

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 9 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890203

研究課題名（和文）腎疾患 iPS 細胞への応用のための腎構成細胞への分化誘導方法の確立

研究課題名（英文）The establishment of the method to induce renal cells for renal disease specific iPS cell research

研究代表者

森實 隆司 (MORIZANE RYUJI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00468505

研究成果の概要（和文）：抗 KSP 抗体による KSP 陽性細胞の純化を介して、胚性幹細胞から *in vitro* で尿細管細胞の分化誘導方法を確立した。ES 細胞由来の KSP 陽性細胞は、網羅的遺伝子解析から、発生段階の腎臓と類似した特性を有している事が示され、3 次元培養で尿細管に類似した管状構造を再現した。この尿細管構造は、Wnt4 によって形成が促進され、KSP 陽性細胞は管状構造を形成する事で、各セグメントの尿細管細胞に分化する事が出来た。

研究成果の概要（英文）：I have established the method to induce renal tubular cells from embryonic stem cells via purification of KSP-positive cells by use of anti-KSP antibody. Global gene expression profiles of KSP-positive cells derived from ES cells showed characteristics of the developing kidney, and KSP-positive cells showed capacities to form tubular structures resembling renal tubular cells via 3D culture. Moreover, Wnt4 enhanced the tubular structure formation of KSP-positive cells, and my results indicated that KSP-positive cells acquired characteristics of each segment of renal tubular cells through tubular formation under the stimulation of Wnt4.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学一般（含心身医学）

キーワード：多能性幹細胞、胚性幹細胞、尿細管細胞、腎臓

1. 研究開始当初の背景

(1) 疾患 iPS 細胞研究は、他分野では積極的に行われるようになってきたが、腎臓においては多能性幹細胞から腎臓への分化誘導方法が確立されていなかったため、腎疾患 iPS 細胞研究は行う事が出来なかった。

(2) 私は、Activin がマウス ES 細胞の陣容再幹細胞への分化を促進する事を見出したが、細胞の純化方法を確立できずにいた。

2. 研究の目的

(1) 多能性幹細胞から尿細管細胞への分化誘導方法を確立する

(2) 多発性嚢胞腎患者由来の腎疾患 iPS 細胞株を樹立する

3. 研究の方法

(1) マウス ES 細胞から尿細管細胞への分化誘導方法を検討する。Activin が尿細管細胞のマーカである KSP の発現を促進するため、

Activinを用いてマウスES細胞を分化誘導した後、尿細管細胞に分化していると考えられるKSP陽性細胞を、独自に作成した抗KSPモノクローナル抗体で純化する。純化した細胞が、尿細管構造を形成するかどうか3次元培養を行い、最適な培養条件を検討する。

また、同時にKSP陽性細胞のキャラクタライズも行う。

(2) ヒトES細胞から尿細管細胞への分化誘導方法を検討する。ヒトとマウスでは分化促進因子が異なる可能性が高いため、マウスで使用した誘導因子以外にもヒトES細胞の既報に基づき誘導因子を検討する。その後、抗KSP抗体による細胞純化から尿細管細胞が分化誘導できるか検討する。

(3) 腎疾患iPS細胞株を樹立する。遺伝性腎疾患で最多である常染色体優性多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞株を樹立する。

4. 研究成果

(1) マウスES細胞から尿細管細胞の*in vitro*での分化誘導方法を確立した。マウスES細胞をActivinに加えて、IGFをさらに添加する事でKSPの発現を促進し、2~14%程度のKSP陽性細胞が得られるようになった。(Fig. 1)このKSP陽性細胞は、マイクロアレイの結果(Fig. 2)から後腎間葉細胞の近い特性を有していると考えられ、Wnt4を用いて3次元培養でさらに分化誘導する事で、尿細管構造を形成し(Fig. 3)、各セグメントの尿細管に分化することが分かった(Fig. 4)。また、このKSP細胞の分化能は、マウス胎仔腎臓への移植実験から、尿細管細胞に分化する事を確認した。(Fig. 5)

(2) ヒトES細胞から尿細管細胞への分化誘導方法の検討。ヒトES細胞では、中胚葉への分化を促進するGSK-3β inhibitorを用いて、分化を行った。マウスで使用した抗KSP抗体で、KSP陽性細胞の純化を行い、3次元培養を行う事で、尿細管構造の再現が見られた。(Fig. 6)

これらの研究成果は、初めて多能性幹細胞から尿細管細胞への分化誘導方法を示したものであり、この方法を応用した腎疾患iPS細胞研究から、疾患の病態解明だけでなく、*in vitro*での薬剤スクリーニングから新たな薬剤の開発へと応用が期待される。

なお、腎疾患iPS細胞株の樹立は、本研究の成果をもとにHarvard大学との共同研究で、すでに樹立済みの常染色体優性多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞を使用できることとなったため、自身での樹立は行わなかった。

Fig. 1 Flow cytometry

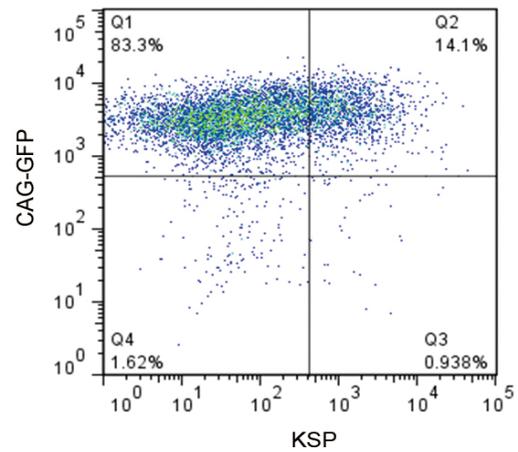


Fig. 2 Microarray (GO: kidney development)

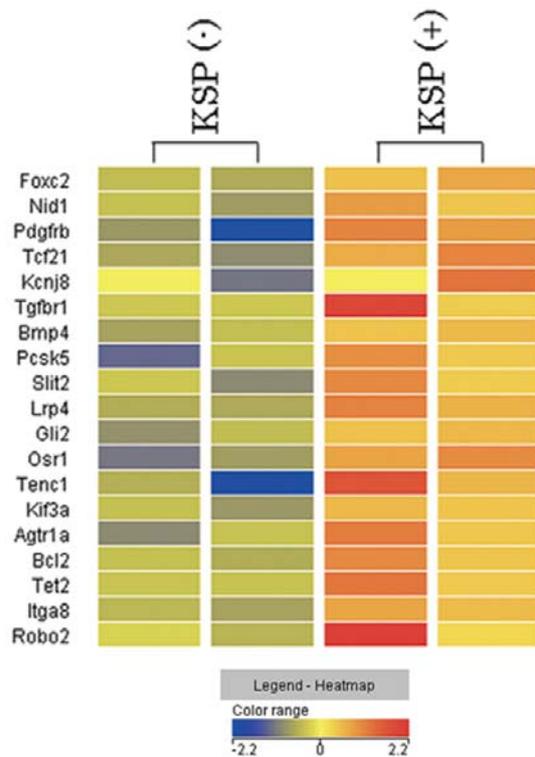
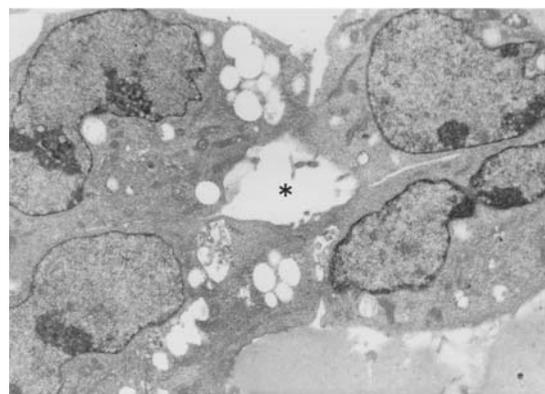


Fig. 3 Electron microscopy



*管腔構造の形成

Fig.4 PCR and immunocytochemistry

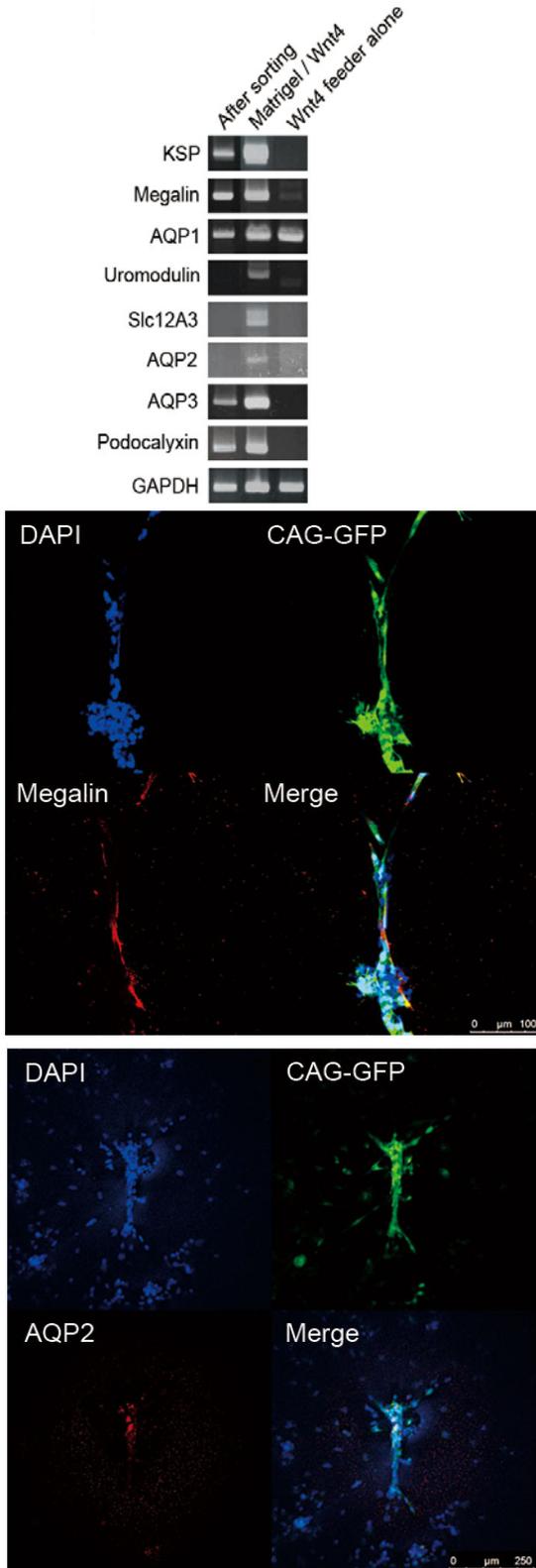
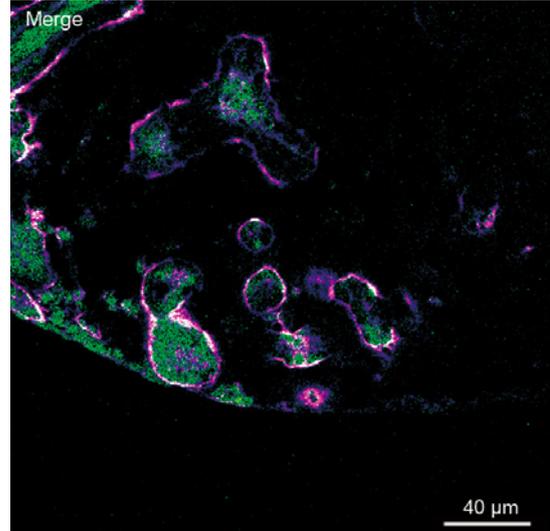


Fig.5 Transplantation

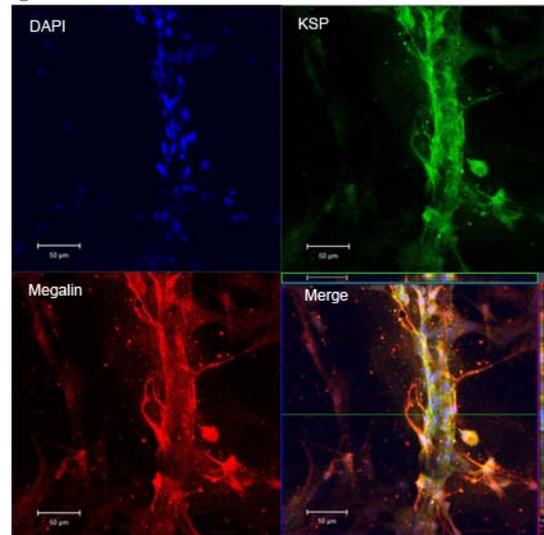


緑：ES 細胞由来

紫：ラミニン

ES 細胞由来の KSP 陽性細胞がマウス胎仔腎臓の尿細管と合併している。

Fig.6 Human ES



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 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

① 著者：森實隆司、門川俊明、伊藤裕 題名：マウス ES 細胞を用いた尿細管細胞の分化誘導 学会名：日本腎臓学会 第 55 回学術総会 日時：2012 年 6 月 1 日 場所：パシフィコ横浜 (神奈川県)

② 著者：Ryuji Morizane, Toshiaki Monkawa, Hiroshi Itoh, 題名：Purification of Differentiated Tubule Cells from Mouse

Embryonic Stem Cells Using Flow Cytometry 学会名：American society of Nephrology' s 44nd Annual Meeting & Scientific Exposition 日時：2011年11月10日 場所：フィラデルフィア（アメリカ）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

- ① 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：PCT/JP2012/74577
出願年月日：2012/09/25
国内外の別：国外
- ② 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）

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森實 隆司 (MORIZANE RYUJI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：00468505