

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591038

研究課題名（和文） 尿細管再生機構の解明と ES 細胞、iPS 細胞から尿細管細胞への分化誘導の試み

研究課題名（英文） Mechanism of regeneration of renal tubular cells and differentiation from ES and iPS cells to renal tubular cells.

研究代表者

門川 俊明 (MONKAWA TOSHIAKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80286484

研究成果の概要（和文）：近位尿細管 S3 セグメントは傷害に最も弱い、一方で、再生能が高い。S3 セグメント特異的なプロモーターGsl5 を用いヒト型ジフテリア毒素受容体を S3 セグメント特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成した。このマウスにジフテリア毒素を投与すると、用量依存的に S3 セグメント特異的な障害を起こすことが出来、臨床的な急性腎障害のモデルとなることが示せた。

次に、我々は ES、iPS 細胞から、尿細管上皮細胞への分化誘導方法を検討した。マウス ES、iPS 細胞において、Activin は上皮マーカーKSP-Cadherin の発現を促進した。Ksp-Cadherin の細胞外ドメインを抗原として、モノクローナル抗体を作製し、本抗体を用い、Flow Cytometry によって、陽性細胞を分取した。KSP 陽性分画では、KSP の発現が高く、Matrigel 上で、尿細管様の管状構造を形成した。以上より、ES 細胞から、高率に尿細管上皮細胞を分化誘導する方法が確立できた。

研究成果の概要（英文）：The S3 segment of the kidney proximal tubule is highly susceptible to ischemia insults but has a remarkable capacity to repair its structure and function. By applying the "toxin receptor mediated cell knockout" method under the control of the S3 segment-specific promoter Gsl5, we established a transgenic mouse line expressing the human diphtheria toxin (DT) receptor only in the S3 segment. The administration of DT to these transgenic mice caused the selective ablation of S3 segment cells in a dose-dependent manner. These results indicate that this transgenic mouse can suffer acute kidney injury (AKI) caused by S3 segment-specific damage after DT administration. This transgenic line offers an excellent model to uncover the mechanisms of AKI and its rapid recovery.

We tried to establish differentiation method of ES cells and iPS cells into renal tubular cells. In ES cells, Activin enhanced the differentiation of ES cells to tubular cells, judging by expression of Ksp-Cadherin, the epithelial marker. Activin also enhanced the differentiation of iPS cells to tubular cells, although the enhancement was lower than in ES cells. We generated monoclonal antibody against the extracellular domain of Ksp-Cadherin. Flow cytometry using the antibody purified the Ksp-positive cells, which formed tubular structure on Matrigel. We established the differentiation method of ES and iPS cells into renal tubular cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓、尿細管、再生医学、ES細胞、iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)尿細管再生に重要な近位尿細管 S3 セグメントの解析

腎臓の再生は、腎臓組織の複雑性から難しいと考えられている。しかし、急性尿細管壊死など特定の状況においては、再生現象が観察され、そのような特定のモデルを集中的に解析することで、腎臓の再生の分子メカニズムを明らかにすることができると考えられる。これまでに、我々は Leukemia Inhibitory factor (LIF)が虚血再灌流モデルにおいて近位尿細管 S3 セグメントに強発現し、尿細管再生を促進していること(J Am Soc Nephrol, 2003)を報告した。尿細管再生において、この近位尿細管 S3 セグメントが注目されている。それは、虚血後の尿細管細胞の再生は近位尿細管 S3 セグメントで盛んであることに加え、近年、幹細胞の候補といえる Label Retaining Cell が近位尿細管 S3 セグメントに存在することが前嶋ら(J Am Soc Nephrol, 2003)により報告されたこと、近位尿細管 S3 セグメントより尿細管前駆細胞の細胞株が樹立されたこと(Kitamura S, FASEB J, 2005)による。

東京都臨床医学総合研究所疾患モデル開発センター米川博通博士らは Core 2 -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase のプロモーターである Gsl5 が、腎臓の近位尿細管 S3 セグメントに特異的なプロモーターであることを発見した(J Biol Chem, 2006)。この Gsl5 をプロモーターとしたトランスジェニックマウスが、S3セグメントにおける尿細管再生の解析をするための強力なツールとなると考えられた。

(2)ES細胞とiPS細胞からの尿細管細胞の分化誘導

ES細胞は、着床前胚の内部細胞塊に由来し、生体のあらゆる細胞に分化する可能性(多能性)ほぼ無限に増殖するという高い増殖能力を持つ。マウスで初めてES細胞の樹立に成功し、その後、ヒトES細胞株も樹立された。ドナー不足が深刻な移植医療の切り札と考えられている。さらに、近年、山中らが樹立したiPS細胞は、皮膚から採取した線維芽細胞にOCT3/4・SOX2・KLF4・C-MYCの4遺伝子を導入することによって、ES細胞と同様の多能性を獲得した細胞である。ES細胞で問題となる、免疫拒絶の問題、倫理性の問題を回避できることから、ES細胞と同様、移植の切り札となると考えられている。しかし、現時点においてはES細胞やiPS細胞

から腎臓を構成する細胞への効率のよい分化誘導方法は確立していない。

2. 研究の目的

(1)尿細管再生に重要な近位尿細管 S3 セグメントの解析

Gsl5の下流にEGFPをつないだトランスジェニックマウスを持つGsl5-EGFPトランスジェニックマウス、ヒト型ジフテリア毒素受容体HB-EGFをつないだGsl5-HB-EGFトランスジェニックマウスの解析をおこなう。Gsl5-EGFPマウスはS3セグメントがGFPにより特異的にラベルされたマウスである。Gsl5-HB-EGFマウスは任意のタイミングでジフテリア毒素を投与することによってS3セグメントの細胞のみを除去することができるマウスである。両マウスは近位尿細管S3セグメント解析の強力なツールである。これらのマウスを用いて近位尿細管S3セグメント細胞の単離と解析、虚血再灌流時の挙動を調べる、S3セグメント特異的な細胞の除去がどのような影響を与えるかを調べることを通して、S3セグメントに与えられた、再生能を明らかにする。

(2)ES細胞とiPS細胞からの尿細管細胞の分化誘導

前項のS3セグメントの解析で得られた知見を有機的に結びつけることによってES細胞とiPS細胞から効率のよい尿細管細胞の分化誘導方法を確立する。まずは、マウスES細胞、iPS細胞を用いた、尿細管細胞への分化誘導を確立し、その後、ヒトES細胞、iPS細胞での研究を行う。

3. 研究の方法

(1)尿細管再生に重要な近位尿細管 S3 セグメントの解析

東京都臨床医学総合研究所疾患モデル開発センター米川博通博士、関根美知子博士が作製したGsl5-EGFPマウスとGsl5-HB-EGFマウスの解析を共同で行った。

Gsl5-EGFPを用いた研究

Gsl5にEGFPをつないだトランスジェニックマウスを持つGsl5-EGFPマウスでは、近位尿細管S3セグメントに特異的なEGFPの発現を認める。まず、Gsl5-EGFPマウスの腎臓からGFP蛍光を指標にS3セグメント尿細管細胞をFACSにより単離を試みた。単離したS3セグメント細胞の遺伝子発現プロファイルを解析することで、特異的に発現している遺伝子を同定

をこころみだ。また、前嶋らによって BrdU 標識が長期間残存するという幹細胞特有の性質を持つ Label Retaining Cell (LRC) が S3 セグメントに存在していることが指摘されていることから、S3 セグメント細胞をさらに、LRC と non-LRC に FACS で分離 (抗 BrdU 抗体で標識することで可能) することを試みた。LRC と non-LRC の発現プロファイルと比較することにより、LRC の解析を行い、その単離方法の確立を目指した。

Gs15 HB-EGF を用いた研究

マウスは本来ジフテリア毒素に感受性を持たないが、ヒト型ジフテリア毒素受容体である HB-EGF 遺伝子を外来性に発現させると、その細胞はジフテリア毒素に対し感受性となり、細胞死にいたる (TRECK 法)。Gs15 に HB-EGF をつないだトランスジーンを持つ Gs15 HB-EGF マウスでは、ジフテリア毒素の投与により、近位尿細管 S3 セグメント特異的に障害を起こすことができる。

まず、本マウスに対し、ジフテリア毒素の投与を様々な濃度で行い、血液検査、尿検査、組織検査を経時的におこなった。それにより、S3 セグメントだけに選択的に傷害を与えた場合、どのような病態を呈するのか、虚血再灌流による病態などと比較することで、S3 セグメントの急性尿細管壊死における役割を検討した。

(2)ES 細胞と iPS 細胞からの尿細管細胞の分化誘導

現時点で、効率よく ES 細胞から腎臓尿細管細胞へ分化誘導する方法は確立していないので、マウス ES 細胞を用いて、その方法の確立を目指した。理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター丹羽仁史博士より分与を受けたマウス ES 細胞株 EB3 (未分化状態においてのみ動作するプロモーター Oct-3/4 の制御下に薬剤耐性遺伝子を導入したマウス ES 細胞で、プラスチジン S 存在下で未分化 ES 細胞のみが選択される) から胚様体 (EB) を形成させ、その後、2 週間程度培養を続けた際の、詳細な遺伝子プロファイルの作成をおこなった。その結果から、Ksp-Cadherin が尿細管への分化の指標として重要であることを見出した。Ksp-Cadherin を指標とすることで、より効率的に尿細管細胞へ分化する培養条件、成長因子などの分化誘導条件を決定した。Ksp-Cadherin 陽性細胞を純化するために、Ksp-Cadherin の細胞外ドメインを抗原としたモノクローナル抗体を作成した。本抗体を用いて、Flow Cytometry をおこなった。

マウス ES 細胞での結果をもとに、マウス iPS 細胞を用いた分化誘導も検討した。

4. 研究成果

(1)尿細管再生に重要な近位尿細管 S3 セグメントの解析

Gs15 にヒト型ジフテリア毒素受容体 HB-EGF をつないだトランスジーンを持つ Gs15-EGFP マウスに対し、様々な容量のジフテリア毒素 (DT) を投与した。用量依存的に S3 セグメント特異的な障害を起こすことが出来た。DT 投与後、BUN の上昇が見られ、DT 投与 3-7 日目にピークが見られた。組織学的には最も強い障害は、近位尿細管 S3 セグメントに認められ、尿細管上皮細胞が尿細管腔に脱落している像が見られた。S3 セグメント特異的な障害のみでも、臨床的な急性腎障害がおこることが明らかとなり、S3 セグメントの重要性が明らかとなった。これまで、毒物や虚血障害による急性腎障害では、S3 セグメントが主に障害されているという報告は多数あるが、毒物や虚血の場合、S3 セグメント以外のセグメントや間質などにも障害が存在し、このように遺伝子操作マウスを用いて S3 セグメントにきわめて限定した障害を与えて、臨床的な急性腎障害を再現できたのは初めてのことである。本研究成果を Transgenic Research 誌に報告した。

Gs15 に EGFP をつないだトランスジーンを持つ Gs15-EGFP マウスでは、近位尿細管 S3 セグメントに特異的な EGFP の発現を認めた。Gs15-EGFP マウスの腎臓から GFP 蛍光を指標に S3 セグメント尿細管細胞を FACS により単離することを目標に条件検討をおこなったが、EGFP の発光が弱く単離ができなかった。

(2)ES 細胞と iPS 細胞からの尿細管細胞の分化誘導

マウス ES 細胞と iPS 細胞から腎臓の尿細管細胞への分化誘導方法の検討をおこなった。マウス ES 細胞に腎臓の発生に関与する誘導因子である GDNF、BMP7、Activin の 3 種類を組み合わせることで、Ksp-Cadherin をマーカーとして尿細管細胞への分化誘導を検討した。GDNF と BMP7 が後腎間葉細胞の細胞増殖および維持に関係し、Activin は KSP-Cadherin の発現を促進しており、腎臓の発生においても後腎間葉の上皮化を促進することが明らかとなった。一方、マウス iPS 細胞においても同様の傾向を認めしたが、iPS では、ES 細胞に比して、分化しにくいという結果が得られた。以上の研究成果は、Biochem Biophys Res Commun 誌に発表した。

しかし、効率のよい ES 細胞の場合であっても、Activin のみの誘導では、Ksp-Cadherin 陽性細胞の比率は、FACS において、5% 以下であった。そこで、Ksp-Cadherin 陽性細胞を純化する必要があり、そのためには質の高い Ksp-Cadherin モノクローナル抗体を作製し、

FACSによって、純化する必要があると考えた。Ksp-Cadherinの細胞外ドメインを抗原として、モノクローナル抗体を作製した。本抗体を用い、Flow Cytometryによって、陽性細胞を分取することが出来た。

Ksp-Cadherin陽性分画は約1.5%であり、陰性分画とKsp-Cadherinの発現量をPCRで比較したところ、陽性分画で有意に発現が高値であり、陽性細胞が純化されている事が確認された。遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイで行ったところ、陽性細胞では陰性細胞と比較して有意に腎・泌尿器系の発生に関する遺伝子が高発現であった。

尿細管管腔構造をin vitroで再現するために、マトリックスや培地を検討し、Becton Dickinson社のMatrigelと低血清培地が、尿細管様の管状構造の形成を促進することがわかった。この管状構造は電子顕微鏡で観察した結果、内腔を形成している事がと分かり、尿細管細胞に類似した微繊毛も観察されin vitroで尿細管管腔構造が再現できている事を示した。以上より、世界で初めて、ES細胞から、高率に尿細管上皮細胞を分化誘導する方法が確立できた(特許申請済み、特許申請番号:特願2011-209792、論文投稿準備中)。分化誘導後の分化状態の維持、細胞の増殖方法などに課題はあるが、本研究成果により、ヒトES、iPS細胞への応用、疾患モデルiPS細胞作製への道が大きく広がった。

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3件)

1. Sekine M, Monkawa T, Morizane R, Matsuoka K, Taya C, Akita Y, Joh K, Itoh H, Hayashi M, Kikkawa Y, Kohno K, Suzuki A, Yonekawa H. Selective depletion of mouse kidney proximal straight tubule cells causes acute kidney injury. *Transgenic Res.* 21:51-62, 2012. 査読有り
2. Yamaguchi S, Yamahara K, Homma K, Suzuki S, Fujii S, Morizane R, Monkawa T, Matsuzaki Y, Kangawa K, Itoh H: The role of microRNA-145 in human embryonic stem cell differentiation into vascular cells. *Atherosclerosis*, 219: 468-474, 2011. 査読有り
3. Morizane R, Monkawa T, Itoh H. Differentiation of murine embryonic stem and induced pluripotent stem cells to renal lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390:1334-1339. (Monkawa T is the corresponding author in this paper),

査読有り

[学会発表](計4件)

1. Morizane R, Monkawa T, Itoh H : Purification of differentiated tubular cells from mouse embryonic stem cells using flow cytometry: 第44回米国腎臓学会(米国フィラデルフィア): 2011年11月10日
2. 森實隆司、門川俊明、山口慎太郎、伊藤裕: 尿細管細胞の上皮間葉移行に関するmiRNAの検討(miRNA involved with epithelial-mesenchymal transition of renal tubular cell): 第54回日本腎臓学会学術総会: 日本、横浜: 2011年6月17日
3. Morizane R, Monkawa T, Itoh H : Activin enhances differentiation of mouse ES cell to tubule cell: 第42回米国腎臓学会: 米国サンディエゴ: 2009年10月31日
4. 森實隆司、門川俊明、西崇彦、伊藤裕: マウスES細胞を用いた腎構成細胞への分化誘導(Differentiation to renal cell lineage from mouse ES cell): 第52回日本腎臓学会学術総会: 日本、横浜: 2009年6月3日

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 抗KSPマウスモノクローナル抗体を用いた、胚性幹細胞からin vitroでの腎構成細胞の誘導方法の開発

発明者: 森實隆司、門川俊明、伊藤裕

権利者: 慶應義塾大学

種類: 特願

番号: 2011-209792

出願年月日: 2011/09/26

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

なし

[その他]なし

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・講師

研究者番号: 80286484

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし