

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860675

研究課題名(和文) 臨床応用を目指したヒトiPS細胞から生体腎細胞への分化誘導法の開発

研究課題名(英文) The development of differentiation method that human induced pluripotency stem cells differentiate into mature renal cells as clinical applications.

研究代表者

井上 達之 (Inoue, Tatsuyuki)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60598564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：無限の増殖能と多分化能を有するiPS細胞(人工多能性幹細胞)から腎発生を模倣した、段階的な生体腎細胞の分化誘導法の開発を行うことを目的とした。しかし腎前駆細胞を安定かつ大量に作製する必要が生じ、腎前駆細胞の高効率な分化誘導法の開発に変更した。低分子化合物によるスクリーニングを行い数種類の化合物を同定した。2次スクリーニングにより3個の化合物をHit化合物として同定した。化合物は用量依存性を、またマウス胎児腎器官培養系に影響を与えている観察結果も得られている。今後これら化合物の詳細な機能解析や得られた腎前駆細胞の解析を行い、高効率な腎前駆細胞分化誘導法の至適化を行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a method for differentiating hiPSCs (induced pluripotency stem cells) into mature renal cells. It became necessary to prepare a renal progenitor cells in large scale and stable, we had to change the aim to the development of efficient method that iPSCs differentiated into renal progenitor cells. We performed high-throughput screening of chemical compounds and identified several compounds. In second screening, we identified 3 compounds as hit compounds. These compounds had a dose-dependency, and affected the mouse embryonic kidney. We are going to analyze the function of these compounds in developing kidney, and also establish the highly efficient differentiation method.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：iPS細胞 腎前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

末期腎不全に対して腎代替療法が行われているが、現況ではそのほとんどを透析療法に依存している。透析患者は毎年約1万人ずつ増加しており、生命予後やQOL低下ばかりではなく高額な費用のため医療経済をひっ迫させる一因となっている。それ故、新規の腎疾患治療法の開発が早急に求められる。

山中らにより我が国で開発されたiPS細胞(人工多能性幹細胞)は無限の増殖能と多分化能を有している(Takahashi K, et al. Cell 2006)。このiPS細胞はES細胞(胚性幹細胞)と比較し、体細胞から作製されるため倫理的問題を回避できる。

腎臓への分化誘導法開発は、国内外においてマウスES細胞を主体に研究されているが、複雑な発生機構や立体構築のために未確立のままである。ヒトiPS細胞を用いた段階的に腎発生機構を模倣する分化誘導法の開発は、再生医療としての細胞移植療法のみならず、疾患モデル作製、新規薬剤の特定細胞への効果または毒性評価などへの応用を通して、今まで不明であった腎疾患の発症進展機序の解明や治療戦略への鍵となることが予想され、画期的なものとなることが期待される。

申請者らの研究室では、腎発生機構を模倣した分化誘導系の構築を行ってきた。これまでにBAC(人工細菌染色体)をターゲッティングベクターとして用いる独自の方法を考案し、中間中胚葉マーカーであるOSR1とネフロン前駆細胞マーカーであるSIX2の遺伝子座、のそれぞれに対し、相同組み換え法にて蛍光蛋白を導入したレポーターヒトiPS細胞株の樹立に成功した。さらに、これらのiPS細胞株を用いて成長因子、低分子化合物を用いたOSR1陽性細胞(Mae SI, et al. Nat commun 2013; Araoka T, et al. PLOS ONE 2014)さらにはSIX2陽性細胞の分化誘導法の開発(Toyohara T, et al. in division)を行ってきた。様々な培養法や成長因子の添加により、約4週間でiPS細胞からSIX2陽性細胞を10-20%の陽性率で分化誘導させることが可能である。さらにこのSIX2陽性細胞がマウス胎児腎との共培養による器官培養にて管腔様構造を形成し、近位尿細管マーカーであるLTL(Lotus tetragonolobus lectin)レクチン陽性細胞に分化することを見出している。

近年、ケミカルバイオロジー領域の発展に伴い、低分子化合物を用いたさまざまな生命現象の制御に関する研究が可能になっている。特に低分子化合物は、一般に生体分子より作用が強く、安定しており、なおかつ安価であるため、ES/iPS細胞の分化誘導において効率的に大量の細胞を得ることが可能である。

2. 研究の目的

無限の増殖能と多分化能を有するiPS細胞(人工多能性幹細胞)は再生医療の要として盛んに研究が行われている。iPS細胞から腎発生機構を模倣した、段階的な増殖因子処理や培養法の組み合わせに加えて、低分子化合物によるスクリーニングを行い高効率な腎近位尿細管細胞と腎糸球体上皮細胞の分化誘導法を開発を行う。

3. 研究の方法

(1)ヒトiPS細胞由来SIX2陽性ネフロン前駆細胞から成長因子ならびに低分子化合物を用いた近位尿細管細胞、糸球体上皮細胞への高効率な分化誘導法の開発

①成長因子の添加及び培養方法(浮遊培養、共培養、3次元培養など)の開発

②High-throughput screening (HTS)系の確立(フローサイトメトリ、イメージアナライザ)

③低分子化合物ライブラリー(約4万種)のスクリーニングによる分化誘導剤の探索

(2)ヒトiPS細胞由来OSR1陽性中間中胚葉細胞から成長因子ならびに低分子化合物を用いたSIX2ネフロン前駆細胞への高効率な分化誘導法の開発

①成長因子の添加及び培養方法(浮遊培養、共培養、3次元培養など)の開発

②High-throughput screening (HTS)系の確立(フローサイトメトリ、イメージアナライザ)

③低分子化合物ライブラリーのスクリーニングによる分化誘導剤の探索

4. 研究成果

(1)申請者の研究室では図1で示す腎発生分化段階を模倣する形での分化誘導法を開発を行ってきた。当初、図2で示すとおりiPSから誘導されたSIX2陽性細胞から腎細胞(尿細管上皮細胞、糸球体上皮細胞)への分化誘導スクリーニングを行う予定であった。

(Toyohara T, et al. in division)しかし申請者の研究室でのプロトコールではSIX2陽性細胞数がスクリーニングで使用可能な量を安定的に採取することが困難であった。そこで方法(2)の通り、SIX2陽性ネフロン前駆細胞への高効率な分化誘導法の開発に切り替えた。

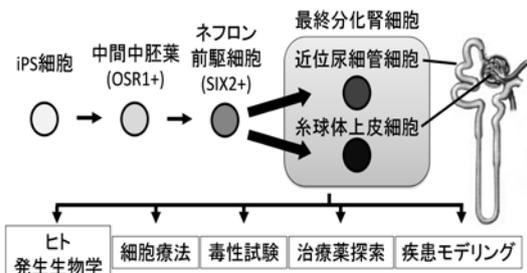


図 1：臨床応用を目指した iPS 細胞からの腎発生分化機構

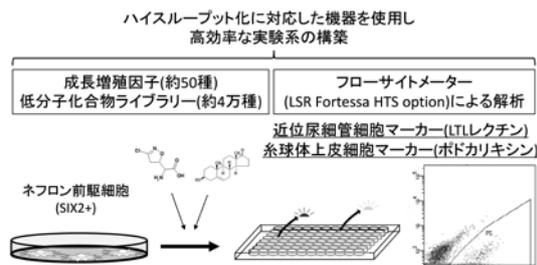


図 2：ハイスループット化した腎細胞解析戦略

(2) 申請者らの研究室では中間中胚葉マーカーである OSR1 遺伝子座に GFP を導入し、またネフロン前駆細胞マーカーである SIX2 遺伝子座に tdTomato を導入したダブルレポーター iPS 細胞株を有している。この細胞株を用いて誘導した OSR1 陽性細胞に対し、低分子化合物ライブラリーを用いて SIX2 陽性細胞への分化誘導スクリーニングを行った。すなわち、iPS 細胞から OSR1 誘導を GFP による蛍光をフローサイトメータで確認したのち、OSR1 陽性細胞に対して化合物ライブラリーによるスクリーニングを行う。その結果 SIX2 陽性細胞を tdTomato の蛍光をフローサイトメータで検出した。(図 3)

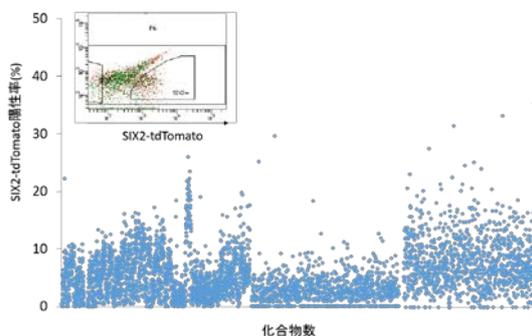


図 3：SIX2-tdTomato 陽性細胞スクリーニング

平成 25 年度は、当研究室が所蔵する低分子化合物ライブラリー (約 20,000 種) を使用し分化誘導スクリーニングを行い、数種類の Hit 候補化合物を見いだした。

平成 26 年度はこの Hit 化合物による SIX2 陽性細胞の効率的な誘導法の構築を行い、発生生物学的な知見を得るとともに、それに引き続く近位尿細管上皮細胞、糸球体上皮細胞への高効率な分化誘導の探索を目標とした。

まず前年度の Hit 化合物を二次スクリーニングとして用量依存性の検証を行ったが、再現を得られた化合物は認めなかった。そこで新たな化合物ライブラリーを用いた SIX2 陽性細胞分化誘導スクリーニングを行った。14 個の Hit 化合物を認め、二次スクリーニングで 3 化合物に絞られた。これらの化合物は用量依存性を認めている。マウス胎児腎器官培養系に影響を与えている観察結果も得られており、発生生物学上の知見になることも予想される。今後これら化合物の詳細な機能解析や得られた SIX2 陽性細胞の解析を行い、高効率な SIX2 陽性細胞分化誘導法の至適化を行っていく予定である。

<引用文献>

- ① Mae S, Shono A, Shiota F, Yasuno T, Kajiwara M, Gotoda-Nishimura N, Arai S, Sato-Otubo A, Toyoda T, Takahashi K, Nakayama N, Cowan CA, Aoi T, Ogawa S, McMahon AP, Yamanaka S, Osafune K. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. Nat Commun. 2013;4:1367.
- ② Araoka T, Mae S, Kurose Y, Uesugi M, Ohta A, Yamanaka S, Osafune K. Efficient and rapid induction of human iPSCs/ESCs into nephrogenic intermediate mesoderm using small molecule-based differentiation methods.

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 1 件)

井上達之、荒岡利和、長船健二 iPS 細胞を用いた腎臓再生と腎疾患と病態解析 Annual review 腎臓 2014、査読なし、2014、74-81

[学会発表] (計 1 件)

Toyahara T, Yamagishi Y, Mae S, Inoue T, Araoka T, Kasahara T, Yamanaka S, Nakajima H, Osafune K. Development of differentiation methods from human iPSCs/ESCs into nephron progenitor cells. 11th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Reserch. July12-15th, 2014.

Boston Convention and Exhibition Center,
Boston, MA, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 達之 (INOUE, Tatsuyuki)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 糖
尿病性腎症治療学・助教

研究者番号：60598564