

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461208

研究課題名(和文) ヒト腎臓由来iPS細胞の細胞記憶を利用した腎臓構成細胞への特異的分化誘導法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a specific differentiation induction method to the kidneys constituent cells using a cell memory of the human kidney-derived iPS cells

研究代表者

高瀬 敦 (TAKASE, OSAMU)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60265684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究にて、起源元細胞が異なる線維芽由来iPS細胞と腎臓由来iPS細胞を2つの腎系統特異的分化誘導法で比較した。いずれも腎臓由来iPS細胞は腎臓系統へ分化し易い事が明らかとなった。また各iPS細胞の包括的メチル化解析にて、新たな腎系統分化誘導関連遺伝子として、高メチル化が56個、低メチル化が17個の遺伝子を同定した。更に網羅的マイクロアレイ解析にて、それらを8個に絞り込めた。これらの遺伝子は新たな腎臓発生・再生因子として期待され、今後の様々な研究に役立つ事を願う。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have investigated the difference between fibroblast-derived iPS cells and the kidney-derived iPS cells by two kind renal lineage-specific differentiation induction methods. Both kidney-derived iPS cells by two induction methods became clear that easy to differentiate into kidney system. Also by comprehensive methylation analysis of each iPS cell, as a new renal lineage differentiation induction-related gene, hypermethylation group of 56 genes, and hypomethylation group of 17 genes were identified. In additional data of the comprehensive microarray analysis, it was narrowed down them to 8 genes. These genes are expected to be a kidney development and regeneration factor. We hope that it is useful in the future of the various studies.

研究分野：再生医学

キーワード：Epigenetic Memory 腎臓由来iPS細胞 腎系統特異的分化誘導法 包括的メチル化解析 網羅的マイクロアレイ解析 新規腎臓発生・再生因子

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは iPS 細胞を使った腎臓構成細胞への特異的分化誘導法の確立を目的に研究を行ってきた。これまで申請者らは独自にヒト腎上皮細胞由来、ヒトメサンギウム細胞由来、ヒト近位尿細管細胞由来の3つのヒト腎臓由来 iPS 細胞 (K-iPS 細胞) を初めて樹立した。また腎臓特異的分化誘導に関して、既報の Nature Communication の報告に従いアクチビン、レチノイン酸、BMP-7 などでの分化誘導法を検討した。結果、既報の方法は、その誘導法の有効性を確認でき、線維芽由来 iPS 細胞 (F-iPS 細胞) と比べて K-iPS 細胞を用いた方が腎臓への分化誘導に優れていた。更にエピジェネティクス制御薬である TSA が腎臓への分化誘導促進に有効であることも見出した。しかし、iPS 細胞分化誘導法も確実で、一定な腎臓分化度を示しておらず、この事象は iPS 化する前の起源細胞に残された Epigenetic memory が関与しているものと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究においては、iPS 細胞の Epigenetic memory の概念 ( ) を考慮して、2 種類の起源細胞から樹立した F-iPS 細胞と K-iPS 細胞を比較し、iPS 細胞の腎臓特異的分化誘導機構を検討する。具体的には、

(1) 既報にある 2 種類の腎臓特異的分化誘導法を用いて F-iPS 細胞と K-iPS 細胞で行い、比較検討する。

(2) Epigenetics 制御因子である包括的 DNA メチル化プロファイル解析を、起源細胞とその iPS 細胞で行う。

(3) それらの網羅的マイクロアレイ解析を行い、包括的 DNA メチル化解析との相互関係をj確認する。

本研究にて、これまでの発生過程に順じた分化誘導法と全く異なる iPS 細胞における高効率な腎臓分化誘導法の確立をめざす。

## 3. 研究の方法

(1) これまで独自に樹立した 3 種類の K-iPS 細胞において、最も腎臓特異的分化誘導に適している iPS 細胞を選ぶ。最初に起源細胞からの iPS 細胞が正しく iPS 化 (初期化) されているかを ALP 染色、未分化因子の発現を確認する。また SCID マウス腹膜下への細胞移植にてテラトーム形成を確認する。

(2) 既存の 2 つの腎臓特異的分化誘導法にて、最適と考える腎臓上皮細胞から樹立した K-iPS 細胞と F-iPS 細胞を分化誘導時間と共に腎臓発生、分化因子の発現を Real time-PCR、Western Blot などにて比較検討する。

(3) 起源細胞である線維芽細胞、腎臓上皮細胞、その iPS 化した K-iPS 細胞、F-iPS 細胞において、DNA メチル化プロファイル解析として Infinium 解析を用い、ハイスループット処理で検証する。

(4) 腎臓特異的分化誘導機構に新しく関連すると考えるメチル化変動遺伝子を同定し、その遺伝子発現との相互関係を網羅的マイクロアレイ解析で確認する。

(5) iPS 細胞のメチル化解析とマイクロアレイ解析の相互作用の結果から新規の腎臓分化誘導に関連する候補遺伝子を同定する。

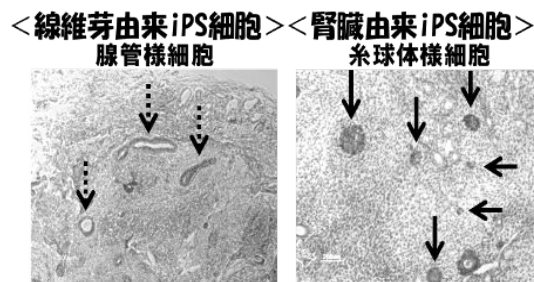
## 4. 研究成果

### (1) K-iPS 細胞の樹立、未分化能の確認

我々が樹立した 3 種類の K-iPS 細胞において、iPS 細胞が正しく iPS 化 (初期化) されているかを ALP 染色、未分化因子 (Oct3/4、Nanog) の発現で確認した結果、いずれの 3 種類の K-iPS 細胞は F-iPS 細胞と比較して ALP 染色に大きな相違はなく染色されていた。しかし、未分化因子 (Oct3/4、Nanog) の発現では最も K-iPS 細胞が F-iPS 細胞と近似した未分化能を有していた。

その K-iPS 細胞を SCID マウス腹膜下へ細胞移植したところ、F-iPS 細胞同様にテラトームの形成を認め、初期化を検証できた。ま

た興味深い事に、腎臓実質内に各 iPS 細胞を細胞移植すると、下図に示すように F-iPS 細胞移植では認めなかった糸球体様細胞が K-iPS 細胞移植で確認された。この結果より隣接する腎臓細胞自体から iPS 細胞が分化誘導刺激され、一部糸球体様構造に分化した可能性が示唆された。また、K-iPS 細胞が腎臓系統への分化誘導に有利である事も考えられた。

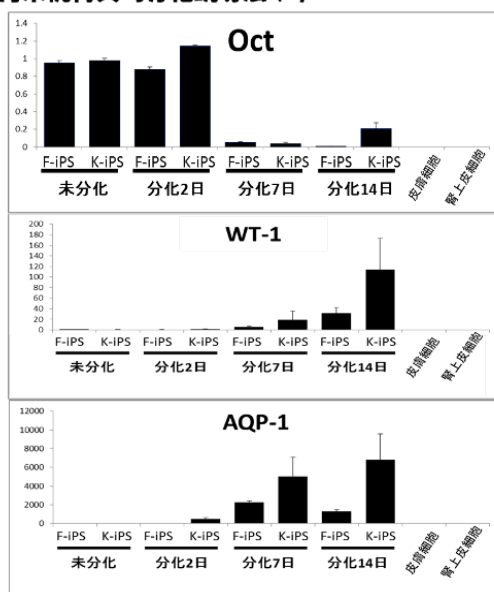


各 iPS 細胞 → 腎臓実質内細胞移植

(2) 2つの腎臓系統特異的分化誘導法における F-iPS 細胞と K-iPS 細胞の分化度比較

既報に従い腎臓系統への分化誘導を試みた。下図は、中間中胚葉を経た分化誘導報 (Nature Commu.) に従い、F-iPS と K-iPS の未分化因子、腎臓発生・分化因子の発現を Real time PCR で比較した結果である。

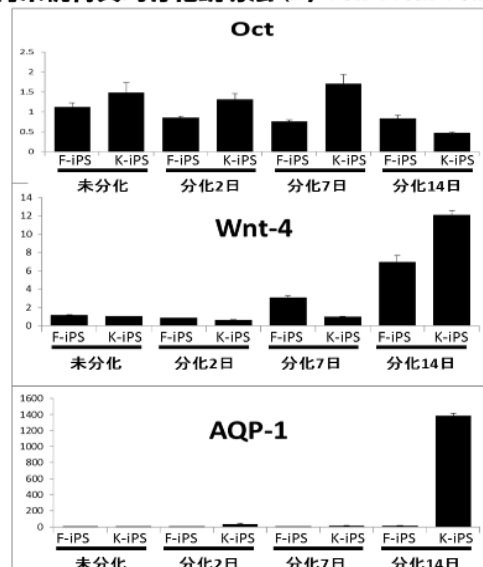
腎臓系統特異的分化誘導法 (by Nature Commun.)



また、下図は体軸幹細胞を経た分化誘導報 (Cell Stem Cells) に従った同様な結果

である。

腎臓系統特異的分化誘導法 (by Cell Stem Cells)



いずれの分化誘導法においても、K-iPS は F-iPS に比較して、腎臓系統へ分化し易い事が明らかとなった。しかしながら、2つの腎臓系統特異的分化誘導法では腎臓分化度が一定しておらず、この事象は iPS 化する前の起源細胞に残された Epigenetic memory の関与が考えられた。

(3) DNA メチル化プロファイル解析

K-iPS、F-iPS における iPS 樹立前後のメチル化の変化を、27,000 のメチル化サイトについて解析した。中でも、High CpG プロモーター領域 (GC>0.55, CpG>0.75) においては、56 の高メチル化遺伝子、17 の低メチル化遺伝子を同定し、既報の発生関連遺伝子とは全くことなる腎臓系統への分化誘導候補遺伝子を見出した。

(4) 網羅的マイクロアレイ解析

メチル化解析の結果、得られて腎臓系統分化誘導候補遺伝子について、そのメチル化と発現との相互関係をみた。マイクロアレイ解析では網羅的に 6 万個の遺伝子について検討した結果、上記 56 の高メチル化遺伝子では 5 個の遺伝子、17 の低メチル化遺伝子では 3 個の遺伝子で相関を見出した。

これらの結果より、既存の腎臓発生過程で関与する遺伝子以外の因子を見出す事ができた。今後これらの候補遺伝子を Target とした、全く新しい iPS 細胞の腎系統特異的分化誘導法の開発に繋がれると考えられた。

更にこれらの遺伝子は腎臓疾患における再生・修復機構にも関与している事が考えられ、多方面での研究に応用できると考えられた。

#### <引用文献>

- Kim K1, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 467(7313):285-90, 2010.
- Mae S, Shono A, Shiota F, Yasuno T, Kajiwara M, Gotoda-Nishimura N, Arai S, Sato-Otubo A, Toyoda T, Takahashi K, Nakayama N, Cowan CA, Aoi T, Ogawa S, McMahon AP, Yamanaka S, Osafune K. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 4:1367, 2013.
- Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, Nishinakamura R. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 14(1):53-67, 2014.

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計6件)

- Hishikawa K, Takase O, Yoshikawa M, Tsujimura T, Nangaku M, Takato T. Adult stem-like cells in kidney. *World J Stem Cells*. 査読有 7(2):490-4, 2015.  
Doi: 10.4252/wjsc.v7.i2.490.
- Takase O, Yoshikawa M, Idei M, Hirahashi J, Fujita T, Takato T, Isagawa T, Nagae G, Suemori H, Aburatani H, Hishikawa K. The role of NF- $\kappa$ B signaling in the maintenance of pluripotency of human induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 査読有 8(2):e56399, 2013.

Doi: 10.1371/journal.pone.0056399.

##### [学会発表](計13件)

- 高瀬敦, 辻村太郎, 出射真奈, 南学正臣, 高戸毅, 菱川慶一  
「ヒト腎臓由来 iPS 細胞の包括的 DNA メチル化解析による新規腎系統分化誘導遺伝子の同定」  
第 15 回日本再生医療学会総会  
2016 年 3 月 17-19 日 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
- 高瀬敦, 辻村太郎, 出射真奈, 南学正臣, 高戸毅, 菱川慶一  
「腎臓細胞記憶を考慮した iPS 細胞の Methylation 解析」  
東京大学先端医療シーズ開発フォーラム  
2016 年 2 月 2 日 東京大学伊藤国際学術研究センター (東京都文京区)
- Takase O, Nangaku M, Hishikawa K  
「Genome-wide methylation analysis of epigenetic memory in human kidney derived iPS cells」  
American Society of Nephrology (KIDNEY WEEK 2015)  
2015 年 11 月 3-8 日 San Diego (USA)
- 高瀬敦, 辻村太郎, 南学正臣, 菱川慶一  
「腎臓由来 iPS 細胞における 2 つの腎系統特異的分化誘導法および Epigenetics Modification による腎臓再生法の検討」  
第 58 回日本腎臓学会学術総会  
2015 年 6 月 5-7 日 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- 高瀬敦, 辻村太郎, 出射真奈, 宮本寛治, 吉川真弘, 南学正臣, 高戸毅, 菱川慶一  
「腎臓由来 iPS 細胞を用いた 2 つの腎系統特異的分化誘導法の検討」  
第 14 回日本再生医療学会総会  
2015 年 3 月 19 - 21 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- Takase O, Nangaku M, Hishikawa K  
「Epigenetic induction of kidney lineages in human kidney derived iPS cell」  
American Society of Nephrology (KIDNEY WEEK 2014)  
2014 年 11 月 11-16 日 Philadelphia (USA)
- 高瀬敦, 南学正臣, 菱川慶一  
「腎系統特異的分化刺激を用いた腎上皮細胞由来 iPS 細胞の検討」  
第 57 回日本腎臓学会学術総会  
2014 年 7 月 4-6 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- 高瀬敦, 出射真奈, 高戸毅, 南学正臣, 菱川慶一  
「Epigenetic Memory を利用した腎上皮細胞由来 iPS 細胞の腎系統特異的分化誘導法の試み」  
第 14 回日本抗加齢医学会総会

2014年6月6-8日 大阪国際会議場  
(大阪府大阪市)

高瀬敦、出射真奈、宮本寛治、吉川真弘、  
高戸毅、菱川慶一

「腎上皮細胞由来 iPS 細胞と線維芽細胞  
由来 iPS 細胞の比較による腎系統特異的  
分化誘導法の検討」

第13回日本再生医療学会総会

2014年3月4-6日 国立京都国際会館  
(京都府京都市)

高瀬敦、辻村太郎、出射真奈、南学正臣、  
高戸毅、菱川慶一

「腎臓由来 iPS 細胞を使った腎臓再生の  
試み」

東京大学先端医療シーズ開発フォーラ  
ム

2014年1月24日 東京大学伊藤国際学  
術研究センター(東京都文京区)

Takase O, Hishikawa K

「Development of renal regeneration  
with human Renal-iPS cells using  
epigenetic memory」

American Society of Nephrology  
(KIDNEY WEEK 2013)

2013年11月5-10日 Atlanta (USA)

高瀬敦、出射真奈、山本芳子、高戸毅、  
菱川慶一

「腎上皮細胞由来 iPS 細胞を用いた障害  
腎への再生医療の試み」

第13回日本抗加齢医学会総会

研究助成受賞講演

2013年6月28-30日 パシフィコ横浜  
(神奈川県横浜市)

高瀬敦、吉川真弘、菱川慶一

「3種類の腎臓由来 iPS 細胞からの腎臓  
再生の可能性について」

第56回日本腎臓学会学術総会

2013年5月10-12日 東京国際フォーラ  
ム(東京都千代田区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高瀬 敦 (TAKASE, Osamu)  
東京大学 医学部附属病院 講師  
研究者番号：60265684

### (2) 研究分担者

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

### (3) 連携研究者

藤田 敏郎 (FUJITA Toshiro)  
東京大学 先端科学技術研究センター  
教授  
研究者番号：10114125

中内 啓光 (NAKAUCHI Hiromitsu)  
東京大学 医科学研究所 教授