

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790953
 研究課題名（和文） ヒト ES・iPS 内皮細胞誘導技術を用いた新規 CKD 病態メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Clarification of new pathological mechanisms for chronic kidney disease using technology that induces endothelial cells from human ES/iPS cells
 研究代表者
 本間 康一郎 (HOMMA KOICHIRO)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：10383762

研究成果の概要（和文）：CKD の発症および進展機序を解明するために、CKD の病態に重要な役割を担っている腎糸球体内皮細胞、腎尿細管細胞に着目した。私たちは、内皮細胞への誘導法は確立しているため、尿細管細胞への分化誘導法の確立を目指した。誘導法は内皮細胞誘導法と同様に、GSK3 β を用いた。KSP を指標としたところ、約 5% 程度の KSP 陽性細胞を誘導することが出来た。今後は、KSP 陽性細胞の解析を進め、内皮細胞との共培養などを行い、CKD の発症および進展機序の解明に繋げたい。

研究成果の概要（英文）：To clarify the mechanism by which chronic kidney disease (CKD) occurs and progresses, we focused on renal glomerular endothelial cells and renal tubular cells, which play an important role in CKD pathology. As a method for inducing endothelial cells has already been established, we aimed to establish a method for inducing differentiation into renal tubular cells. GSK3 β was used in this method, similar to the method used to induce endothelial cells. Using KSP as a marker, we succeeded in inducing cells, approximately 5% of which were KSP-positive. Next, we would like to analyze KSP-positive cells further and perform co-cultivation with endothelial cells to clarify the mechanisms by which CKD occurs and progresses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：ヒト ES 細胞、慢性腎臓病、内皮細胞、尿細管細胞

1. 研究開始当初の背景
 慢性腎臓病(chronic kidney disease; CKD)
 が脳卒中や心血管病のリスク因子であるこ

とが明らかにされ、今後 CKD 患者が増加し、
 末期腎不全から透析療法を必要とする人口
 が増加することが想像されるが、その発症機

序が解明されたとはいいがたい。CKD においては、腎臓の糸球体につながる輸入細動脈の自動調節障害が蛋白尿や腎機能障害の大きな原因の一つであると考えられている。他、血管内皮細胞依存性の血管拡張反応が障害されていること、骨髄から動員され血中に存在し、内皮障害部位の血管形成に関与している骨髄由来内皮前駆細胞が減少していることも明らかになっている。さらに、CKD 初期の段階ですでに内皮前駆細胞が減少していることがヒトで明らかになっている。我々の生体内 CCD カメラ手技を用いた検討においても、CKD では腎血管のみならず、冠動脈の内皮依存性の拡張反応が低下していることを報告している。これらの結果より、CKD において、全身性に内皮機能障害や障害内皮の新生障害が起こっていることが予想される。一方で、CKD の進行には、最終的には尿細管間質障害が最も重要な要因とされている。以上のように、CKD の発症、進展には、内皮細胞と尿細管細胞が重要な役割を担っている。このために、ヒト ES・iPS 細胞から誘導した内皮細胞および尿細管細胞を用いれば、CKD の病態解明に有用なツールになることが容易に予想される。しかしながら、本研究の開始当初は、内皮細胞への分化誘導法は確立されていたが、尿細管細胞への分化誘導法は確立させていなかった。

2. 研究の目的

CKD の病態メカニズムを解明するためのツールとして使用するために、ヒト ES 細胞から尿細管上皮細胞への分化誘導法を検討した。

3. 研究の方法

我々の報告したヒト ES/iPS 細胞から内皮細胞への分化誘導技術を用いて、腎尿細管細胞

への分化誘導を目指した。具体的には、未分化 ES 細胞をコラーゲン I コート dish に展開し、GSK3 β 阻害薬である BIO を 72 時間作用させ、中胚葉への分化を促進させた。その後、各種増殖因子を添加した低血清培地に置換し上皮化を促進した。尿細管上皮の指標として Kidney-specific protein (KSP) を用いた。KSP はヒトにおいては腎臓にしか発現していないタンパクである。経時的に、腎臓発生関連遺伝子をリアルタイム PCR 法で評価した。KSP に関しては、ウェスタンブロッティング法でも評価した。KSP 抗体を用いた免疫染色も行った。最後に、フローサイトメトリーを用いて KSP 陽性細胞を分取し、マトリゲル上で培養し管腔形成能を評価した。

4. 研究成果

(1) 分化誘導中の腎臓発生関連遺伝子の評価

未分化マーカーである OCT3/4 は低下し、Brachury, Pax2, OSR1 といった中間中胚葉から後腎間葉マーカーの発現が上昇し、その後低下した (図 1)。一方、尿細管上皮のマーカーである KSP や WT-1 は間葉系マーカーが低下した後より上昇した (図 2)。これらの変化は、BIO 非添加群では観察されなかった。

図1: 分化誘導中の腎発生関連遺伝子の変化
—半定量的PCR法による検討—

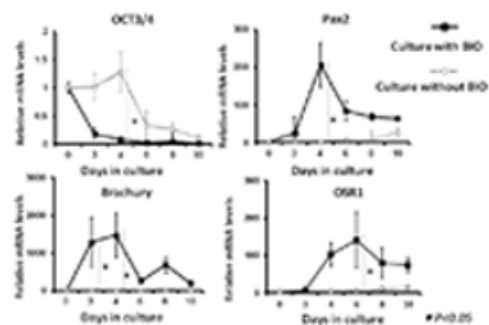
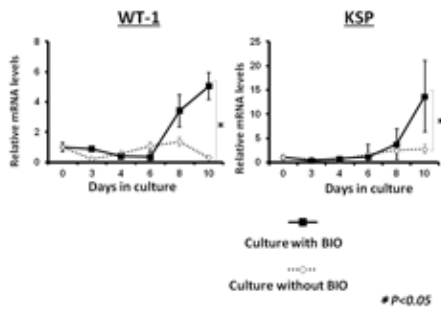


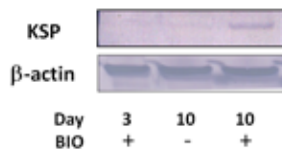
図2; 分化誘導中の腎発生関連遺伝子の変化
— 半定量的PCR法による検討 —



(2) KSP のタンパク発現

ウェスタンブロットで、KSP の発現を確認した(図 3)。

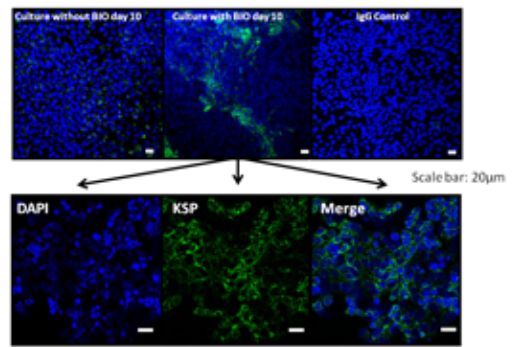
図3; 分化誘導中のKSP発現の
タンパクレベルでの変化



(3) KSP 抗体を用いた免疫染色

誘導 10 日目において KSP の免疫染色を行ったところ、BIO 添加では一部 KSP 陽性の細胞を確認した。強拡大では、細胞膜に沿って網目状に染色されており、KSP の発現部位として矛盾しなかった(図 4)。一方、BIO 非添加では、KSP 陽性細胞は確認できなかった(図 4)。

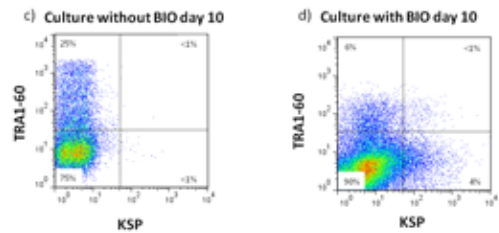
図4; 免疫染色による誘導10日目のKSP発現の評価



(4) フローサイトメトリーを用いた解析

誘導 10 日目の細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、約 4%の KSP 陽性細胞を確認した(図 5)。

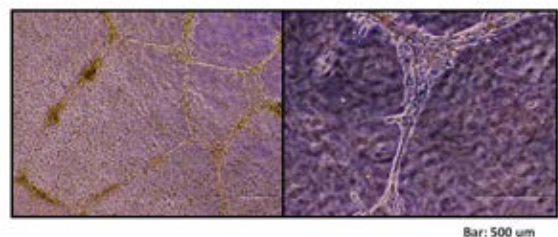
図5 フローサイトメトリーを用いたKSP発現の検討



(5) KSP 陽性細胞の管腔形成能の評価

(4)で分取した KSP 陽性細胞をマトリゲル上で培養したところ、管腔を形成した(図 6)。

図6; KSP陽性細胞は管腔構造を形成する



今後は、本研究で得られた KSP 陽性細胞が、尿細管上皮細胞としての特性を有しているかを詳細に検討し、低酸素などの各種条件下において内皮細胞との共培養などを行うことで連関を検討し、CKD の発症および進展機序の解明につなげたい。

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)

[学会発表] (計 1 件)

ヒト ES 細胞を用いた尿細管上皮細胞の分化誘導の試み

山口慎太郎、本間康一郎、門川俊明、森実隆司、鈴木さゆり、藤井静花、脇野修、林晃一、伊藤裕

第 56 回日本腎臓学会総会 2013 年 5 月 10 日
-12 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 康一郎 (HOMMA KOICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号： 10383762

(2) 研究協力者

山口 慎太郎 (YAMAGUCHI SHINTARO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号： 50464855

鈴木 さゆり (SUZUKI SAYURI)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号： 90445445