

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09244

研究課題名(和文) iPS細胞由来腎臓組織幹細胞を用いた新規腎臓再生療法開発

研究課題名(英文) Development of novel kidney regeneration therapy using iPS cell-derived kidney tissue stem cells

研究代表者

吉川 真弘 (yoshikawa, masahiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：20447410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞からMyoR陽性を指標に、腎臓組織幹細胞を分化誘導し、腎臓組織幹細胞移植のCKDモデルにおける腎臓再生作用を検証した。具体的には、腎臓組織からFACS分離したMyoR陽性細胞、iPS細胞より分化誘導したMyoR陽性細胞を3種類の慢性腎不全モデルに移植し、腎機能や組織障害に対する再生作用を比較した。再現性の問題は残るものの、MyoR陽性細胞は腎臓機能の回復作用を持つことが示唆され、ヒトiPS細胞を用いた新規CKD治療法開発をめざす基礎データとなりうる成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：By using MyoR positivity as an index from iPS cells, kidney tissue stem cells were induced to differentiate, and kidney regenerating action in CKD model of kidney tissue stem cell transplantation was examined. Specifically, MyoR positive cells FACS isolated from kidney tissue, and MyoR positive cells differentiated from iPS cells were transplanted into three kinds of chronic renal failure models, and the renewal function and regeneration action against tissue damage were compared. Although the problem of reproducibility remains, MyoR positive cells are suggested to have a recovery action of kidney function, which is considered to be a fundamental data aiming at development of a novel CKD therapy method using human iPS cells.

研究分野：再生医療

キーワード：iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

申請者らはマウス腎臓から分離した、basic-helix-loop-helix 型転写因子 MyoR 陽性の腎臓組織幹細胞を移植することで、AKI モデルマウスの腎機能が改善することを報告し、MyoR 陽性の腎臓組織幹細胞移植が腎再生治療法として有望であることを報告した (Cell Biol. 169:921-8, 2005)。また、MyoR 陽性の腎臓組織幹細胞はヒト腎臓においても存在し、健常腎のみならず腎機能低下例や蛋白尿陽性例においても分離可能であることを報告した。さらに、MyoR 陽性細胞の腎臓における再生作用を検証する為に、MyoR ノックアウトマウスを用い、cisplatin 投与による AKI モデルを作製したところ、臓器障害の増悪や生存率の低下を認め、MyoR 陽性細胞が腎臓保護的に作用していることを見いだした (AJP 2013)。MyoR 陽性細胞は前述のようにヒト腎臓にも存在するが、腎臓組織全体を FACS 分離した細胞の 1% 程度しか存在せず、CKD の進行により細胞数が更に減少することから、CKD 患者自身の MyoR 陽性細胞を再生療法に用いることは難しい。そこで最も期待されるのが、患者自身の細胞から樹立した iPS 細胞より分化誘導した MyoR 陽性細胞である。申請者らは、平成 19 年度から平成 24 年度まで、文部科学省再生医療の実現化プロジェクト (東大 iPS 拠点事業) の分担研究者として、各種ヒト腎臓細胞から iPS 細胞を樹立した経験を有するが、iPS 細胞には、樹立前の細胞に関する細胞記憶が残されており、例えば血液細胞から樹立した iPS 細胞は血液系へ分化し易いことが報告されている。研究代表者 (吉川) は、基盤研究 C (平成 22-25 年度) において、腎臓上皮より樹立した iPS 細胞には、腎臓由来の細胞記憶が残されており、線維芽細胞より樹立した iPS 細胞と比較して、腎臓系統へ効率良く分化することを明らかとした。以上より、MyoR 陽性腎臓組織幹細胞を分化誘導するには、腎臓細胞から iPS を樹

立し、分化誘導することが最も効率が良いと考えられる。

2. 研究の目的

臨床応用を考えた場合、iPS 細胞の樹立に患者自身の腎臓組織を用いることは容易でなく、皮膚線維芽細胞や末梢血を用いることが現実的である。そこで、本研究では最初に MyoR 陽性腎臓組織幹細胞への分化誘導が容易であると考えられる 3 種類の腎臓構成細胞 (上皮、尿細管、メサンギウム) から iPS 細胞を樹立し、分化誘導条件を検討する。次に、この分化誘導条件を基に、線維芽細胞由来 iPS 細胞の MyoR 陽性細胞への分化誘導条件の最適化を図る。

さて、Daley (Nature. 2010) らは、iPS 細胞にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤等の epigenetics 制御薬を作用させることで、目的細胞へ効率よく分化誘導できることを報告した。そこで本研究では、4 種類の iPS 細胞をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤や脱メチル化剤で処理し、FACS 解析することにより MyoR 陽性腎臓組織幹細胞への効率良い分化誘導法の確立をめざす。

申請者らはこれまで、AKI モデルにおける MyoR 陽性細胞の腎保護・腎再生作用を報告してきたが、KI は可逆的疾患であり、臨床的に治療法は確立している。即ち、MyoR 陽性細胞を用いた腎臓再生医療の実現には、CKD モデルでの再生作用を明らかにすることが必須である、本研究では 3 種類の CKD モデルを作製し、MyoR 陽性細胞の移植による再生作用を検証する。具体的には申請者らが論文報告してきた Thy1 腎炎モデル (Eur J Pharmacol. 2011) UUO モデル (AJP Renal Physiol. 2010) BSA 負荷モデル (Kidney Int. 2005) を用いる。

3. 研究の方法

iPS 細胞の樹立および MyoR 陽性腎臓組織幹細胞への分化誘導を行う

(1) iPS 細胞の樹立

マウス腎構成細胞および線維芽細胞より、10-20の新しいiPS細胞クローンを樹立する。iPS化はPlate E法を用いるが、樹立効率が悪い場合、293GPG細胞株を使用する。

Plate E 法

ウイルス産生：山中4因子を導入する為にPlate E細胞に4因子のベクターとpSVGL-1をtransfectionし、48時間後に得られたウイルスを回収する。

遺伝子導入:Polybrene 4mg/mlの存在下で、24時間ウイルス液中で培養し、導入する。

コロニー選択：一日おきに培地を交換し、21日コロニー形成を観察し、コロニーを選択する。

未分化能の確認：クローンの未分化能をPCR、FACSで評価し、クローンを選択する。樹立したiPS細胞の包括的遺伝子発現解析未分化マーカーの発現確認のみでは初期化評価は不十分であり、包括的遺伝子発現により評価を行うい、初期化が良好なクローンのみを以後の研究に用いる。初期化の評価およびマイクロアレイ解析は連携研究者小川との共同研究により実施する。

(2)MyoR陽性腎臓組織幹細胞への分化誘導
分化誘導したiPS細胞を第一段階としてside population(SP)細胞として分離し、その後MyoR陽性の細胞のゲートをかけ、MyoR陽性腎臓組織幹細胞2段階で分離する。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 TSA、脱メチル化剤 5-Aza-dc を異なる濃度や処理時間を用いて分化誘導したiPS細胞の胚葉体をcollagenase処理する。細胞浮遊液の細胞濃度を 1×10^6 cells/mlに調整し、Hoechst33342濃度を5 mg/mlとして37度で60分間処理する。

FACS Ariaを用いて、青および赤の二色に展開しSP細胞の解析およびsortingを行う。SP細胞はverapamilやreserpine処理にてFACSプロファイルが消失することから単なる低染色細胞と区別される

が、negative controlとしてHoechst33342と同時に50mMのreserpineで同時処理したものをFACS解析して、SP細胞で有る事の確認実験を毎回行う。

3で得られた細胞をMyoR抗体で染色し、SP+ MyoR+分画をFACS Ariaでsortingする。

4の解析結果から、1で用いた分化誘導条件の最適化を図る

(3)CKDモデルに置けるMyoR陽性腎臓組織幹細胞移植効果の検証

3種類のCKDモデルを用い、治療効果を生化学的(血液データ：BUN, CRTNN)、組織学的(組織染色)に評価する。

3種類CKDモデルは申請者が論文発表した方法(Thy1腎炎モデル：Eur J Pharmacol. 2011、UUOモデル：AJP Renal Physiol. 2010、BSA負荷モデル：Kidney Int. 2005)に準じて作製する。

前述の2段階FACS sortingにより、同系統マウス腎臓組織からMyoR陽性腎臓組織幹細胞を分離し、3種類CKDモデルに細胞移植を行う。細胞移植の方法としては、尾静脈投与、腎臓脈投与の2つの方法を試みる。

MyoR陽性腎臓組織幹細胞投与後、2週毎に採血を行い、8週後には腎臓組織の染色により、効果を検証する。

平成28年度では、iPS細胞から分化誘導したMyoR陽性腎臓組織幹細胞について、2-3を同様に行い、腎臓組織からFACS分離したMyoR陽性腎臓組織幹細胞との効果を比較検討する。

4. 研究成果

iPS細胞からMyoR陽性を指標に、腎臓組織幹細胞を分化誘導し、腎臓組織幹細胞移植のCKDモデルにおける腎臓再生作用を検証した。具体的には、腎臓組織からFACS分離したMyoR陽性細胞、iPS細胞より分化誘導したMyoR陽

性細胞を3種類の慢性腎不全モデルに移植し、腎機能や組織障害に対する再生作用を比較した。再現性の問題は残るものの、MyoR陽性細胞は腎臓機能の回復作用を持つことが示唆され、ヒトiPS細胞を用いた新規CKD治療法開発をめざす基礎データとなりうる成果と考えられる。

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 5 件)

1

Okubo K, Kamiya M, Urano Y, Nishi H, Herter JM, Mayadas T, Hirohama D, Suzuki K, Kawakami H, Tanaka M, Kurosawa M, Kagaya S, Hishikawa K, Nangaku M, Fujita T, Hayashi M, Hirahashi J.

Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation. *EBioMedicine*. 2016;10:204-15. 査読有

2

Tsujimura T, Idei M, Yoshikawa M, Takase O, Hishikawa K.

Roles and regulation of bone morphogenetic protein-7 in kidney development and diseases. *World J Stem Cells*. 8: 288-96, 2016. 査読有

3

Hirahashi J, Hanafusa N, Wada T, Arita M, Hishikawa K, Hayashi M, Nangaku M.

Aspirin and Eicosapentaenoic Acid May Arrest Progressive IgA Nephropathy: A Potential Alternative to Immunosuppression. *Intern Med*. 2015;54(18):2377-82. 査読有

4

Hishikawa K, Takase O, Yoshikawa M,

Tsujimura T, Nangaku M, and Takato T. Adult stem-like cells in kidney. *World journal of stem cells*. 2015;7(2):490-4. 査読有

5

Marumo T, Yagi S, Kawarazaki W, Nishimoto M, Ayuzawa N, Watanabe A, Ueda K, Hirahashi J, Hishikawa K, Sakurai H, et al. Diabetes Induces Aberrant DNA Methylation in the Proximal Tubules of the Kidney. *J Am Soc Nephrol*. 26(10):2388-2397, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 辻村太郎, 高瀬敦, 出射真奈, 吉川真弘, 南学正臣, 高戸毅, 菱川慶一: 網羅的なゲノム欠失・逆位導入による、Tfap2c-Bmp7 領域のクロマチン高次構造形成メカニズムの解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
2. 高瀬敦, 辻村太郎, 吉川真弘, 高戸毅, 南学正臣, 菱川慶一: 多種類 iPS 細胞における Kidney Epigenetic Memory 解析からの新規腎系統分化誘導遺伝子の同定. 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017 年 (再生医療, 16: 285, 2017.)

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉川 真弘 (YOSHIKAWA, Masahiro)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・特任助教
研究者番号: 20447410

(2)研究分担者

菱川 慶一 (HISHIKAWA, Keiichi)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・特任准教授
研究者番号: 50255460