

臨床応用を見据えたヒト iPS 細胞から尿細管細胞への分化誘導法の確立

本間康一郎*1 山口慎太郎*2 堀 進悟*1 伊藤 裕*2

*1 慶應義塾大学医学部救急医学教室 *2 同 内科学教室腎臓内分泌代謝内科

key words : ヒト iPS 細胞, ヒト ES 細胞, 尿細管細胞

要 旨

ヒト ES/iPS 細胞から尿細管細胞への分化誘導方法を検討した。GSK-3 β 阻害剤を用い、Wnt/ β -catenin のシグナルを活性化することで、中胚葉の初期のマーカーである Brachury の発現が上昇し、その後、低血清および複数の増殖因子を含んだ培地で培養した。その結果、尿細管特異的マーカーである KSP の発現が上昇することを確認した。分取した KSP 陽性細胞は、Wnt4 シグナルおよびマウス後腎間葉と共培養することで、尿細管様の三次元管腔構造を形成した。今後、ヒト発生化学の解析、細胞移植療法の開発、多発性嚢胞腎などの難治性疾患に対する新規疾患モデルの作成、バイオ人工臓器の開発への発展が期待される。

1 研究目的

近年多くの疫学研究により慢性腎臓病 (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た。疫学調査の結果では、CKD の頻度が予想以上に多いことが示され、現在、糸球体ろ過率 (GFR) 60 ml/min/1.73 m² 以下でみると、20 歳以上の成人の 20.7% が CKD と診断される。今後の高齢化に伴い CKD 患者が増加し、末期腎不全から医療費を圧迫している透析療法を必要とする人口が増加することが容易に想像される。一方、その発症

機序は十分解明されていないのが現状である。

腎臓には 20 種類ほどの細胞が存在するが、最も重要なのは腎臓の多くの生理機能を担う、近位尿細管細胞であると考えられる。また、尿細管障害は CKD、末期腎不全の final common pathway と考えられており、臨床応用に直結する研究の進歩のため、尿細管細胞への分化誘導法の確立はきわめて有用であると考えられる。

2 研究方法

申請者らの研究室では、以前より、ヒト ES/iPS 細胞から中胚葉系細胞への分化誘導研究を精力的に行っており、動物由来細胞を使用せず効率的に血管内皮細胞を分化誘導する技術¹⁾、血管平滑筋細胞への誘導における miR-145 の役割²⁾について報告した。また、我々は、マウス ES 細胞を、尿細管細胞に発現が特異的な kidney specific protein (KSP) を指標に分化誘導し、KSP 陽性細胞が腎臓前駆細胞としての特性を有している事を見出した³⁾。そこで、本研究では、申請者らの今までの研究内容を応用することで、ヒト ES/iPS 細胞から尿細管細胞への分化誘導を試みた。

腎尿細管細胞は中胚葉由来の細胞であり、中間中胚葉、後腎間葉および上皮化の過程を経て出現する。そこで、ヒト ES/iPS 細胞を中胚葉系統に誘導するために、これまでの誘導で用いてきた GSK-3 β 阻害剤を用

Pathway for differentiation of human iPS cells to kidney specific protein positive cells and their potential for tubular structures

Departments of Emergency Medicine and, School of Medicine, Keio University

Koichiro Homma

Shingo Hori

Departments of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University

Shintaro Yamaguchi

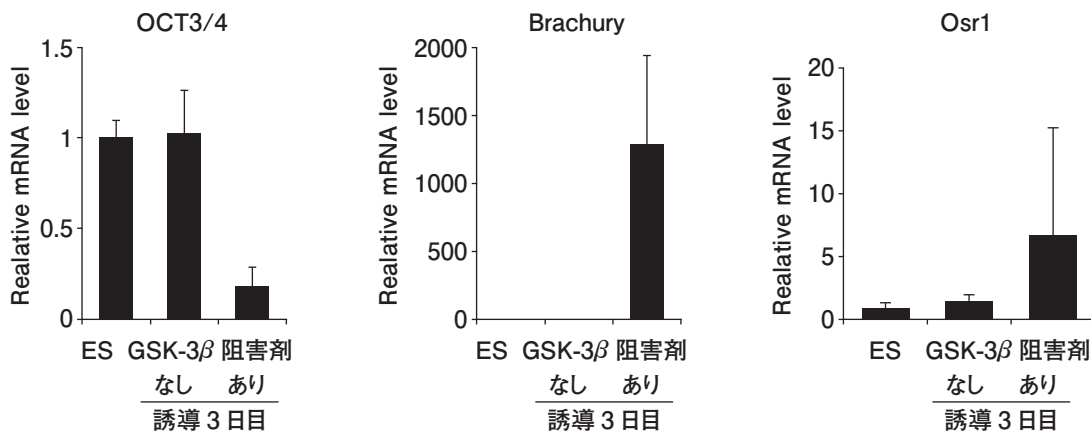


図1 誘導初期段階における腎発生関連遺伝子

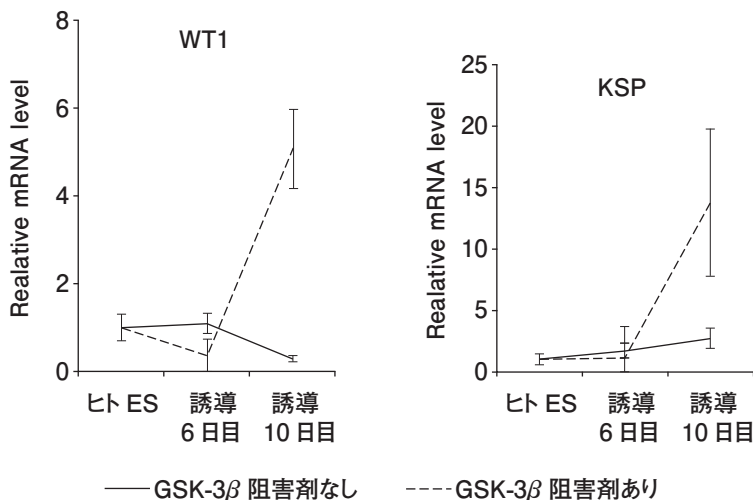


図2 誘導後期段階における腎発生関連遺伝子

いた。その後、中間中胚葉への誘導を促進する増殖因子、培養条件を検討し、各誘導段階での遺伝子発現を網羅的に解析するとともに、尿細管特異的なマーカーである、KSP の発現量を検討した。分化誘導してきた KSP 陽性細胞の分取にはフローサイトメトリーで使用できる抗体が必須であるが、市販されているものは現在ない。そこで申請者らの研究室で独自に作成した抗 KSP モノクローナル抗体 (特許出願済み) を用いた。

KSP 陽性細胞が尿細管細胞としての特性を有するかを検討するために三次元培養を行い、尿細管管腔様の構造を構築するかを 2 通りの方法で検討した。Wnt-4 シグナルを恒常的に分泌する NIH 3 T 3-Wnt 4 細胞をマイトマイシン処理し、その上にマトリゲルを敷き、三次元培養条件を作成した。誘導したヒト ES 細胞を、マトリゲル上に撒き 24~48 時間培養した。また、誘導したヒト ES 細胞を、胎生 11.5 日目から抽出した後

腎間葉の細胞と共培養し、尿細管管腔構造に取り込まれるかを検討した。ヒト ES/iPS 細胞を細胞塊にし、GSK-3β 阻害剤で 3 日間培養した。GSK-3β 阻害剤を用いることで、未分化マーカーである Oct 3/4 は速やかに低下し、中胚葉の初期のマーカーである Brachury が上昇することを確認した。また、中間中胚葉のマーカーである Osr-1 の上昇も認めた (図 1)。

その後、低血清培地および増殖因子を含んだ誘導培地で培養したところ、後腎間葉のマーカーである WT-1 が上昇し、やや遅れて尿細管細胞のマーカーである KSP も上昇した (図 2)。

KSP のたんぱくレベルの発現は、ウェスタンブロット、細胞免疫染色、フローサイトメトリーで確認し、約 5% 程度の KSP 陽性細胞の誘導を行った (図 3)。誘導したヒト ES 細胞を NIH 3 T 3-Wnt 4 細胞とマトリゲルを介して 24 時間共培養した。KSP 陽性細胞は管腔様の構造を構築し (図 4)、一部 AQP 1, AQP 2,

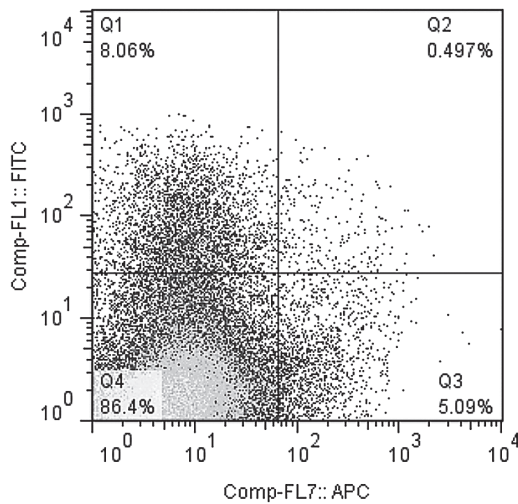
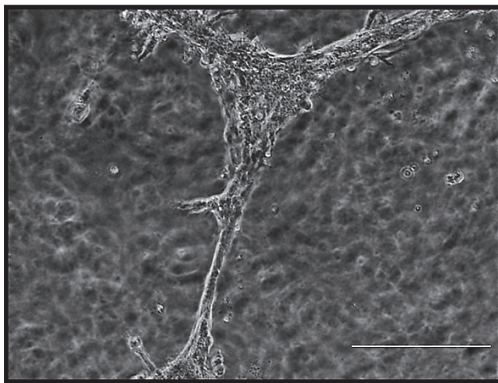


図3 誘導 10 日目における KSP 陽性細胞



Bar: 500 μm

図4 マトリゲル上での管腔様構造

megalin などの尿細管マーカーを発現することを確認した。

また、*ex vivo* でマウス胎児由来の後腎間葉細胞を共培養すると、KSP 細胞が尿細管様の構造に取り込まれることを確認した。

3 結論

ヒト ES/iPS 細胞を腎系統の細胞へ誘導し、独自に作成した抗 KSP モノクローナル抗体により約 5% の KSP 陽性細胞が誘導可能なことを確認した。また、KSP 陽性細胞は、三次元培養条件において、管腔様構造を形成し、一部尿細管マーカーを発現すること、マウス胎児由来の尿細管構造に取り込まれることを見出した。このように本研究では、ヒト ES/iPS 細胞から尿細管細胞としての特性を有する KSP 陽性細胞への誘導を行った。

本研究を足掛かりに、今後、ヒト発生分化学の解析、細胞移植療法の開発、多発性嚢胞腎などの難治性疾患に対する新規疾患モデルの作成、バイオ人工臓器の開発への発展が期待される。

この研究は、平成 24 年度日本透析医会公募研究助成によるものである。

文 献

- 1) Homma K, Sone M, Taura D, et al. : Human ES- and iPS-derived vascular endothelial cells show greater functionality than adult endothelial cells due to greater expression of Sirt1. *Atherosclerosis*, 212; 42-47, 2010.
- 2) Yamaguchi S, Yamahara K, Homma K, et al. : The role of microRNA-145 in human embryonic stem cell differentiation into vascular cells. *Atherosclerosis*, 219; 468-474, 2012.
- 3) Morizane R, Monkawa T, Fujii S, et al. : Kidney specific protein-positive cells derived from embryonic stem cells reproduce tubular structures in vitro and differentiate into renal tubular cells. *PLoS One*, 3; e64843, 2013.