

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591184

研究課題名(和文) ヒト腎臓由来 iPS 細胞の細胞記憶を利用した新規細胞移植療法の開発

研究課題名(英文) New cell therapy for kidney disease using human kidney derived iPS cells

研究代表者

吉川 真弘 (Yoshikawa, Masahiro)

東京大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：20447410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに、マウスモデルにおける腎臓組織幹細胞移植による腎機能の改善を報告し、ヒト腎における腎臓組織幹細胞の存在について確認した。しかし、ヒト腎臓から得られる組織肝細胞は極めて少量で、臨床応用は不可能である。一方、ヒト iPS 細胞の樹立により、患者本人の細胞から大量幹細胞が得られるようになり、iPS 細胞から腎臓組織幹細胞を分化誘導できれば、新しい治療法開発が可能である。最近 iPS 細胞には樹立元の細胞記憶を残していることが報告され、本研究ではヒト腎臓由来 iPS 細胞から効率良く腎臓組織幹細胞を分化誘導し、これを移植することにより、全く新しい腎不全に対する細胞移植療法の開発を開発した。

研究成果の概要(英文)：Human pluripotent cells are promising for treatment for kidney diseases, but the protocols for derivation of kidney cell types are still controversial. In this study, we tried to establish new cell therapy for kidney disease by using human kidney derived iPS cells. We induced kidney lineage cells from iPS cells and confirmed improvement of kidney function by using the cells.

研究分野：再生医学

キーワード：iPS 細胞 腎臓

1. 研究開始当初の背景

原疾患の違いによらず、慢性腎不全は不可逆的な病態であり、末期には腎代替療法が不可避となる。腎移植が現在における唯一の根治療法であるが、本邦ではドナー不足により十分に施行されておらず、大多数の患者が生涯に渡って透析療法を余儀なくされる。患者の肉体的精神的苦痛に加え、医療費も高額であり、腎移植に替わる根治療法の開発が切望されている。我々はマウス腎から分離した、転写因子 MyoR 陽性の腎臓組織幹細胞を移植することで、腎不全モデルマウスの腎機能が改善することを報告し、腎臓組織幹細胞移植が有望な腎不全治療法であることを示した (J Cell Biol. 169:921-8, 2005)。更に同様の腎臓組織幹細胞はヒトにおいても存在し、健常腎のみならず腎機能低下例や蛋白尿陽性例においても分離可能であることを報告した (Int J Urol. 15:272-4, 2008)。しかしながらヒトにおいて、腎臓組織幹細胞は非常に少量しか存在せず、ヒトの腎機能回復を実現する十分な細胞を確保することは不可能である。一方、申請者は文部科学省再生医療の実現化プロジェクト-東京大学 iPS 拠点事業において患者組織から得られた細胞を用い、疾患特異的 iPS 細胞を樹立しており、これまでの経験から腎生検で得られる組織から iPS 細胞の樹立が十分可能であるとの結果を得ている。ヒト iPS 細胞は、ES 細胞と同等の増殖能や多能性分化能を有するとされ、更に受精卵の破壊による倫理的問題や移植における拒絶反応も生じないため、患者自身の細胞を用いた臓器再生、移植療法の実現の可能性が一気に高まった。しかし、実際に iPS 細胞がヒト ES 細胞とどこまで同じ性質を持つかは未だ明らかにされておらず、gene profile だけでなく、ヒストン修飾や DNA のメチル化などの epigenome にも多くの違いがある可能性が報告されている (Cell Stem Cell. 5:111-123, 2009, Nature Biotechnology. 27:353-360, 2009)。そして最近、マウス iPS 細胞における epigenetic memory に関する報告が、2 件同時に発表された。その内、Daley らの報告では、iPS 細胞が ES 細胞に比べて、樹立元細胞に近い gene profile や epigenome を保持し、更に他の iPS 細胞と比べ、樹立元の細胞へと分化しやすいことを示した (Nature. 467:285-90, 2010)。この結果は外来遺伝子導入による iPS 細胞の reprogramming が不完全であることを示す一方で、臓器再生の観点から見れば、特定の組織構成細胞へと分化しやすい iPS 細胞を樹立できる可能性を示唆している。すなわち腎臓構成細胞から誘導した iPS 細胞は、腎臓の epigenetic memory を有し、他の細胞由来の iPS 細胞よりも腎臓組織幹細胞を含む、腎臓構成細胞に分化しやすい可能性が高い。実際に我々は既に連携研究者である東京大学油谷教授

との共同研究で、ヒト腎上皮細胞由来の iPS 細胞 (hR-iPS 細胞) が、ヒト fibroblast 由来の iPS 細胞に比べ、腎分化マーカー遺伝子が発現しやすいことを見出している。

2. 研究の目的

今回の研究では、腎臓細胞由来の iPS 細胞を含めて、各 iPS 細胞の epigenetic memory を決定する遺伝子群を決定する為、DNA メチル化の包括的な解析 (Infinium beadarray system) を行う。特に、線維芽細胞由来 iPS 細胞と腎臓細胞由来 iPS 細胞を比較することにより、腎方向への分化誘導を制御する遺伝子群を同定する。一方、Daley (Nature. 2010) らは、iPS 細胞にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤等の epigenetics 制御薬を作用させることで、目的細胞へ効率よく分化誘導できることを報告している。そこで本研究では、第 2 に、epigenetics 制御薬を腎臓由来 iPS 細胞の細胞記憶を決定する遺伝子へ作用させることにより、腎臓組織幹細胞への効率良い分化誘導をめざす。我々は、これまでヒト近位尿細管細胞における TGF- β 1 誘導性の EMT および apoptosis が、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 TSA の作用によって抑制されることを報告しており (Journal of American Society of Nephrology 18:58-65, 2007, European Journal of Pharmacology 642:28-36, 2010)、epigenetics 制御薬に関するアッセイ系を確立している。また、我々は腎臓組織肝細胞が MyoR 陽性であることを報告しており (J Cell Biol. 169:921-8, 2005)、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤および DNA メチル化酵素阻害薬等をヒト腎臓由来 iPS 細胞へ作用させ、MyoR 陽性細胞を FACS で純化して分離することで、腎不全に対する新しい細胞移植療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

新たなヒト腎臓由来 iPS 細胞を樹立し、epigenetics 制御薬による腎臓組織幹細胞への分化誘導を試みる

□ ヒトメサンギウム細胞から iPS 細胞の樹立を行う。必要なプラスミドベクターおよびプロトコルは、連携研究者である東京大学中内研究室から既に提供済みである。

1, 培養ヒトメサンギウム細胞に、プラスミドベクターを用いて、Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 遺伝子を導入する。

2, 遺伝子導入の 1 週間後に感染細胞を feeder 細胞上に播種し、iPS 培養用 medium で培養を行う。

3, 出現しはじめた iPS 細胞のコロニー器械的に pick up し、新たな feeder 細胞上で培養し増殖させる。

□ ヒト fibroblast 由来 iPS 細胞、既にヒト腎臓上皮から樹立した iPS 細胞 (hR-iPS 細胞) 及び今回樹立したヒトメサンギウム細胞由来 iPS

細胞と、各々の樹立元細胞からDNAを抽出し、連携研究である東京大学油谷研究室で HumanMethylation27_BeasChipを用いた包括的DNAメチル化解析(Infinium beadarray system)を行う。

上記にて樹立したヒトメサンギウム由来の iPS 細胞、ヒト腎上皮細胞由来の hR-iPS 細胞、およびヒト fibroblast 由来 iPS 細胞を用い、胚葉体形成法による分化誘導を行い、経時的に細胞を回収し、包括的 DNA メチル化解析を行う。□で得られたメチル化プロファイルとクラスター解析を行い、樹立基の腎臓細胞のメチル化プロファイルと最も近いクラスターが得られる培養日数を決定する。

と同じ細胞に対して、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である TSA、脱メチル化剤 5-Aza-dc を作用させ、異なる濃度や処理時間により、樹立基の腎臓細胞のメチル化プロファイルと最も近いクラスターが得られる条件を決定する。

最適化した条件(胚葉体形成法 + epigenetics 制御薬処理)でヒト腎臓由来 iPS 細胞を培養し、FACS により腎臓組織幹細胞を分離する。

□まず組織幹細胞をいわゆる side population(SP)細胞として分離し、その後 MyoR 陽性の細胞 2 段階で分離する。

1. 杯葉体を collagenase 処理し、FACS 解析に支障無いように cell strainer (Falcon 2350, Becton Dickinson)を通して、夾雑物を除く。

2. 細胞浮遊液の細胞濃度を 1×10^6 cells/ml に調整し、Hoechst33342 濃度を $5 \mu\text{g/ml}$ とし、37度で60分間処理する。

3. FACS Aria を用いて、青および赤の二色に展開し SP 細胞の解析および sorting を行う。SP 細胞は verapamil や reserpine 処理にて FACS プロファイルが消失することから単なる低染色細胞と区別されるが、negative control として Hoechst33342 と同時に 50mM の reserpine で同時処理したものを FACS 解析して、SP 細胞で有る事の確認実験を毎回行う。

4. 3 で得られた細胞を MyoR 抗体で染色し、SP+ MyoR+ 分画を FACS Arias で sorting する。

5. 4 の細胞を固定し、BCRP1 抗体 (SP 細胞の確認) MyoR 抗体で染色し、腎臓組織幹細胞であることを確認する。

6. 5 で細胞が最大数の細胞が得られるように、FACS sorting 条件の適正化を行う

SCID マウス用いた腎不全モデルを作成し、腎臓組織幹細胞移植により腎機能改善効果を検証する。

上記で純化し得た各ヒト腎臓組織幹細胞を、免疫不全マウス腎不全モデルに移植する。

腎臓への生着や腎機能の改善の度合を血液データ、組織染色に評価する。ドナー細胞をレシピエントと区別するため、必要に応じて、

PKH26 蛍光色素等を用いて、ドナー細胞に染色ラベルを行っておく。

細胞移植の安全性を検討する為、病理学的に奇形腫や悪性腫瘍形成の有無を検討する。

4. 研究成果

1. 新たなヒト腎臓由来 iPS 細胞を樹立に成功し、epigenetics 制御薬による腎臓組織幹細胞への分化誘導を確立した。

2. FACS による、腎臓組織幹細胞の効率良い分離法を確立した。

3. 腎不全マウスに FACS 分離により純化した腎臓組織幹細胞を移植することにより、障機能の部分的回復を確認した。

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)

Basic helix-loop-helix transcriptional factor MyoR regulates BMP-7 in acute kidney injury. Kamiura N, Hirahashi J, Matsuzaki Y, Idei M, Takase O, Fujita T, Takato T, Hishikawa K. Am J Physiol Renal Physiol. 2013 May 1;304(9):F1159-66.

Immunomodulation with eicosapentaenoic acid supports the treatment of autoimmune small-vessel vasculitis.' Hirahashi J, Kawahata K, Arita M, Iwamoto R, Hishikawa K, Honda M, Hamasaki Y, Tanaka M, Okubo K, Kurosawa M, Takase O, Nakakuki M, Saiga K, Suzuki K, Kawachi S, Tojo A, Seki G, Marumo T, Hayashi M, Fujita I. Sci Rep. 2014 Sep 18;4:6406.

[学会発表](計10件)

第13回日本再生医療学会総会 2014年3月4日(火)~6日(木)(国立京都国際会館)

「腎上皮細胞由来 iPS 細胞と線維芽細胞由来 iPS 細胞の比較による腎系統特異的分化誘導法の検討」3月4日(火)

高瀬 敦、出射 真奈、宮本 寛治、吉川 真弘、高戸 毅、菱川 慶一

第14回日本抗加齢医学会総会(大阪国際会議場)2014年6月6日(金)~8日(日)

「Epigenetic Memory を利用した腎上皮細胞
由来 iPS 細胞の腎系統特異的分化誘導法の試
み」高瀬 敦、出射 真奈、高戸 毅、南
学 正臣、菱川 慶一

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)
内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川真弘 (YOSHIKAWA, Masahiro)
東京大学医学部附属病院・特任研究員
研究者番号: 20447410

(2) 研究分担者

菱川慶一 (HISHIKAWA, Keiichi)
東京大学・大学院医学研究科・特任准教授
研究者番号: 50255460

(3) 連携研究者

藤田敏郎 (FUJITA, Toshiro)
東京大学・先端研・特任教授
研究者番号: 10114125

油谷浩幸 (ABRATANI, Hiroyuki)
東京大学・先端研・教授
研究者番号: 10202657