

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20131

研究課題名（和文）ヒト及びカニクイザル多能性幹細胞を用いた腎尿路再生の研究

研究課題名（英文）Regeneration of kidney and urinary tract using human and cynomolgus monkey pluripotent stem cells

研究代表者

小林 憲市 (Kenichi, Kobayashi)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40727434

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：カニクイザルES細胞を腎臓組織に分化させるための研究を行った。まず、レポーター遺伝子を挿入したカニクイザルES細胞を樹立し、腎臓への分化段階を可視化できるようにした。その細胞を用いて腎臓への分化実験を行ったところ、マウスに用いられたプロトコルよりもヒト多能性幹細胞で用いられたプロトコルの方が、腎臓への分化傾向が強かった。

しかし、サルES細胞はヒト多能性幹細胞より不安定であったため、分化誘導をかける前に無秩序な分化を制御する必要があった。そこで、分化前の維持培養下において多能性を維持していない不要な細胞を排除できる新規ES細胞を樹立し、論文として報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの多能性幹細胞を用いた臓器再生の研究は日進月歩で、近い将来に腎機能を持つ腎臓オルガノイドが開発されることが期待されているが、臨床応用のためには、作製された腎臓オルガノイドに交通を持つ尿路、血管をいかに構築し、どこにどのように移植するかという課題を解決しなければならない。カニクイザルはヒトに最も近い実験動物モデルであり、臨床前試験に理想的な実験モデルとなりうる。

我々の研究成果は多能性幹細胞を用いた腎再生の過程において臨床前試験という重要な段階で大きな役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cynomolgus monkey ES (Cyn ES) cells can be generated in a similar manner as human ES cells. However, Cyn ES cells are difficult to maintain in an undifferentiated state by untrained researchers. For easier culture, we generated an OCT3/4-P2A tdTomato IRES ZeocinR Cyn ES cell line using CRISPR/Cas9 genome editing technology. The stop codon of the endogenous OCT3/4 locus was replaced with the P2A tdTomato IRES ZeocinR pA cassette by homologous recombination. This cell line enables us to isolate pluripotent stem cells and exclude differentiated cells by addition of zeocin, especially for culture without feeder cells.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎臓 多能性幹細胞 カニクイザル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

末期腎不全患者は世界的に増加の一途をたどり、本邦においても維持透析患者総数は30万人を超えている。維持透析治療は、年間450万円/1名かかると概算され、医療費を大きく逼迫する要因となっている。

腎は機能的にも構造的に複雑で、出生後、再生することはないため、多能性幹細胞を用いた腎再生研究は、まだ挑戦的な段階であるにもかかわらず、大きな注目を集めていた。ヒトiPS細胞を用いれば、原理上は自分の細胞から臓器を再生できるため、移植に伴う拒絶反応の危険性や、倫理的な問題は極めて小さく、全世界普遍的に通用する手法になりうるためである。

2014年から2015年にかけて、腎の最小単位であるネフロンを多能性幹細胞を分化したとの報告が相次いだ。さらに同年の2014年には滲出型加齢黄斑変性の患者に、患者自身のiPS細胞由来の網膜色素上皮(RPE)細胞のシートを移植する手術が行われ、腎尿路の再生がいよいよ実現味を帯びてきた時期であった。

一方で治療に応用できる機能をもった腎臓を再生するために、は大量のネフロンを作製する手法の確立し、ネフロンと交通を持つ尿路、血管をいかに構築し、どこにどのように移植するかという課題を解決しなければならなかった。

### 2. 研究の目的

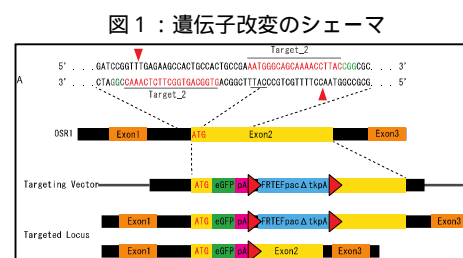
治療に応用できる機能をもった腎臓を再生するために、多能性幹細胞を用いた腎再生の研究を、特に、ネフロンの分化効率の上昇、再生腎への血管新生、動物モデルでの移植実験プロトコル構築の3点に焦点をあて、研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) カニクイザル ES 細胞により腎分化誘導

##### a) OSR1-eGFP ES 細胞の樹立(図1)

腎臓は中間中胚葉に分化した細胞から作製される。腎文化の初期段階にあたる中間中胚葉に分化した細胞で発現する OSR1 遺伝子にレポーター遺伝子を挿入し、腎臓系へ分化を可視化できる細胞を樹立した。

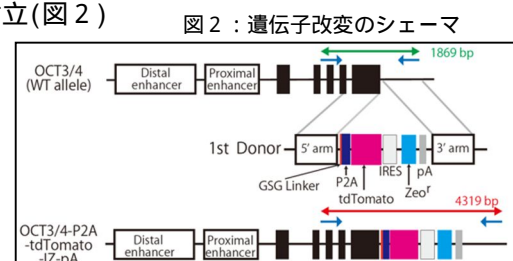


##### b) カニクイザル ES 細胞とヒト iPS 細胞・マウス ES 細胞との比較

(a) で作製した細胞を、既出の方法で分化誘導を行った場合のヒト iPS 細胞・マウス ES 細胞との差異を比較する。さらにより適したプロトコルを採用し、分化誘導にタイムスケジュール、分化誘導因子の投与量調整を行った。

#### (2) カニクイザル ES 細胞の未分化性を維持する細胞の樹立(図2)

フィーダー細胞フリーの条件下にて分化誘導を行うと、カニクイザル ES 細胞が多能性を維持できず、分化誘導を制御するのが困難であることがわかった。そこで、まず多能性を維持しやすく維持培養が容易なカニクイザル ES 細胞を樹立し、多能性マーカーである OCT3/4 にレポーター遺伝子と薬剤選抜カセットを挿入した新規の ES 細胞を樹立し、野生型 ES 細胞との比較を行った。



#### 4. 研究成果

(1) カニクイザル ES(Cyn ES)細胞はマウス ES 細胞よりヒト iPS 細胞で報告されたプロトコルの方が、分化状況に応じた遺伝子発現を示すことがわかった(図3)。

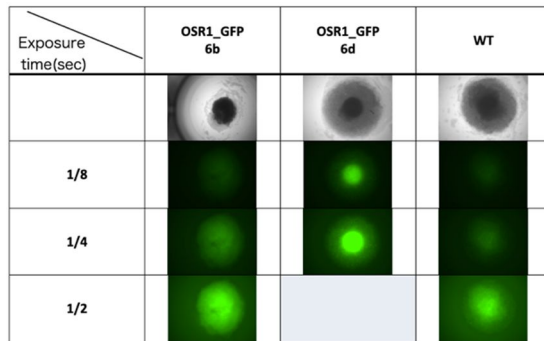


図3：分化過程での GFP 発現の比較。ヒトプロトコル(6d)の GFP の発現が高い。

次に、ヒト iPS 細胞のプロトコルを基に、分化誘導に必要な分化誘導因子 CHIR99021 の投与量調整を行う実験を開始した。カニクイザル ES 細胞は安定な状態で増殖能を維持するため、培養時に Wnt/beta-catenin 阻害剤を使用していたため、Wnt シグナル活性を増強するために CHIR99021 の濃度を調整する必要があると考えたためである。その結果、ヒト iPS 細胞の至適濃度  $6 \mu\text{M}$  より高濃度の  $10\text{-}12 \mu\text{M}$  がより制御された分化を示した。

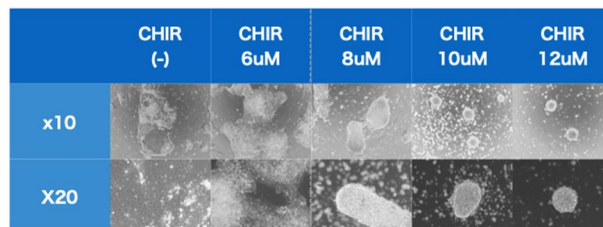


図4：CHIR の濃度別の分化初期(Day4)。  
 $10\text{-}12 \mu\text{M}$  がより制御された分化を示した。

しかし、フィーダー細胞フリーの条件下にて分化誘導を行うと、カニクイザル ES 細胞が多能性を維持できず、分化誘導を制御するのが困難であることがわかった(図5)。

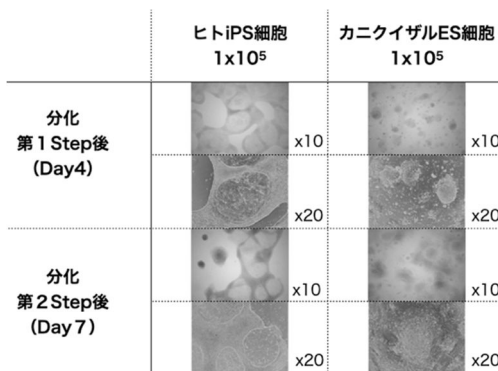
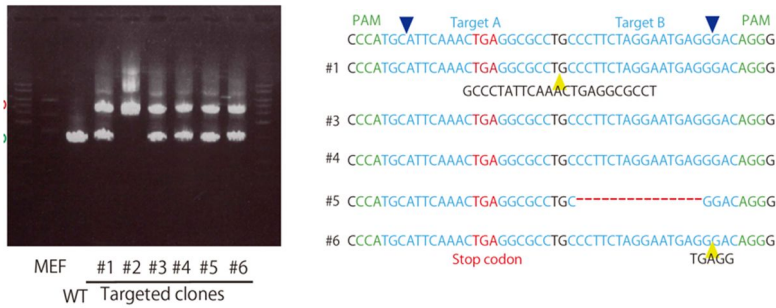


図5：カニクイザル ES 細胞はヒト iPS とは異なり  
制御された文化を示さない

そこで、カニクイザルの多能性幹細胞を分化誘導するため、維持培養が容易で、多能性を維持出来る OCT3/4 遺伝子に tdTomato レポーターと Zeocin 耐性カセットを挿入したカニクイザル ES 細胞の樹立を行った。

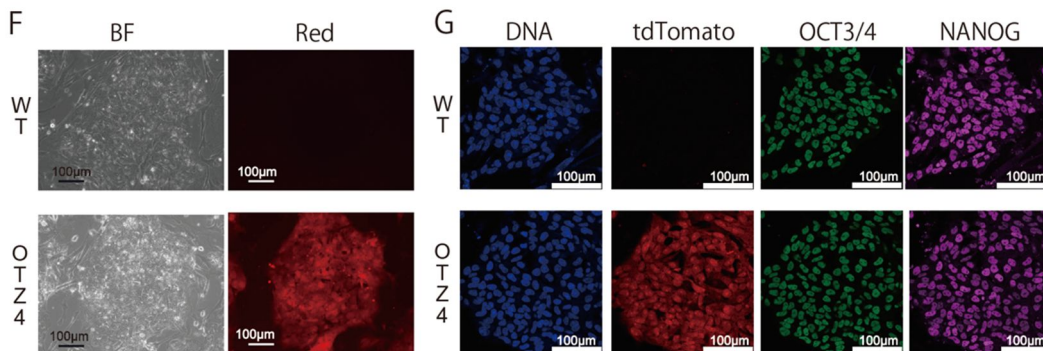
(2)レポーターカセットの組み込まれたプラスミドと、ガイド RNA を含む Cas9nickase 発現プラスミドを同時にトランスフェクションし、zeocin 耐性を確認した6つのクローンを pick up し、スクリーニングを行なった。うち#2は homo ノックインのため、#1と#5は野生型アレルへの indel mutationのため、#3は目的外の配列の挿入のため除外され、適切なカセット挿入が確認された#4のクローンを OTZ4と命名した。(図6)

図 6 : スクリーニング PCR と、野生型アレルのシーケンス結果



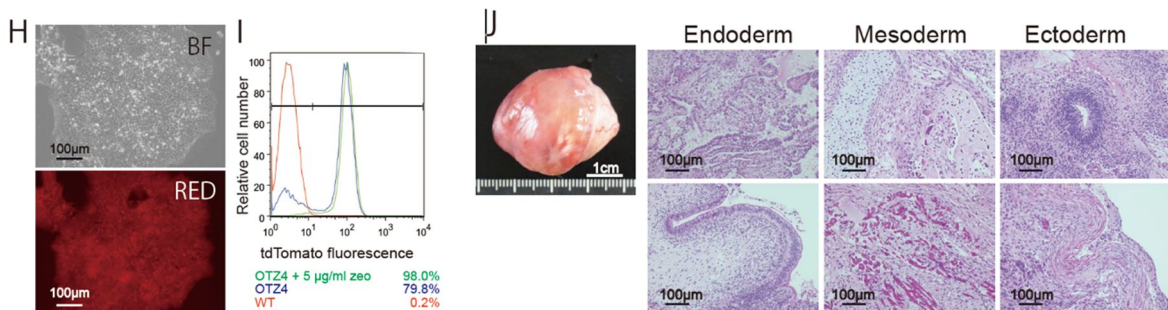
ゲノム編集した OTZ4 も野生型 ES 細胞とほぼ同等なコロニーを形成し、挿入された tdTomato レポーターによって赤色の蛍光を示すことを確認した(図 7 左)。また、赤色蛍光と、免疫染色による tdTomato のシグナルと OCT3/4 タンパクの発現が overlap することを確認した(図 7 右)。

図 7 : 野生型と OTZ4 の比較



この細胞はフィーダー-Free でも細胞なしでも維持培養可能で、培地に Zeocin を添加することで Feeder なしでも綺麗なコロニーを形成し、蛍光レポーターにて OCT が発現している細胞によってコロニーが形成されていることが確認できた(図 8 右)。フローサイトメトリーにおいて、Zeocin を添加した培地で OTZ4 を培養した場合、ほとんどの細胞が OCT3/4 の発現を維持できていることが確認できた(図 8 中)。最後に OTZ4 が 3 胚葉分化能を維持できているかを確認するために免疫不全マウスの精巣に移植し、9 週間後に摘出し組織学的確認を行いました。精巣は 3 杯葉をもつ奇形腫に置換されており、この細胞が 3 胚葉分化能を持つことが確認できた(図 8 右)。

図 8 : フィーダー細胞なしの培養 / 3 胚葉分化能の確認



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi K, Tsukiyama T, Nakaya M, Kageyama S, Tomita K, Murai R, Yoshida T, Narita M, Kawauchi A, Ema M.	4. 巻 Epub
2. 論文標題 Generation of an OCT3/4 reporter cynomolgus monkey ES cell line using CRISPR/Cas9.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem cell research	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2019.101439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----