様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　２ 月 １８ 日現在

機関番号：１７４０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ１９４９４

研究課題名（和文）ヒト腎臓ネフロン前駆細胞の多能性維持機構解明による増幅培養法の確立

研究課題名（英文）Propagation of human iPS-derived nephron progenitors in vitro

研究代表者
谷川　俊祐（Tanigawa, Shusnuke）

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：１０７２６３１８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：人体の主要臓器である腎臓は再生しないが発生期には腎臓を造り上げる前駆細胞が存在している。しかし、それらはネフロン（糸球体や尿細管からなる主要機能単位）を構成する細胞へと分化し生後には消失する。このことが腎臓が再生できない理由の一つと考えられる。近年、ヒトiPS細胞からネフロン前駆細胞の誘導が可能になり、再生医療への応用が期待されている。本研究により分化能を維持したヒトiPS細胞由来ネフロン前駆細胞を高純度で増幅し、凍結保存も可能になった。これにより、iPS細胞からネフロン前駆細胞へ誘導する時間を大幅に短縮した研究材料として提供が可能になり、腎臓再生医療の基盤となることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ヒトの腎臓再生には大量の細胞数の確保が必要である。糸球体と尿細管の3次元構造を形成する分化能を維持したネフロン前駆細胞を大幅に増幅させる培養法を確立できれば、この問題を解決することができる。さらに凍結保存が可能になれば、ネフロン前駆細胞をヒトiPS細胞から約２週間かけて増幅する時間を大幅に短縮し、腎臓再生や発生の研究者への提供が可能となる。これらは、ネフロン前駆細胞からポドサイトの大量調整等により、透析に代わる治療法の開発や、患者由来iPSによる疾患モデル研究の創出など、腎臓再生医療の基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：During development, nephron progenitor forming one million nephrons, a functional unit in the kidney. Nephron consists of glomeruli and renal tubules play a critical role to maintain homeostasis. However, nephron progenitor ceases after birth in mice, and before birth in human when they terminally differentiated to the nephron. Thus, no new nephron formed in adult kidney, which may explain the irreversible nature of diseased kidney. Our lab established the method for induction of nephron progenitors from human iPS cells. In order to propagate the human nephron progenitors, we generated iPS cell lines that express GFP in the SIX2 locus by TALEN and then purified SIX2-positive population from iPS-derived tissues by FACS. Isolated SIX2-positive cells were propagated and maintained robust capacity for nephron formation both in vitro and in vivo. The expanded cells also maintained their nephron-forming potential after freezing. Thus, our methods will be useful for regenerative medicine.

研究分野：発生生物学

キーワード：腎臓　ネフロン前駆細胞　糸球体　尿細管　SIX2　iPS　オルガノイド　ネフロン

１．研究開始当初の背景

生命の維持に必須の器官である腎臓は一度機能を失うとほぼ再生しない。発生期にはネフロンを造り上げる転写因子 SIX2 陽性のネフロン前駆細胞が存在している。しかしそれらはネフロンを構成する細胞に分化し、出生前後には消失してしまう。このことが腎臓が再生できない理由の一つとされている。当研究室によってヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞の誘導が可能になり、そこから 3 次元のネフロン組織を再構築できるようになった (Taguchi et al., Cell Stem Cell, 2014, 2017)。これにより再生医療への応用や創薬、病態メカニズムの解明が期待されるが、そのためには大量の細胞数の確保と、誘導した細胞を一定期間維持できる培養系が必要である。我々は低濃度の LIF に WNT, FGF 及び BMP を敢えて低い濃度で組み合わせることによって、マウスの胎仔から単離した Six2 陽性のネフロン前駆細胞を試験管内で 90%以上の純度および分化能を維持した状態で増幅することに成功している が(Tanigawa et al., Cell Rep, 2016)、ヒト iPS 細胞由来のネフロン前駆細胞ではまだ確立できていなかった。

２．研究の目的

ヒト iPS 由来のネフロン前駆細胞の増幅培養法を確立し、ネフロンへの分化能を維持した増幅培養法を確立することで腎臓再生医療の基盤構築を目指す。

３．研究の方法

ヒト iPS 細胞から誘導したネフロン前駆細胞の多能性を維持した自己複製法および長期増幅培養法の確立を目的としている。これまでのラットおよびマウスのネフロン前駆細胞の培養法確立によって得られた種に共通の培養条件をヒトのネフロン前駆細胞に応用し、分化能を維持するメカニズムを解析することで培養法の改善を行う。

① <u>ヒト iPS 由来ネフロン前駆細胞の増幅培養法の確立</u>

協力研究者である西中村隆一教授よりネフロン前駆細胞マーカーである SIX2 陽性の細胞が GFP を発現するヒト iPS 細胞の供与を受ける。これにより SIX2-GFP 陽性の細胞を FACS により単離し、純化したヒトネフロン前駆細胞の増幅培養条件を検索する。

② <u>ヒト iPS 由来ネフロン前駆細胞の継代培養法及び凍結保存法の確立</u>

ネフロン前駆細胞の長期培養において、細胞の継代には細胞剥離法の最適化が肝要であるため、細胞剥離液や組織分散液の検索、処理条件の条件検討を行い、最適化する。凍結保存法は、市販の幹細胞凍結保存試薬や iPS 細胞及びヒト ES 細胞で実績のあるガラス化法など広範囲に検討することで手法を確立する。

４．研究成果

① SIX2-GFP iPS 細胞によるネフロン前駆細胞の純化

ヒト iPS 細胞から誘導したネフロン前駆細胞培養法を確立するために TALEN を用いた相同組み換えによって *SIX2* の遺伝子座に GFP をノックインしたヒト iPS 細胞(以下 SIX2-GFP iPS)を作成した。さらに以前に報告した、ITGA8 陽性(以下 ITGA8+)かつ PDGFRA 陰性(以下 PDGFRA-)の画分によるネフロン前駆細胞の単離方法を、SIX2-GFP iPS から誘導したネフロン前駆細胞に適用することで、ITGA8+かつ PDGFRA-の分画の細胞に SIX2-GFP 陽性及び陰性の細胞が存在することが判明した。さらにネフロン前駆細胞マーカーである *SIX2*, *MEOX1* 及び *HOXA11* が ITGA8+PDGFRA-SIX2-GFP+（I+/P-/SIX2-GFP+）I+/P-/SIX2-GFP+に I+/P-/SIX2-GFP-画分に比べ有意に高く発現していることが分かった。これらの画分を FACS で単離し、胎仔由来脊髄と組みあわせネフロン分化能を検証したところ、I+/P-/SIX2-GFP+の細胞が I+/P-/SIX2-GFP-画分に比べ有意にネフロン構造を再構築することを見出した。以降、この I+/P-/SIX2-GFP+画分（以降ネフロン前駆細胞）の細胞をネフロン前駆細胞とし、増幅培養の条件検討に用いた。

② Activin はネフロン前駆細胞を高率に維持し増幅を促進する。

このネフロン前駆細胞（I+/P-/SIX2-GFP+画分）の増幅を検討した結果、これまでマウスのネフロン前駆細胞の増幅に用いてきた Fgf9, CHIR99021 (Wnt), LIF, DAPT と BMP7 を含む培養条件では不十分であることが判明した。そこで、培養条件を再検証した結果、Tgfβ ファミリー（ActivinA, GDF11, Tgfβ1 及び Tgfβ2）の因子が分化能を維持しながら SIX2+のヒトネフロン前駆細胞を高純度で増幅することを突き止めた。実際にはこれまで用いた培養条件中の BMP7 を Tgfβ ファミリーに入れ替えたものである（Fgf9, CHIR99021 (Wnt), LIF, DAPT と上記 Tgfβ ファミリー因子の一つ）。

Tgfβ ファミリーの中でも activin が最も高純度でネフロン前駆細胞を 7 日間で約 5 倍に増幅し、増幅したネフロン前駆細胞は試験管内で高効率にネフロンに分化した。従来の BMP7 の条件と比較してもネフロン前駆細胞の維持率、増幅率及びネフロン形成率において activin の条件がすべて優位に促進した。Activin で増幅したネフロン前駆細胞の遺伝子発現プロファイルを RNA-seq により解析した結果、ネフロン前駆細胞マーカー(*SIX2*, *SALL1*, *EYA1*, *CITED1*, *PAX2*, *WT1*, *MEOX1*, 及び *ITGA8*)は培養前と同等の発現値を示し、ヒト胎児ネフロン前駆細胞（胎生 16 週、Lindstrom et al., J Am Soc Nephrol, 2018）の解析によって得られたヒト特異的なネフロン前駆細胞マーカー(*LYPD1*, *TMEM100*, *WASF3*, *UNC5B*, 及び *PHF19*)も維持した。これに対し、

BMP7 で増幅した細胞は、ネフロン前駆細胞マーカー(*SIX2* 及び *MEOX1*)が減少し、分化マーカー(*LHX1, CDH1, HNF1B, JAG1, GATA3,* 及び *EMX2*)が上昇した。以上より Activin はネフロン前駆細胞を高率に維持しつつ増幅を促進し、高効率にネフロンを形成する能力を有することが明らかとなった。これまでネフロン前駆細胞の維持には BMP7 が有用であることがこの分野の共通認識であったが、acivin はより優位にヒト iPS 由来のネフロン前駆細胞の増幅に有用であることを初めて示すものである。

③ ヒト iPS 細胞由来のネフロン前駆細胞の凍結保存法開発。

再生医療への応用には大量の細胞が必要である。しかし、ヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞の誘導に約 2 週間の時間を要し、我々の activin による増幅（7 日）を含めると約 20 日の時間がかかる。技術的にも熟練を必要とするため、増幅後のネフロン前駆細胞を凍結保存する方法は時間と労力の削減が期待できる。我々は研究計画通りに、activin によるネフロン前駆細胞の増幅条件を得た後、凍結保存法を検討した。結果、増幅後のネフロン前駆細胞は、市販の幹細胞保存試薬及び典型的な血清と DMSO の混合液においても融解後にネフロン形成能を維持していることを確認した。再生医療への応用を踏まえ、市販の xeno フリーの保存液を適用することとした。最近、我々は先天性ネフローゼ症候群の患者から iPS 細胞を樹立し、病態の初期状態を再現した(Tanigawa et al., Stem Cell Reports, 2018)。その間、誘導した糸球体のポドサイト上に後のスリット膜を形成するスリット膜前駆体が患者由来の糸球体には見られないことが判明した。本研究において Activin によって増幅したネフロン前駆細胞はこのスリット膜前駆体の形成能を有し、凍結融解後もそれを維持していることを確認している。下記、GFP に依存しないネフロン前駆細胞の増幅法と組み合わせれば、患者由来の iPS 細胞をネフロン前駆細胞に誘導後、Activin を含む培養条件で増幅し、凍結保存することにより、時間を大幅に短縮した研究材料として提供が可能になり、腎臓再生医療の基盤となることが期待できる

④ Activin により増幅したネフロン前駆細胞は移植後も高率にネフロンを形成する

Activin で増幅したネフロン前駆細胞（I+/P-/SIX2-GFP+画分）を免疫不全マウスの腎皮膜下に移植すると従来の誘導したネフロン前駆細胞を FACS 単離せずにそのまま移植する方法に比べ高効率でネフロンを形成し、ホストの血管と繋がることを確認した。

⑤ GFP に依存しない iPS 由来ネフロン前駆細胞の増幅法開発

これまでの SIX2-GFP iPS を用いた知見を、健常者から作成した iPS 細胞のネフロン前駆細胞に適用した結果、activin によって効率に SIX2 陽性のネフロン前駆細胞（ITGA8+PDGFRA-）を増幅し、免疫不全マウスの腎皮膜下に移植後もネフロン組織が Bmp7 の条件にくらべ有意に形成されることを確認した。このことにより、GFP 遺伝子を iPS 細胞に挿入せずともネフロン前駆細胞を増幅でき、患者由来 iPS を用いた病態再現の研究に応用が可能であることが示唆された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2 件）

1. <u>Tanigawa S</u>, Islam M, Sharmin S, Naganuma H, Yoshimura Y, Haque F, Era T, Nakazato H, Nakanishi K, Sakuma T, Yamamoto T, Kurihara H, Taguchi A, and Nishinakamura R. Organoids from nephrotic disease-derived iPSCs identify impaired NEPHRIN localization and slit diaphragm formation in kidney podocytes. **Stem Cell Reports** 11(3): 727–740, 2018.
2. <u>Tanigawa S</u>, Naganuma H, Kaku Y, Era T, Sakuma T, Yamamoto T, Kurihara H, Taguchi A, and Nishinakamura R. Activin is superior to BMP7 for efficient maintenance of human iPSC-derived nephron progenitors. **Stem Cell Reports** 13(2):322-337, 2019.

〔学会発表〕（計 9 件）

国際会議

1. <u>Tanigawa S</u>, Kaku Y, Naganuma H, Taguchi A and Nishinakamura R. Maintenance and Propagation of Human Nephron Progenitors In Vitro. Key Forum: The 3rd international symposium on stem cell traits and developmental systems. 2017.1.12 熊本（ポスター発表）
2. <u>Tanigawa S</u>, Kaku Y, Naganuma H, Taguchi A and Nishinakamura R. Propagation of human

iPSC-derived nephron progenitors in vitro.
ISSCR 2018 Annual Meeting, Melbourne, Australia. 20-23 June, 2018（ポスター発表）

3. Tanigawa S, Kaku K, Naganuma H, Taguchi A and Nishinakamura R. Maintenance and propagation of human nephron progenitors in vitro. KEY forum 2018" Stem Cell Traits and Developmental Systems", Kumamoto, Japan. 2018.01.11（ポスター発表）
4. Tanigawa S, Kaku K, Naganuma H, Taguchi A and Nishinakamura R. Propagation of human iPSC-derived nephron progenitors in vitro. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 018. Melbourne, Australia.　2018.06.22（ポスター発表）
5. Tanigawa S, Taguchi A and Nishinakamura R. Expansion of human iPS-derived nephron progenitors and modeling nephrotic disease. The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences. Fukuoka, Japan. 2018.09.18（ポスター発表、ベストポスター賞）

国内会議

6. **谷川俊祐、賀来祐介、太口敦博、西中村隆一　３次元組織形成能を持つヒト** iPS **由来腎臓ネフロン前駆細胞の増幅培養法の確立　生命科学系学会合同年次大会** ConBio 2017　**神戸（口頭発表、ポスター発表）**2017.12.8
7. **谷川俊祐、西中村隆一 ヒト** iPS **細胞由来ネフロン前駆細胞の増幅培養法の確立と病態再現への応用 第** 61 **回日本腎臓学会学術総会 新潟　シンポジウム「腎臓再生医療の進捗と課題」（口頭発表）**2018.06.10
8. **谷川俊祐、**Mazharul Islam**、長沼英和、江良拓実、仲里仁史、中西浩一、栗原秀剛、太口敦博、西中村隆一 ネフローゼ患者由来** iPS **細胞から作成した腎オルガノイドはネフリン局在化と糸球体スリット膜形成の病態を再現する　第** 27 **回発達腎研究会　名古屋（口頭発表）**2018.09.15
9. **谷川俊祐、西中村隆一 ヒト** iPS **細胞由来ネフロン前駆細胞の増幅培養法の確立と病態再現への応用 第** 41 **回分子生物学会　横浜（口頭発表及びポスター発表）**2018.11.28-11.29
10. **谷川俊祐、西中村隆一　患者由来** iPS **細胞による先天性ネフローゼ症候群の病態再現 第** 62 **回日本腎臓学会学術総会 名古屋　シンポジウム「腎疾患に対する** iPS **細胞の実践的活動用に向けた挑戦」（口頭発表）**　2019. 06.23
11.

〔図書〕（計 1 **件）**
1. **谷川俊祐、西中村隆一.「患者由来iPS細胞による先天性腎疾患の病態再現」、発達腎研究会,** 2019. Vol.27:18-23

〔産業財産権〕
○出願状況（計　　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計　　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/np98/
http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/np102/

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：
研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：西中村　隆一
ローマ字氏名：Nishinakamura Ryuichi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。