

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590948

研究課題名(和文) ヒト胚性幹細胞を用いた腎臓再生の試み

研究課題名(英文) Renal regeneration by human Embryonic Stem cells

研究代表者

菱川 慶一 (HISHIKAWA KEIICHI)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：50255460

研究成果の概要(和文)：培養ヒトES細胞(KhES-1, 2, 3)において、5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza)はWT-1蛋白を誘導し、腎臓構成細胞への分化誘導剤として、最も有望であることが明らかとなった。5-Aza処理をしたKhES-1, 2, 3をSCIDマウス腎臓皮膜下へ移植し、6-24週間後、sacrificeし、形成された組織の染色を行った結果、コントロールに比較して、5-Aza処理により、尿細管細胞マーカー陽性細胞が有為に増加することが明らかとなった。一方、ポドサイトマーカー、内皮細胞マーカーには有為差はなく、5-Azaには、ヒトES細胞を尿細管細胞系統へ分化誘導促進作用を持つことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) effectively induced WT-1 in human embryonic stem cells, KhES-1, 2 and 3. Next we transplanted 5-Aza treated KhES-1, 2 and 3 into the kidney capsule of SCID mice. After 6-24 weeks, we found generation of kidney tubular cells, but not endothelial cells and podocytes. Our results demonstrated that 5-Aza promotes differentiation of human ES cells to kidney cells, especially tubular cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：臨床系内科学・腎臓内科学

キーワード：(1) ES細胞 (2)再生医療 (3)HDAC阻害薬 (4)脱メチル化剤

1. 研究開始当初の背景

Dekelらは腎移植のドナー不足の解決策を探るべく、異種移植の可能性を検討し、ヒト胎児およびブタ胎児腎臓をマウスへ移植して機能するか検討した。驚くべきことに、移植された胎児腎臓は細かく裁断しても移植されたマウス腎臓皮膜下で腎臓へと分化し、尿を産生した。しかも胎児腎臓組織は成体の腎臓と異なり、免疫寛容状態にあることから、拒絶を受けることがない事を示し、ブタ胎児腎臓が腎移植に代わりうる可能性を示唆し

ている。Hammermannらは、マウスやラットの胎児腎臓(後腎)を成体の大網へ移植し、移植された後腎が移植後、ホストの血管と繋がることにより機能し、尿を産生すると報告している。これらの報告がもしヒトでも再現できるのであれば、胎児腎臓さえ得られれば、全く新しい細胞移植や後腎移植による腎臓再生療法の開発が理論上可能となるが、胎児腎臓を治療に用いることは倫理上不可能であり、仮に倫理上の問題が解決できても、24万人の透析患者に応用するには数量的にも

非現実的である。そこで最も期待されるのがヒト ES 細胞の応用である。ヒト ES 細胞は無限の増殖能力を持ち、あらゆる細胞への分化が可能である。Dekel らの報告に従えば、完全な腎臓まで分化誘導する必要はなく、7 週程度の後腎あるいはその構成細胞でも移植により、移植後成体内で分化が進行すると思われる。研究目標として現実的な目標と成りうる。しかも、申請者らは体性幹細胞や分化した尿細管細胞において、epigenetic 制御薬が細胞の機能制御に非常に有効でありことを見いだしており、ヒト ES 細胞へ応用する基礎データも備わっている。

2. 研究の目的

3 年間の研究期間内に、ヒト ES 細胞から 7 週程度の胎児腎臓あるいは腎臓前駆細胞への分化誘導条件を設定し、その分化誘導条件が *in vivo* で機能するか検証することが本研究の主目的である。さらに、分化誘導された細胞を腎不全マウスに移植し、ヒト ES 細胞から分化誘導された細胞による細胞移植により、全く新しい腎不全治療法の開発が可能か検討する。

3. 研究の方法

平成 21 年度

I: 遺伝子発現レベルでのヒト ES 細胞から腎臓前駆細胞への分化誘導条件を検討する。

ヒト ES 細胞は京都大学再生医科学研究所から分与された KhES-1、KhES-2、KhES-3 を用い、維持培養には京大からプロトコール (version 1.1/2006.05.15) に従う。培地として、DMEM/F12 (500ml) に non-essential amino acid (5ml), 200mM L-glutamin (6.25ml), KSR (125ml), 2-mercaptoethanol (5ml) を加え、使用直前に human bFGF が最終濃度 5ng/ml となるように添加したものを用いる。CO₂ インキュベータの濃度は 2-3% とし、培地 pH が酸性に傾きやすいのに対処する。Feeder から剥がしたり、経代培養の際には、2.5% Trypsin (10ml), 10mg/ml Collagenase IV (10ml), KSR (final 20%) (20ml), 100mM CaCl₂ (1ml) を PBS 59ml に添加したものを解離液として用いる。

Feeder 細胞から剥がしたヒト ES 細胞を、2 次元培養のみならず、いわゆる embryobody 形成に用いられる浮遊培養、合成ハイドロゲル (メビオールジェル: メビオール社)、コーゲンゲル (Cell Gen: KOKEN) 等の 3 次元培養素材を用いて培養し、これに epigenetics 制御薬である HDAC 阻害薬 (TSA, SAHA, バルプロ酸) や脱メチル化剤

(5-azacytidine) を添加することによる遺伝子発現変化を検討する。2 次培養にはゼラ

チンコートした培養皿を用い、基礎培地として、DMEM/F12+10% FCS を使用する。申請者はこれまで合成ハイドロゲル (メビオールジェル: メビオール社)、コーゲンゲル (Cell Gen: KOKEN) を用いて、ヒト間葉系幹細胞および腎臓 SP 細胞の培養による研究を行っており (Biochem. Biophys. Res. Commun. 317;1103-1107, 2004; Biochem. Biophys. Res. Commun. 328;288-291, 2005)、その使用法に習熟しており、研究に技術的支障はない。申請者は Epigenetic 制御薬である Tricostatin A (TSA) を用い、腎臓組織幹細胞の活性化による慢性腎不全モデルにおける腎機能改善

(Stem Cells. 2007;25:2469-75) やヒト培養尿細管細胞の繊維化抑制作用 (J Am Soc Nephrol. 2007, 18(1):58-65) を報告しており、まず TSA の作用を検討する。TSA は HDAC 阻害薬としては short-chain fatty acids に分類されるが、TSA で十分な分化誘導が得られない場合、同種に分類されるバルプロ酸や hydroxamic acid に分類される suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) の効果を検討し、脱メチル化剤である 5-Azacytidine, 5-Aza-2'-deoxycytidine, Procainamide 等を併用する。さらに、アニマルキャップで前腎への分化誘導の報告のあるアクチビン、レチノイン酸を既報に従い添加し、同様の検討を行う。

平成 22 年度

II: ヒト ES 細胞から腎臓前駆細胞への分化効率の *in vivo* での評価

I で設定した遺伝子発現レベルでの条件設定が *in vivo* で反映されるか、奇形種を形成させ、組織染色での確認を行う。皮下への移植は腎皮膜への移植に比して簡便かつ複数の移植が同時に可能であり、腎皮膜移植や 3 次元培養前の条件スクリーニング目的で行う。

SCID マウスの皮下に一カ所あたり 1X10⁶ 個の epigenetics 制御薬で分化誘導したヒト ES 細胞を移植する。コントロールとしては、feeder で培養しただけの ES 細胞を用いる。上記移植後 9 週間から 2 週おきに奇形種を取り出し、HE 染色、lectin 染色、nephtrin 染色等により腎臓構成細胞の形成を確認する。評価方法としては、Dekel (Nature Medicine, 2003, 9, 53-60) らの報告に従い、断面積あたりの糸球体 (あるいは糸球体様構造物) の個数で行う。皮下、腎皮膜下への細胞移植については、研究協力者がこれまでヒト ES 細胞のコントロール実験で習熟しており、技術的に問題はなく、これまで 9 週で明らかな奇形種形成を確認済みである。

III: 腎皮膜下への移植および 3 次元培養

による腎臓前駆細胞としての機能評価

1) 腎皮膜下への移植

II で最も効率良く奇形種内で糸球体を形成した分化誘導条件を用いて、Dekel (Nature Medicine, 2003, 9, 53-60) らの報告に従い腎皮膜下へ移植し、8週後に組織染色によりヒト ES 細胞が胎児腎臓同様に腎臓へ分化するか検証する。

2) 3次元培養での分化誘導

申請者のマウス体性幹細胞 (SP 細胞) を用いた検討では、管腔構造をもつ構造物への分化誘導に21日を要したことから (Hishikawa et al. BBRC, 2005, 328, 288-291)、21日から35日間3次元培養を行う。立体構造物が得られた場合、コラーゲンゲルではゲルからの取り出しが困難な為、冷却により液体化するメビオールジェルのみを使用し、他は使用しない。立体構造物が得られれば、ゲルを氷上で浸し、構造物を取り出した後組織染色により評価する。組織染色により後腎レベルでの分化誘導が確認できれば、Hammermann らの報告 (Pediatr Nephrol 14, 513-517, 2000; Curr Opin Nephrol Hypertens 10, 13-17, 2001; Curr Opin Nephrol Hypertens 11, 11-16, 2002) に従い、大網へ移植する。移植後は既報に従い、8週後に開腹し、ヒト ES 細胞が腎臓へと育っているか確認する。

平成 23 年度

IV: 腎不全モデルマウスへの移植

III で生着が見られた場合、腎不全モデルマウスへの移植を行う。腎不全モデルとしては、これまで使用経験のある NTN (nephrotoxic nephritis) モデルを用いる。マウスとしては SCID および C57B6 を用いる。C57B6 では一般に移植細胞は拒絶を受けると思われるが、Dekel らの報告 (Nature Medicine, 2003, 9, 53-60) では前駆細胞は免疫寛容状態にあり、拒絶を受けないとされており、両者での検討を並行して行う。ヒト ES 細胞から腎臓前駆細胞へ分化した細胞移植を第一に行い、これが不可能と判断し、研究期限が残されていた場合、3次元培養で分化誘導された立体構造物の移植を行う。

4. 研究成果

ヒト ES 細胞は京都大学再生医科学研究所から分与された KhES-1、KhES-2、KhES-3 を用い、維持培養には京大からプロトコール (version 1.1/2006.05.15) に従った。21年度は 5-Azacytidine, 5-Aza-2'-deoxycytidine 処理後、未分化マーカー (TRA-1-60, TRA-1-81, OCT)、分化誘導マーカーとしては cadherin-11, WT-1, Pax-2, and Wnt-4 を用いて FACS 解析を行った結果、5-Aza-2'-deoxycytidine が効率良く WT-1 蛋白を誘導し、腎臓構成細胞への分

化誘導剤として、最も有望であること明らかとなった。22年度ではこの条件を基に、in vivo での分化誘導を検討した。コントロール、5-Azacytidine, 5-Aza-2'-deoxycytidine 処理をした KhES-1, 2, 3 を SCID マウス腎臓皮膜下へ移植し、6-24週間後、sacrifice し、形成された組織の染色を行った。尿細管マーカー、ポドサイトマーカー、内皮細胞マーカーを用いた組織染色の結果、コントロールと比較して、5-Azacytidine 処理により、尿細管細胞マーカー陽性細胞が有為に増加することが明らかとなった。一方、ポドサイトマーカー、内皮細胞マーカーには有為差はなく、5-Azacytidine には、ヒト ES 細胞を尿細管細胞系統へ分化誘導促進作用を持つことが明らかとなった。

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7件)

- ① Yoshikawa, M., Hishikawa, K., Idei, M., and Fujita, T. 2010. Trichostatin A prevents TGF-beta1-induced apoptosis by inhibiting ERK activation in human renal tubular epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 642:28-36. (査読有)
- ② Marumo, T., Hishikawa, K., Yoshikawa, M., Hirahashi, J., Kawachi, S., and Fujita, T. Histone deacetylase modulates the proinflammatory and -fibrotic changes in tubulointerstitial injury. 2010. *Am J Physiol Renal Physiol* 298:F133-141. (査読有)
- ③ Hishikawa, K., Takase, O., Idei, M., and Fujita, T. 2009. Comparison of antioxidant activity of cilnidipine and amlodipine. *Kidney Int* 76:230-231 (査読有)
- ④ Hirahashi, J., Hishikawa, K., Kaname, S., Tsuboi, N., Wang, Y., Simon, D. I., Stavrakakis, G., Shimosawa, T., Xiao, L., Nagahama, Y., et al. 2009. Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation* 120:1255-126 (査読有)
- ⑤ Takase, O., Marumo, T., Hishikawa, K., Fujita, T., Quigg, R. J., and Hayashi, M. 2008. NF-kappaB-dependent genes induced by proteinuria and identified using DNA microarrays. *Clin Exp Nephrol* 12:181-188. (査読有)
- ⑥ Marumo, T., Hishikawa, K., Yoshikawa, M., and Fujita, T. 2008. Epigenetic regulation of BMP7 in the regenerative response to ischemia. *J Am Soc Nephrol*

19:1311-1320. (査読有)

- ⑦ Inowa, T., Hishikawa, K., Takeuchi, T., Kitamura, T., and Fujita, T. 2008. Isolation and potential existence of side population cells in adult human kidney. *Int J Urol* 15:272-274. (査読有)

[学会発表] (計3件)

- ① 菱川慶一：腎臓再生をめざしたヒトiPS細胞の3次元培養：日本腎臓学会学術総会（2009年6月3日、横浜）
- ② 菱川慶一、吉川真弘、砂河孝之、油谷浩幸、山中伸弥、藤田敏郎：ヒトiPS細胞の標準化をめざした合成ハイドロゲル培養による包括遺伝子解析：日本再生医療学会総会（2008年3月14日、名古屋）
- ③ 菱川慶一、丸茂丈史、吉川真弘、藤田敏郎：Epigenetics制御による組織幹細胞を介した腎臓再生の可能性：日本再生医療学会総会（2008年3月14日、名古屋）

[図書] (計1件)

- ①菱川慶一、幹細胞の分化誘導と応用、、p83-90、2009

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菱川 慶一 (HISHIKAWA KEIICHI)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：50255460

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし