

平成 30 年 5 月 11 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：15K09273

研究課題名(和文)尿細管細胞の再生またはEMTを決定するマスター制御因子の解明

研究課題名(英文) Master regulatory factors for regeneration and EMT of kidney tubular cells

研究代表者

門川 俊明 (Monkawa, Toshiaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：80286484

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)：TF-inducible hESバンクを用いた遺伝子発現比較解析から、腎臓前駆細胞への分化誘導にかかわる転写因子を同定した。4つの転写因子を合成mRNAの形でヒトES細胞に遺伝子導入し、さらに別の4因子を2日間添加し3次元培養を行う事で、分化誘導開始後14日目に足細胞、近位尿細管細胞、遠位尿細管細胞の特徴を有した、ネフロン様構造を有する腎オルガノイドを分化誘導できた。
miR-363をヒト尿細管細胞株(HKC-8)に過剰発現する実験を通して、miR-363によるヒト尿細管細胞におけるEMTの誘導は、TWIST/canonical WNT pathwayの発現上昇を介している結論づけた。

研究成果の概要(英文)：Based on in-silico analysis, we have identified the first set of four transcription factors to enhance the differentiation from hPSCs into SIX2+SALL1+ nephron progenitor cells (NPCs) with 92% efficiency within 2 days of reprogramming. The second set of four transcription factors converted SIX2+ NPCs into kidney organoids which contain multi-segmented nephron structures with characteristics of podocytes, proximal and distal tubules on day 14. This novel method using synthetic mRNAs might provide safe cellular sources without genome modifications for kidney regenerative therapies as well as for disease modeling and drug screening in vitro. Overexpression of miR-363 induced mesenchymal phenotypes with loss of epithelial phenotypes in human kidney tubular HKC-8 cells. We identified TWIST/canonical WNT pathway as the downstream effector of miR-363, and inhibition of canonical WNT by small molecule, IWR-1, attenuated EMT induced by miR-363.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ES細胞 iPS細胞 腎臓尿細管 miRNA 転写因子

1. 研究開始当初の背景

近年、腎臓病進行における尿細管細胞のダイナミックな動きが注目されている。一つは尿細管細胞の再生現象であり、もう一つは、EMTである。従来、尿細管の「再生」と「EMT」は相反する作用と考えられてきた。しかし、近年になって、尿細管の再生時には尿細管細胞自身が脱分化・増殖することや (Kusaba et al. JASN 2014)、尿細管細胞からネフロン前駆細胞 (後腎間葉細胞) へとリプログラミングする際に EMT が必要であることが報告されている (Hendry et al. JASN 2013)。つまり、尿細管の再生時には EMT が必要であり、実は「再生」と「EMT」は密接な関連がある事が分かってきた。我々は、これまで尿細管細胞の「再生」と「EMT」に着目し研究を続けてきている。尿細管再生に関しては、Kidney specific protein (KSP) 陽性細胞を分化マーカーとしてマウス ES 細胞の腎尿細管細胞への分化誘導方法を樹立した (Morizane et al. PlosOne 2013)。また、EMT に関しては microRNA (miRNA) の発現解析を利用し、miR-34c が EMT を抑制することを発見した (Morizane et al. Scientific Reports 2014)。また、本研究で解析を進める miR-363 が EMT を促進することも発見している。そこで、さらに高効率の尿細管細胞分化誘導方法を確立するために、尿細管再生と EMT という2つの観点からマスター遺伝子を探索するために以下の研究を立案した。

(1) TF-inducible ES 細胞バンクを用いた尿細管細胞の分化誘導方法の確立

我々は、腎臓の尿細管において特異的に発現している Kidney specific protein (KSP) 陽性細胞を分化マーカーとして ES 細胞の腎尿細管細胞への分化誘導方法を研究してきた。特に、マウス ES 細胞においては、Activin/Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) が KSP の発現を促進し、さらに独自に開発した抗 KSP モノクローナル抗体を用いて KSP 陽性細胞を純化することで管腔構造をもった尿細管細胞の誘導に成功した (Morizane et al., BBRC 2009, PlosOne 2013)。しかし、我々の誘導方法では、胚様体を用いた確率的な分化誘導であり、分化効率の面で問題がある。

一方、連携研究者の洪らは、転写調節因子を自在に誘導できる TF-inducible ES 細胞バンクを作製した。この細胞バンクは、マウス及びヒトの特定の転写調節因子を発現誘導できる ES 細胞からなるものである。すでに200以上の転写因子について作成できており、今回の研究に用いるに十分な規模であるが、将来的には、すべての転写調節因子網羅することを目指している。ある1つの転写調節因子を発現させた時の ES 細胞の遺伝子発現を既知の Microarray データと *in silico* で比較することで、各臓器の分化において鍵となるマスター制御因子を絞り込むことができ

る (Correa-Cerro et al., Scientific Reports 2011)。さらに洪らは、各転写調節因子をコードした合成 mRNA を細胞に添加することで ES 細胞を分化させる技術を整備している。そこで、申請者はこれまでの一貫した ES 細胞に対する手法をもとに腎尿細管発生におけるマスター制御因子を TF-inducible ES 細胞バンクでの解析から同定し、合成 mRNA を用いてリプログラミングを行うという新たな研究テーマの発想に至った。特に、合成 mRNA を用いてリプログラミングを行うということは、複数の因子を同時に投与することが可能であり、ES 細胞のみならず、線維芽細胞から尿細管細胞ないしネフロン前駆細胞にあたる後腎間葉細胞へのダイレクトリプログラミングが可能になるという点できわめて重要である。

(2) 腎尿細管 EMT に関与する miRNA の解析

従来、尿細管の EMT は間質の線維化に重要と考えられ、多くの研究がなされてきた。一方で、尿細管の再生時には尿細管細胞自身が増殖し、一旦 EMT をおこすことによって、再生が促進されていることが報告された (Hendry et al. JASN 2013)。したがって、EMT そのものも再生現象に関わる可能性があり、EMT 関連因子は尿細管分化誘導系に加えるべき因子の候補となると考えられる。我々はこれまでの研究活動において、尿細管細胞の EMT に関与する miRNA を見出すため、*in vitro* では TGF- β を用いた EMT モデル、*in vivo* ではマウスの片側尿管閉塞 (UUO) による EMT モデル、およびマウス ES 細胞を用いた腎尿細管上皮細胞への上皮化モデルを用いて、マイクロアレイ解析からいくつかの新たな miRNA を同定した。その中で、miR-34c が尿細管細胞での Notch シグナルの活性化を抑制し、マウス UUO モデルにおいて腎臓の線維化の進行を抑制することを見出している (Morizane et al. Scientific Reports 2014)。

また同時に、我々が行ったヒト尿細管細胞株を用いたマイクロアレイ解析からは、miR-363 が尿細管細胞の EMT を促進することが示唆されていた。そこで今回我々は、miR-363 による尿細管細胞の EMT のメカニズムを解析し、さらに、miR-34c、miR-363 の標的遺伝子の解析を行うことで、CKD 進行抑制のための新たな因子だけでなく、ダイレクトリプログラミングでの知見と合わせて尿細管分化誘導系に有用な因子を発見できると考えた。

2. 研究の目的

我々は、ES 細胞から尿細管細胞への高効率分化誘導法の確立を目指し、以下の戦略で研究を行う。転写調節因子を自在に誘導できる ES 細胞バンク (TF-inducible ES 細胞バンク) の *in silico* スクリーニングで尿細管細胞分化のためのマスター転写調節因子を同定する。同定した転写調節因子の合成 mRNA を用いて

腎尿細管細胞の高効率分化誘導法を確立する。一方、尿細管再生時に上皮間葉細胞形質転換 (EMT) が認められ、EMT が尿細管再生時に必要である事が指摘されている。我々は、EMT に関わる miR-363 と miR-34c を発見している。まだ解析が進んでいない miR-363 の解析を行うとともに、miR-34c と miR-363 のターゲット遺伝子解析から、EMT にかかわるマスター制御因子を同定し、合成 mRNA を用いて尿細管細胞への分化誘導に応用可能かを検証する。

3. 研究の方法

(1) TF-inducible ES 細胞バンクの *in silico* スクリーニングで、尿細管への分化を促す転写調節因子を同定する。(2)(1) で同定した転写調節因子の合成 mRNA を ES 細胞に加える (時には複数の転写調節因子の mRNA) ことで、尿細管細胞への分化誘導を短期間で効率的に行う。(3) 抗 KSP 抗体を用いて、KSP 陽性細胞を純化して、尿細管へと分化誘導を行う。

4. 研究成果

(1) TF-inducible ES 細胞バンクを用いた尿細管細胞の分化誘導方法の確立

連携研究者の慶應義塾大学医学部システム医学教室 洪教授らの作成した網羅的転写因子遺伝子解析データから、腎臓前駆細胞への分化を促進すると考えられる転写因子を 14 個、ネフロン上皮細胞への分化を促進すると考えられる転写因子を 17 個同定することができた。腎臓前駆細胞への分化を促進すると考えられた 14 個の転写因子のうち、SIX2 + SALL1 + となる最適な組み合わせを qPCR 及び免疫染色、Flow cytometry を用いて検証したところ、4 つの転写因子 A, B, C, D を同時に導入することで、誘導開始後わずか 2 日間で 92% と高効率に SIX2 + SALL1 + ネフロン前駆細胞を誘導することができた。

次に、ネフロン前駆細胞からネフロン上皮細胞への分化を促進するため、*in silico* 解析で得られた候補転写因子 17 個を、合成 mRNA として上記で得られた SIX2 + SALL1 + のネフロン前駆細胞に過剰発現させた。低接着 dish にて 3 次元培養を行った結果、E, F, G, H の 4 因子を導入すると 14 日間で最も効率良く PODXL 陽性足細胞、LTL 陽性近位尿細管、CDH1 陽性遠位尿細管からなるネフロン様構造を誘導できる事が分かった。

この方法で作成された腎臓前駆細胞ならびに腎臓オルガノイドは、腎臓の再生医療への応用が期待されるだけでなく、腎疾患モデリングの新たなプラットフォームとして利用でき、CKD の新たな治療法の開発に役立つと考えられる。現在、本研究成果は、論文投稿中である。

将来的には、本分化誘導方法を用いて線維化細胞を直接リプログラミングできれば、大きなインパクトがあると考えられる。

(2) 腎尿細管 EMT に関与する miRNA の解析

ヒト尿細管細胞株 (HKC-8) を用いたマイクロアレイ解析から、miR-363 が HKC-8 において EMT を促進することを見いだした。miR-363 を HKC-8 細胞に過剰発現すると、間葉系細胞の性質を獲得し、上皮系細胞の性質を失うことが確認できた。さらに、スクラッチアッセイにおいて、miR-363 はヒト尿細管細胞の遊走を促進することが明らかになった。miR-363 の下流には TWIST/canonical WNT pathway が存在し、IWR-1 による canonical WNT の抑制が miR-363 による EMT の誘導を弱めることから、miR-363 によるヒト尿細管細胞における EMT の誘導は、TWIST/canonical WNT pathway の発現上昇を介していると考えられた。この結果を、Clinical Experimental Nephrology 誌に報告した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Yamaguchi S, Morizane R, Homma K, Monkawa T, Suzuki S, Fujii S, Koda M, Hiratsuka K, Yamashita M, Yoshida T, Wakino S, Hayashi K, Sasaki J, Hori S, Itoh H. Generation of kidney tubular organoids from human pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 2016;6:38353. doi: 10.1038/srep38353. 査読あり
2. Morizane R, Fujii S, Monkawa T, Hiratsuka K, Yamaguchi S, Homma K, Itoh H. miR-363 induces transdifferentiation of human kidney tubular cells to mesenchymal phenotype. *Clin Exp Nephrol.* 2016;20(3):394-401. doi: 10.1007/s10157-015-1167-2. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1. Ken Hiratsuka, Toshiaki Monkawa, Shintaro Yamaguchi, Ryuji Morizane, Shigeru B. Ko, Hiroshi Itoh, Minoru S. Ko. Multi-Segmented Kidney Organoids Derived from Human ES Cells by Stepwise Transcription Factor Administration, *Kidney Week*, 2017
2. Ken Hiratsuka, Toshiaki Monkawa, Shintaro Yamaguchi, Ryuji Morizane, Shigeru B.H. Ko, Hiroshi Itoh, Minoru S.H. Ko: A novel method to differentiate human ES cells into renal tubule-like cells by a combination of transcription factors administration, *Kidney Week*, 2016
3. Ken Hiratsuka, Toshiaki Monkawa, Shintaro Yamaguchi, Ryuji Morizane, Shigeru B.h. Ko, Minoru S.h. Ko, Hiroshi Itoh: The direct differentiation method of renal tubular cells by synthetic mRNAs of transcription factors identified

from TF-inducible human ES bank,
Kidney Week, 2015

6 . 研究組織

(1)研究代表者

門川 俊明 (Monkawa, Toshiaki)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・教授

研究者番号 : 80286484

(2)連携研究者

洪 実 (Ko, Minoru)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・教授

研究者番号 : 50631199