

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09266

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来エリスロポエチン産生細胞を用いた腎性貧血細胞療法の開発

研究課題名(英文) Cell therapy using human pluripotent stem cell-derived erythropoietin-producing cells improves renal anemia

研究代表者

人見 浩史 (Hitomi, Hirofumi)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：70346641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：腎不全の患者は造血ホルモンであるエリスロポエチンの産生が低下するため腎性貧血をきたす。従来の治療では腎性貧血の生理的な制御はむずかしいため、新規の治療法が切望されている。研究代表者はヒトのiPS細胞を肝細胞の系譜へと分化を誘導することにより、エリスロポエチンを産生する細胞を作製した。iPS細胞に由来するエリスロポエチン産生細胞は、エリスロポエチンの産生機序の解明など基礎的な研究にくわえ、腎性貧血に対する新規の治療薬および再生医療の開発に有用である。

研究成果の概要(英文)：We established a method to generate erythropoietin (EPO)-producing cells from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) by modifying previously reported hepatic differentiation protocols. These cells showed increased EPO expression and secretion in response to low oxygen conditions, prolyl hydroxylase domain-containing enzymes inhibitors or insulin-like growth factor-1. The EPO protein secreted from hiPSC-derived EPO-producing cells (hiPSC-EPO cells) induced the erythropoietic differentiation of umbilical cord blood progenitors in vitro. Furthermore, transplantation of hiPSC-EPO cells improved renal anemia in adenine-induced CKD mice. In conclusion, hiPSC-EPO cells may be a useful tool for clarifying the mechanisms of EPO production and provide a novel therapeutic agent for anemia.

研究分野：再生医学 腎臓内科学

キーワード：再生医学 移植・再生医療 iPS細胞 エリスロポエチン 腎性貧血

1. 研究開始当初の背景

腎臓代替療法として透析療法は確立された医療であり、我が国においては、およそ 30 万人がこれにより腎臓機能を代替されている。しかしながら、現在行われている透析療法では、腎臓機能の全てを補完することは出来ない。その代表的な病態として、エリスロポエチンの欠乏に伴う腎性貧血が挙げられる。近年、腎性貧血に対しては、遺伝子組み換え技術で合成されたエリスロポエチン製剤が広く用いられている。これにより輸血療法を主体とする従来の治療と比較し、腎性貧血のコントロールは容易となった。しかし現在行われている間断的な投与は、赤血球数の変動を来すとの報告もあり非生理的と考えられる。また腎性貧血は心血管イベントの発症と密接に関連していることが知られ、十分なエリスロポエチン投与により、これらが抑制される可能性が示唆されている。一方で、エリスロポエチンの過剰投与により、脳や心血管疾患のリスクがむしろ増大することも報告されており、エリスロポエチンの適正投与量については未だ議論が多く、生理的な貧血治療が必要とされている。さらに遺伝子組み換えエリスロポエチン製剤に対する免疫反応により、輸血しか治療法のない重度貧血を呈する患者も報告されている。また腎臓代替療法を必要とする患者数の増加に伴い、エリスロポエチン製剤を投与される患者数も増加している。遺伝子組み換えエリスロポエチン製剤の需要は全世界で増加しており、薬剤販売額の統計においても常に上位を占めている。そのため我が国のみならず、多くの国の医療経済に対する負担は大きく、安価なエリスロポエチン補充を含む腎性貧血の治療が渴望されている。

エリスロポエチンは主に腎臓で産生され、骨髄における赤血球系の産生に関与していることが知られていたが、発現調節機構と産生する細胞については明らかとなっていなかった。最近、エリスロポエチン産生細胞が腎臓の傍尿細管で同定され、その発現機序も徐々に解明されてきた。我々はこの点に着目し、エリスロポエチン産生細胞を生体材料として用いることで、より生理的で安価な腎性貧血治療の可能性を模索してきた。まずエリスロポエチン産生細胞の不活化に興味を持ち実験を行った。種々の細胞を不活化することが出来たが、エリスロポエチン産生細胞を腎臓から単離することが困難であるという問題点も露呈した。そこで生体材料として iPS 細胞に注目し、エリスロポエチン産生細胞を分化誘導する方法を開発した。iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞は、産生機序の解明などの基礎研究に加えて、iPS 細胞を用いた腎性貧血に対する再生医療の開発に有用であると考えている。そこで、これまでの腎性貧血に対する治療を根本から変える可能性のある iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞の臨床応用のため、本研究課題を立

案するに至った。

2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞からエリスロポエチン産生細胞を分化誘導し、これを生体に導入することにより、エリスロポエチンの生理的な補充を行うことを目的とする。

ヒト iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞の臨床応用を最終的な目的とするが、本申請研究では、エリスロポエチン産生機構の解明と、モデル動物に移植し腎性貧血改善効果を検討した。以下に本研究で目的とした内容を示す。

(1) ヒト iPS 細胞からエリスロポエチン産生細胞を分化誘導し、高効率にエリスロポエチン産生を行う条件検討と、エリスロポエチン産生・分泌機構を解明する。

(2) 腎性貧血免疫不全マウスにエリスロポエチン産生細胞を移植し、貧血改善効果を検討する。さらに生体適合性を考慮した医療材料でモジュール(カセット)を作製し移植する。腎性貧血の改善効果について、エリスロポエチン製剤の単独投与と比較検討する。

3. 研究の方法

エリスロポエチン産生機構の解明

これまでエリスロポエチン産生細胞は単離培養されていないため、詳細な産生機構は解明されていない。そこでヒト iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞を分化誘導し、エリスロポエチン産生機構の解明を行う。低酸素誘導因子(HIF)の役割や細胞内情報伝達系について検討する。低酸素刺激や炎症性サイトカイン等がエリスロポエチン産生にどのような影響を与えるかを評価する。

効率的なエリスロポエチン産生の条件検討

エリスロポエチン産生機構を解明し、その知見を利用し様々な条件下でエリスロポエチン産生能を評価する。高効率にエリスロポエチン産生細胞を分化誘導させる至適条件を決定する。これにより動物実験において必要となる大量のエリスロポエチン産生細胞を準備することが可能となる。

エリスロポエチン産生細胞の移植

エリスロポエチン産生細胞を腎性貧血動物モデルに移植し、貧血改善効果や生着効率について検討する。免疫不全マウスである NOD-Scid マウスにアデニンを投与することで腎性貧血を惹起する。エリスロポエチン産生細胞分化誘導法を用いて、産生細胞を準備し、その細胞塊をマウスに移植する。移植部位としては腎臓皮下とする。貧血改善効果とマウスにおけるヒト由来細胞の生着効率、エリスロポエチン分泌に関して検討する。

エリスロポエチン産生細胞モジュールの作製と移植

エリスロポエチン産生細胞を半透膜内に充填することでモジュール化する。不必要になった際や、不測の事態が起こった際に導入細胞を取り出すことを想定し、エリスロポエチ

ン産生細胞をそのまま移植するのではなくモジュール化する。細胞が通過することは出来ず、エリスロポエチンや酸素や糖質等を含む間質液が通過することが出来る半透膜内に、エリスロポエチン産生細胞を充填する。作製したモジュールをマウスに移植する。血流が保たれるように、皮下または腹腔内にモジュールを植え込む。長期間の埋め込みにより、感染やモジュール外への産生細胞の流出、細胞のガン化が起こらないことを確認する。腎性貧血モデルとしてアデニン投与モデルを作成し、腎性貧血の改善効果をエリスロポエチン単独投与と比較検討する。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞の産生機構の解明と至適産生条件の検討を行った。研究の結果、ヒト iPS 細胞由来細胞におけるエリスロポエチン産生機序の一部を明らかにした。生体では酸素濃度に依存してエリスロポエチンが産生される。ヒト iPS 細胞から分化誘導したエリスロポエチン産生細胞も、酸素濃度に応じてエリスロポエチンを産生・分泌した。また産生機序の一部として、HIF の関与を明らかにした。さらに HIF を亢進させることにより、エリスロポエチン産生が増大することを明らかにした。これにより、分化誘導およびエリスロポエチン産生・分泌の至適条件を決定した。

次にエリスロポエチン産生細胞のモジュール(カセット)を作製し生体に移植することを行った。本研究に必須である腎性貧血マウスモデルが十分確立されていなかったため、マウスにアデニンを経口投与することで腎性貧血モデルを作製した。エリスロポエチン産生細胞を用いた細胞療法の開発のため、アデニンにより誘発した腎性貧血マウスにエリスロポエチン産生細胞を移植した。これにより腎性貧血は改善した。非常に重要なことに、移植されたエリスロポエチン産生細胞により多血症となることなく、この細胞を用いた生理的な貧血治療の可能性を示唆した。マウス血中にヒトエリスロポエチンの発現を認め、貧血改善効果はヒト iPS 細胞から誘導された細胞から分泌されたエリスロポエチンによることが確認された。さらには免疫隔離デバイスにエリスロポエチン産生細胞を充填し、臨床応用の可能性について検討した。これまでいくつかの臓器に対して、ヒト iPS 細胞を用いた再生医療の試みがなされているが、エリスロポエチン産生細胞に関しては、知りうる限り我々以外の報告は存在せず、本研究は全く新規で独自のものである。患者自身の体細胞から樹立され、ほぼ無限に増殖する能力を有する多能性幹細胞である iPS 細胞を用いることで、免疫抑制の必要ないエリスロポエチン産生細胞を大量に作製することも可能であり、今後も需要の増す腎性貧血治療に対して有効な手段になりうると思われる。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 13 件)

1. Hitomi H, (他 13 名、1 番目) Human pluripotent stem cell-derived erythropoietin-producing cells ameliorate renal anemia in mice. *Sci Transl Med* 2017;9:409. 査読あり
10.1126/scitranslmed.aaj2300.
2. Hitomi H, (他 9 名、5 番目) Responses of renal hemodynamics and tubular functions to acute sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor administration in non-diabetic anesthetized rats. *Sci Rep.* 2017;7:9555. 査読あり
10.1038/s41598-017-09352-5.
3. Hitomi H, (他 4 名、4 番目) Effect of a selective SGLT2 inhibitor, luseogliflozin, on circadian rhythm of sympathetic nervous function and locomotor activities in metabolic syndrome rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017;44:522-5. 査読あり
10.1111/1440-1681.12725.
4. Hitomi H, (他 7 名、5 番目) Hormonal changes following a low-salt diet in patients with Ménière's disease. *Auris Nasus Larynx.* 2017;44:52-7. 査読あり
10.1016/j.anl.2016.03.001.
5. Hitomi H, (他 2 名、2 番目) Cardioprotective effects of SGLT2 inhibitors are possibly associated with normalization of the circadian rhythm of blood pressure. *Hypertens Res* 2017;40:535-40. 査読あり
10.1038/hr.2016.193.
6. Hitomi H, (他 1 名、1 番目) How should we treat patients with primary aldosteronism to prevent new-onset diabetes mellitus? *J Hypertension.* 2017;35:1575-6. 査読あり
10.1097/HJH.0000000000001440.
7. Hitomi H, (他 10 名、8 番目) IBMX protects human proximal tubular epithelial cells from hypoxic stress through suppressing hypoxia-inducible factor-1 expression. *Exp Cell Res.* 2017;358:343-51. 査読あり
10.1016/j.yexcr.2017.07.007.
8. Hitomi H, (他 13 名、9 番目) A protease-activated receptor-1 antagonist protects against podocyte injury in a mouse model of nephropathy. *Sci Rep.* 7:9555, 2017. 査読あり
10.1016/j.jphs.2017.09.002.
9. Hitomi H, (他 9 名、5 番目) Responses of renal hemodynamics and tubular functions to acute sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor administration in non-diabetic anesthetized rats. *J. Pharmacol. Sci.*

- 2017 in press. 査読あり
10.1038/s41598-017-09352-5.
10. Hitomi H, (他 2 名、2 番目) Hypertension with diabetes mellitus “Complications”. *Hypertens Res* 2017 in press. 査読あり
10.1038/s41440-017-0008-y.
 11. Hitomi H, (他 9 名、6 番目) Effects of diuretics on sodium-dependent glucose cotransporter 2 inhibitor-induced changes in blood pressure in obese rats suffering from the metabolic syndrome. *J Hypertens*. 2016;34:893-906. 査読あり
10.1097/HJH.0000000000000871
 12. Hitomi H, (他 7 名、3 番目) Urinary Angiotensinogen Could Be a Prognostic Marker of the Renoprotection of Olmesartan in Metabolic Syndrome Patients. *Int J Mol Sci*. 2016;17:1800. 査読あり
10.3390/ijms17111800
 13. Hitomi H (他 8 名、6 番目) Chelation of dietary iron prevents iron accumulation and macrophage infiltration in the type I diabetic kidney. *Eur J Pharmacol*. 2015;756:85-91. 査読あり
10.1016/j.ejphar.2015.03.053.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 人見浩史他 エリスロポエチン産生細胞による新しい治療の試み、第 53 回日本人工臓器学会大会、2015.11.19、東京ドームホテル(東京都・文京区)
2. 人見浩史他 ヒト iPS 細胞由来 EPO 産生細胞を用いた腎性貧血に対する細胞療法の開発、第 58 回日本腎臓学会学術総会、2015.6.5、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
3. 人見浩史他 iPS 細胞をもちいた CKD 貧血治療法の開発、第 23 回クリニカルファーマシーシンポジウム、2015.7.4、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
4. 人見浩史他 安定した腎性貧血モデル動物確立の試み、第 6 回日本腎臓リハビリテーション学会、2016.3.26、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)
5. 人見浩史他 Establishment of a mouse model of renal anemia. The 17th International SHR Symposium, 2016.9.22、秋葉原 UDX Gallery(東京都千代田区)
6. 人見浩史他 iPS 細胞を用いたエリスロポエチン産生細胞による腎性貧血に対する細胞療法の検討、第 2 回黒潮カンファレンス、2017.10.28、高知県立県民文化ホール(高知県高知市)
7. 人見浩史他 iPS 細胞から分化誘導したエリスロポエチン産生細胞を用いた腎性貧血に対する細胞療法の検討、第 27 回日本循環薬理学会、2017.12.1、ウインクあいち(愛知県名古屋市)

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)
名称: エリスロポエチン産生細胞の誘導方法
発明者: 人見浩史他
権利者: 国立大学法人京都大学
種類: 特許
番号: 特許第 6112733 号(P6112733)
取得年月日: 2017 年 3 月 24 日
国内外の別: 国外(PCT/JP2013/060878)

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.kms.ac.jp/~yakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

人見 浩史 (HITOMI HIROFUMI)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号: 70346641