, Ota Hideki, Seiji Kazumasa, Miyazaki Mariko, Harigae Hideo, Ito Sadayoshi, Takase Kei, Abe Takaaki	4. 巻 60
2. 論文標題 Treatment of Refractory Hypertension with Timely Angioplasty in Total Renal Artery Occlusion with Atrophic Kidney	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 287 ~ 292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.5290-20	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 Mishima Eikan, Funayama Yukino, Suzuki Takehiro, Mishima Fumiko, Nitta Fumihiko, Toyohara Takafumi, Kikuchi Koichi, Kunikata Hiroshi, Hashimoto Junichiro, Miyazaki Mariko, Harigae Hideo, Nakazawa Toru, Ito Sadayoshi, Abe Takaaki	4. 巻 44
2. 論文標題 Concurrent analogous organ damage in the brain, eyes, and kidneys in malignant hypertension: reversible encephalopathy, serous retinal detachment, and proteinuria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 88 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-020-0521-2	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 Toyohara Takafumi, Roudnicky Filip, Florido Mary H.C., Nakano Toshiaki, Yu Haojie, Katsuki Shunsuke, Lee Minjin, Meissner Torsten, Friesen Max, Davidow Lance S., Ptaszek Leon, Abe Takaaki, Rubin Lee L., Pereira Alexandre C., Aikawa Masanori, Cowan Chad A.	4. 巻 27
2. 論文標題 Patient hiPSCs Identify Vascular Smooth Muscle Arylacetamide Deacetylase as Protective against Atherosclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 147 ~ 157.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2020.04.018	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 該当する

1. 著者名 Iwasaki Tomoyuki, Mishima Eikan, Suzuki Takehiro, Kikuchi Koichi, Toyohara Takafumi, Seiji Kazumasa, Takase Kei, Miyazaki Mariko, Harigae Hideo, Ito Sadayoshi, Abe Takaaki	4. 巻 43
2. 論文標題 Kidney enlargement effect of angioplasty for nonatherosclerotic renovascular disease: reversibility of ischemic kidney	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 1214 ~ 1221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-020-0473-6	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 Yasuda Katsutaro, Kotaka Maki, Toyohara Takafumi, Sueta Shin-Ichi, Katakai Yuko, Ageyama Naohide, Uemoto Shinji, Osafune Kenji	4. 巻 526
2. 論文標題 A nonhuman primate model of liver fibrosis towards cell therapy for liver cirrhosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 661 ~ 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.148	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 Friesen Max, Warren Curtis R., Yu Haojie, Toyohara Takafumi, Ding Qiurong, Florido Mary H.C., Sayre Carolyn, Pope Benjamin D., Goff Loyal A., Rinn John L., Cowan Chad A.	4. 巻 14
2. 論文標題 Mitoregulin Controls -Oxidation in Human and Mouse Adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 590 ~ 602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.03.002	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 該当する

1. 著者名 Mishima Eikan, Mori Takayasu, Nakajima Yoko, Toyohara Takafumi, Kikuchi Koichi, Oikawa Yoshitsugu, Matsushashi Tetsuro, Maeda Yasuhiro, Suzuki Takehiro, Kudo Masataka, Ito Sadayoshi, Sohara Eisei, Uchida Shinichi, Abe Takaaki	4. 巻 9
2. 論文標題 HPRT-related hyperuricemia with a novel p.V35M mutation in HPRT1 presenting familial juvenile gout	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 210 ~ 214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-020-00459-9	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 Mishima Eikan, Ota Hideki, Suzuki Takehiro, Toyohara Takafumi, Seiji Kazumasa, Ito Sadayoshi, Saiki Yoshikatsu, Takase Kei, Abe Takaaki	4. 巻 59
2. 論文標題 Apparent Diffusion Coefficient in the Resolution of Renal Ischemia after Angioplasty on Diffusion-weighted Imaging: Renal Artery Stenosis Caused by Progressive Thrombosis in Residual Chronic Aortic Dissection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1173 ~ 1177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3855-19	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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			
米国	Beth Israel Deaconess Medical Center			