

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670432

研究課題名(和文) 転写調節因子を自在誘導できるESバンクを用いた腎尿細管ダイレクトリプログラミング

研究課題名(英文) The direct differentiation method of renal tubular cells by master transcription factors identified from TF-inducible human ES bank

研究代表者

伊藤 裕 (Hiroshi, Itoh)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40252457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、腎尿細管への分化誘導に関わる転写因子を明らかにするために転写調節因子を自在に誘導できるヒトESバンクのマイクロアレイデータを用いて網羅的解析を行った。複数個の候補となる転写因子が明らかになり、これらを合成mRNAの形でヒトES細胞に導入することで5日間で中間中胚葉のマーカであるOSR1を初め近位尿細管のマーカであるAQP1、MEGALINのmRNAレベルでの上昇、さらに、AQP1、LTLの蛋白レベルでの発現が確認できた。今回、我々は近位尿細管の分化誘導に必須となる転写因子を同定し、合成mRNAを用いた全く新しい分化誘導方法を示すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：To find transcription factors which promote differentiation towards renal tubular cells, we utilize the human ES lines with doxycycline-controllable transcription factors (TF-inducible hES bank) and performed exhaustive search for DNA microarray data. Some candidate transcription factors were identified by in silico analysis. By using the lipofection method, we transfected the synthetic mRNA of target transcription factors to human ES cells, and cultured them. Five days after the transfection, we were able to observe characteristic morphological changes in the differentiated cells. The mRNA expression of OSR1, AQP1, and MEGALIN were increased. Moreover, the protein expression of AQP1 and LTL were also detected in the differentiated cells. We identified specific transcription factors for differentiation toward proximal tubular cells, and demonstrated that the differentiation of proximal tubular cell phenotype from human ES cells by a novel method using synthetic mRNA.

研究分野：腎臓内分泌代謝

キーワード：ES細胞 尿細管 転写因子

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、Kidney specific protein (KSP) 陽性細胞を分化マーカーとして ES 細胞の腎構成細胞への分化誘導方法を研究してきた。この中で、マウス ES 細胞において、Activin と Insulin-like growth factor-1(IGF-1)が腎臓の尿細管全般に発現している KSP の発現を促進し、さらに KSP 陽性細胞を純化することで管腔構造をもった尿細管細胞の誘導に成功した(Morizane et al, BBRC 2009, PlosOne 2013)。一方、長船らによりヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem, iPS) 細胞に Bone Morphogenetic Protein7 (BMP7)/activinA/Wnt3a を添加することで効率的な中間中胚葉への誘導は確認されている(Mae et al, Nature Communications 2012)。しかし、機能的な腎構成細胞の樹立には至っておらず、また誘導方法においても、(a)EB や中間中胚葉を介する必要があること(b)長時間を要すること(c)効率が悪いことが問題点として残っていた。

これまで申請者は ES/iPS 細胞から血管前駆細胞(Vascular progenitor cells:VPCs)への分化誘導方法を研究・開発し(Yamashita et al, Nature 2000, Sone et al, Circulation 2003, ATVB 2007, Taura et al, ATVB 2009)、未分化細胞から成熟細胞への分化系譜を一貫して検討してきた。

他方で、今回共同研究を行う洪らはマウスの TF-inducible ES cell bank を作製した。哺乳類の転写調節因子は 2000 弱程度であると推定されているが、この細胞バンクは、そのうちある 1 つの転写調節因子のみを ON にすることができる。つまり、ある転写調節因子を ON にした時の ES 細胞を Microarray で全ての臓器のそれと in silico で比較することで、各臓器の分化において鍵となるマスター制御因子を絞り込める事が大きな強みであると言える (Correa-Cerro et al,

Scientific Reports 2011)。さらに洪らは、複数のマスター制御因子を同時に導入することに注目し、各転写調節因子をコードした合成 mRNA を細胞にふりかける技術を整備している。

そこで、申請者はこれまでの一貫した ES 細胞に対する手法をもとに腎尿細管発生におけるマスター制御因子を ES 細胞バンクでの解析から同定し、合成 mRNA を用いてリプログラミングを行うという新たな研究テーマの発想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、転写調節因子を自在に誘導できるマウス ES 細胞バンク(Transcription factor-inducible ES cell bank, TF-inducible ES cell bank)をもとにマウス腎尿細管細胞の発生におけるマスター制御因子を探索・解明すると共に、明らかになった転写調節因子を多能性幹細胞に合成 mRNA の形で直接導入し、胚様体(embryoid body, EB)を介さずに腎尿細管細胞を短時間、高効率、大量に生産するための基盤技術の開発を行う。

本方法は EB を経ないため ES 細胞のみならず、線維芽細胞に直接複数の合成 mRNA を導入することができ、ダイレクトリプログラミングの手法で腎尿細管細胞を誘導できる可能性を秘めた画期的試みと言える。

3. 研究の方法

本研究では、腎構成細胞のマスター制御因子の探索、特定した転写調節因子の導入で腎構成細胞を短時間、高効率、大量に生産する。研究計画の進め方として、

- (1) in silico での解析によりマスター制御因子を特定する
- (2) 上記で特定した複数のマスター制御因子を mRNA の形でマウス ES 細胞に導入し、KSP 陽性細胞を分化マーカーとして純化を図り ES 細胞由来尿細管細胞を樹立する
- (3) 2 次元及び 3 次元で培養・維持する最適な環境を評価・検討する

(4)上記で得られた細胞を成体マウス腎被膜下に移植実験し、その生着を確認する

(5)線維芽細胞からのダイレクトリプログラミングで同様に尿細管前駆細胞を樹立する

(1)共同研究に参画する洪らは、比較的どの組織細胞でも発現することが知られている ROSA26 領域に外来性の転写調節因子を導入する事により、マウス ES 細胞安定株を作成した(図 1)。

導入した外来因子の発現は、薬剤(ドキシサイクリン)

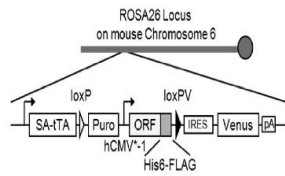


図 1: 転写調節因子導入

の存在下では抑制されており、薬剤を培地から取り除く事によって人為的に発現を誘導する事ができる。このような全ての転写調節因子のスイッチを ON にできる ES 細胞バンクを作成し、ある 1 つの転写調節因子を ON にした後、48 時間後の ES 細胞を Microarray で分析し全ての臓器のそれと比較することで、その遺伝子の発現により分化する臓器の方向性を詳細に解析した (Correa-Cerro Scientific Reports 2011)(図 2)。そこで、遺伝子発現情報データベースである GEO(Gene expression Omnibus)より各腎構成細胞毎に Microarray データを検索し、ES 細胞バンクのデータとの比較・解析を行う。



図 2 Gene mapping

(2)上記で明らかになった転写調節因子の候補を実際にマウス

これによって、尿細管細胞への分化に重要な役割を果たすであろう転写因子群を解明する。

ES 細胞に導入して尿細管細胞を分化誘導し培養維持することを目的とする。

合成 mRNA の精製

遺伝子導入方法としてはゲノムに変異を及ぼさない事、癌化のリスクが少ない事を利点に、合成 mRNA の形で導入する。

Lipofectamine RNAiMAX あるいは TransIT-mRNA を用いて対象とする転写調節因子につき合成 mRNA を精製する。合成 mRNA を用いた場合、導入後 12-18 時間で最大のタンパク質発現を示した後、急速に代謝されることが報告されているため、毎日の導入を行う事が必要となる (Warren Cell Stem Cell 2010)。

マウス ES 細胞への導入

精製した複数の合成 mRNA をマウス ES 細胞に同時に導入する。尿細管マスター制御因子をコードするであろう複数個の合成 mRNA の組み合わせを変え、Flow cytometry で KSP 陽性細胞を分化マーカーとして腎構成細胞への分化を確認し、最適な尿細管マスター制御因子の組み合わせを特定する。

分化誘導細胞の解析

分化細胞の形態の確認、また尿細管細胞分化の確認のため PCR やウエスタンブロット、免疫染色 (LTL や AQP1 など) で確認をする。これにより、目的とする尿細管細胞が得られているかを確認する。

(3) 申請者らはこれまでマウス近位尿細管細胞初代培養細胞を作成し、分化後の細胞に最も適した培養条件の検討を行ってきた。検討後の培養条件で細胞培養を継続し、尿細管のキャラクターが失われない事を PCR で確認する。また、マトリゲル上で 3 次元培養も行う。ここでは、分化誘導をして得られた細胞での最適な培養条件を明らかにする。

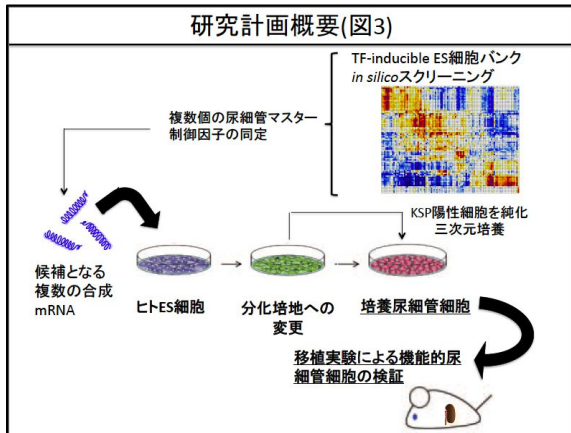
(4)得られた腎構成細胞が実際にマウスに生着するかの確認をする事を目的とする。成体マウスの腎被膜下にマウス ES 細胞 (CAG-GFP) 由来細胞群を注入し、成体腎において ES 細胞

胎由来の腎構成細胞が生着している事を免疫染色で確認する。

(5) 特定した転写調節因子を線維芽細胞に導入し、最適な培養条件下で腎構成細胞への分化誘導を行う。また、尿細管細胞の発現の確認のため PCR やウエスタンブロット、免疫染色で検討する

4. 研究成果

TF-inducible ES 細胞データの in silico スクリーニングによる尿細管分化マスター制御因子の同定に関しては、当初、転写因子を自在に誘導できるマウス ES 細胞バンクを用いて尿細管分化に関わるマスター制御因子を同定しマウス尿細管細胞を分化誘導することを計画していたが、連携研究者の洪教授らにより転写因子を自在に誘導できるヒト ES 細胞バンクの充実が図られたため、ヒト ES 細胞バンクを用いることとした(図3)。



このデータベースを元に明らかとなった約 30 の転写因子のうち、ヒト尿細管細胞への分化誘導のマスター制御因子と考えられる 2 つの転写因子 X, Y を同定した。特に、これらマスター制御因子は単因子の過剰発現後、ヒト腎上皮維持培地での培養によりわずか 5 日間で腎臓の尿細管全般に発現している KSP のみならず成熟尿細管に発現する AQP1, AQP2, MEGALIN といった特異的のマーカも PCR 及び

転写因子Xの過剰発現による尿細管細胞の直接分化誘導

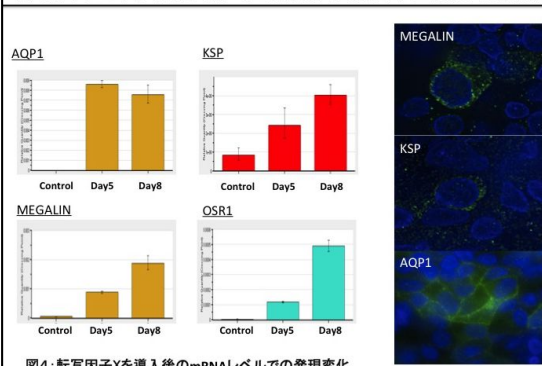
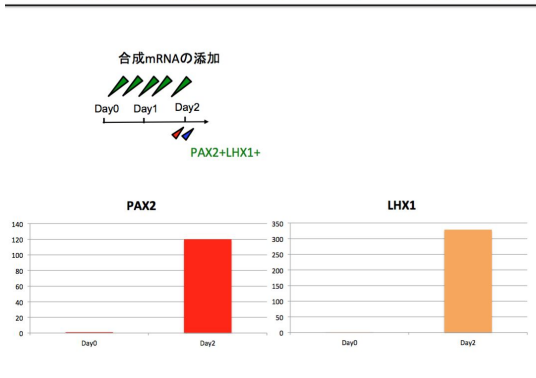


図4: 転写因子Xを導入後のmRNAレベルでの発現変化

図5: 免疫染色での確認

蛋白レベルで確認することができた(図 4,5)。さらに、明らかになった因子に加え、2 つの転写因子 A, B を導入することにより PAX2 や LHX1 とうった中胚葉マーカー陽性の細胞群を経由してより成熟した尿細管様細胞を誘導できる可能性を見出した(図6)。

転写因子X, A, BをコードしたmRNA導入によりわずか2日で中胚葉マーカー陽性となる(図6)



今後、転写因子の段階的組み合わせによる分化誘導法は、ヒト多能性幹細胞から尿細管細胞作成の新規方法として確固たる地位を築くことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 平塚健, 門川俊明, 秋山智彦, 中武悠樹, Sravan Kumar Goparaju, 相馬淳美, 小林紗恵子, 納富奈々, 木村寛美, 山口慎太郎, 森實隆司, 鈴木さゆり, 松下美紗子, 平山雅敏, 洪繁, 洪実, 伊藤裕, ヒト多能性幹細胞から腎尿細管様細胞への分化誘導方法の開発, 第 15 回日本再生医療学会総会, 2016年3月17日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

2. Ken Hiratsuka, Toshiaki Monkawa, Shintaro Yamaguchi, Ryuji Morizane, Shigeru B.h. Ko, Minoru S. h. Ko, Hiroshi Itoh, The direct differentiation of renal tubular cells by synthetic mRNA of transcription factors identified from TF-inducible human ES bank, the ASN Kidney Week 2015 Annual Meeting(国際学会), 2015年11月6日, San Diego, CA(USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 裕 (Hiroshi Itoh)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：40252457

(2)連携研究者

洪 実 (Minoru Koh)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：50631199

門川 俊明 (Toshiaki Monkawa)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：80286484

(3)研究協力者

平塚 健 (Ken Hiratsuka)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・博士課程

大学院生