

研究報告書

「多発性嚢胞腎患者由来の iPS 細胞を用いた病態解析」

研究期間：平成 20 年 6 月～平成 24 年 3 月

研究者：長船 健二

1. 研究のねらい

単一遺伝子の原因で発症する遺伝性疾患(monogenic disorder)のうち最も頻度の高い疾患である「常染色体優性多発性嚢胞腎(autosomal dominant polycystic kidney disease 以下 ADPKD と略)」は、腎臓に嚢胞が多発し徐々に末期慢性腎不全に至る難治性疾患である。また、この疾患では肝臓の嚢胞や脳動脈瘤が高頻度で形成されるなど、複数の臓器に重篤な合併症が生じることが知られている。これまで動物モデルを用いた本疾患の研究が盛んに行われてきたが、未だ有効な治療法は確立されていない。そこで、本さきがけ研究では、重症度と合併症の異なる複数の ADPKD 患者の皮膚線維芽細胞より iPS 細胞を樹立し、それらを試験管内で腎臓、肝臓、及び血管に分化させ、試験管内で嚢胞や動脈瘤形成を解析可能とするヒト疾患モデル系の確立を試みた。将来的には、本研究で開発する系を用いて新規診断・治療標的分子の同定、化合物スクリーニングによる新規治療薬の探索に繋げ臨床応用を目指す予定である。

2. 研究成果

① ADPKD 特異的 iPS 細胞の樹立とその性状解析

京都大学医学部附属病院および田附興風会北野病院に通院する 7 例の ADPKD 患者より同意の元、臍横部から皮膚生検を施行した。7 例全例が腎嚢胞に加え肝嚢胞を合併し、さらに 4 例が脳動脈瘤の合併症例であった。皮膚塊を培養し増殖させた線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いたリプログラミング 4 因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC)または 3 因子(c-MYCを除く)の遺伝子導入にて iPS 細胞を樹立した(図 1)。導入遺伝子の発現がサイレンスされ、かつ核型の正常な iPS 細胞株を選択し、1 症例につき 1 株を研究に使用した。これらの iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に未分化状態のマーカー遺伝子(OCT3/4, NANOG, SOX2, TRA1-60, TRA1-81, SSEA4, ALP 等)を発現し、胚様体および奇形腫形成法にて三胚葉性の組織へ分化する多分化能を有していた。さらに、遺伝子発現プロファイルがヒト ES 細胞のものと類似し、OCT3/4, NANOG など未分化状態マーカー遺伝子のプロモーター領域が脱メチル化されていることも確認した。また、7 例中 3 例において家系調査、連鎖解析、遺伝子配列解析を実施し、本疾患の約 85%の症例で異常を有することが報告されている PKD1 遺伝子座の変異を確定した。

② 血管病変(動脈瘤)モデル作製に向けた血管構成細胞への分化誘導

既報の分化誘導法(Homma K, 2010)を用いて 7 症例由来の ADPKD 特異的 iPS 細胞 7 株のすべてから血管構成細胞への分化誘導を行った。内皮細胞は約 10%、血管平滑筋細胞は約 35%の効率で分化誘導可能であり、マーカー遺伝子の発現(内皮細胞: CD31, VE-cadherin, eNOS など、平滑筋細胞: α -SMA, Calponin, Cardesmon など)を確認した(図 1)。健常日本人由

来 iPS 細胞 3 株からも分化誘導を行い比較を行ったが、形態や分化誘導効率に有意な違いは認められなかった。

③.血管細胞モデルを用いた病態関連分子の同定

マイクロアレイを用いて ADPKD 特異的 iPS 細胞 7 株と健常日本人由来 iPS 細胞 3 株から分化誘導された血管内皮および平滑筋細胞の遺伝子発現の比較解析を行った(図 1)。21(7X3)通りの比較を行ったところ、ADPKD 内皮細胞で共通して 3 種の遺伝子の発現上昇が認められた。また、同様の比較解析を脳動脈瘤合併 ADPKD 特異的 iPS 細胞 4 株と非合併 iPS 細胞株 3 株由来の血管細胞間の 12(4X3)通りで行ったところ、脳動脈瘤合併例の内皮細胞で 18 種、血管壁細胞で 7 種の発現上昇を認める遺伝子が同定された。現在、それらの同定された分子を用いた新規診断法の開発や治療標的分子としての活用を検討している(投稿準備中)。

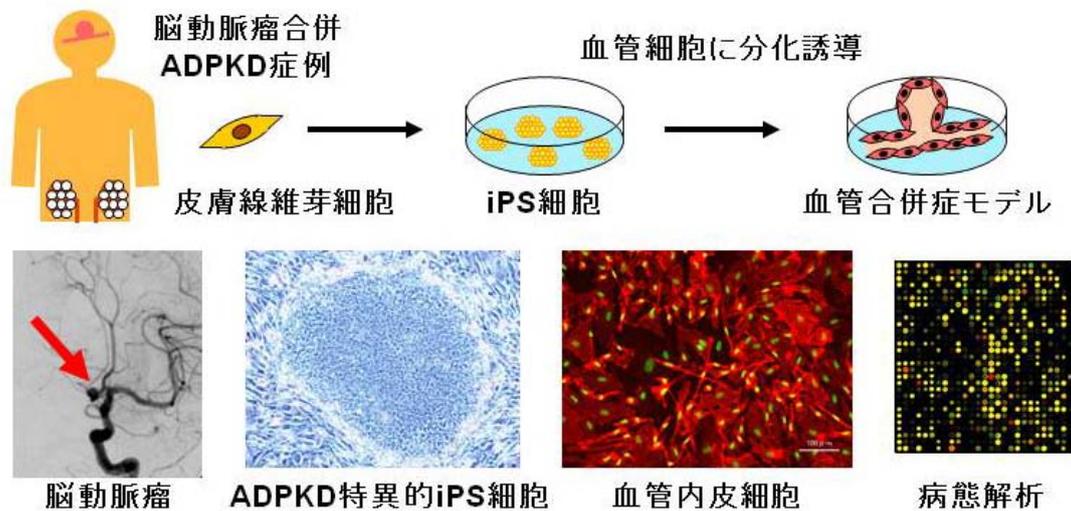


図1. 常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)の患者由来iPS細胞を用いた同疾患の血管合併症に対する疾患モデル作製および病態解析の概略図

④.腎病変(腎嚢胞)モデル作製に向けたヒト iPS 細胞からの腎臓系譜への分化誘導法開発

ヒト iPS 細胞から尿管管や集合管など腎嚢胞を発生させる罹患細胞種への分化誘導法の開発を目指し、腎臓を派生させる初期の胎生組織である中間中胚葉の分化誘導法の開発を行った。中間中胚葉の特異的マーカー遺伝子である転写因子 OSR1 を分化の指標に用いて、増殖因子の組み合わせ処理にて 90% 以上の高効率で OSR1 陽性細胞を分化誘導する方法を開発した。これらの OSR1 陽性細胞は、PAX2、LIM1、SALL1 などの他の中間中胚葉マーカー遺伝子を発現し、in vitro の長期培養と免疫不全マウスへの移植

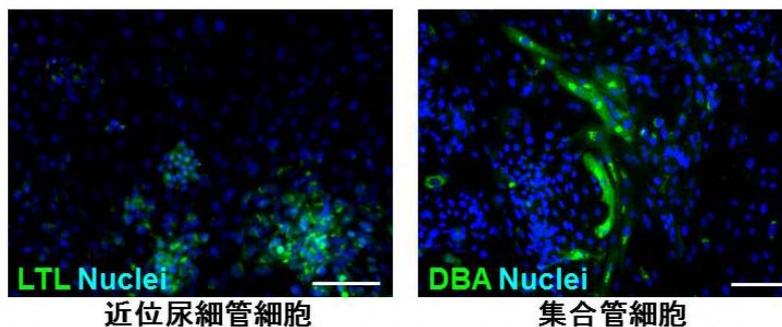


図2. ヒトiPS細胞から作製された腎尿管および集合管細胞

による in vivo 環境下で腎臓、生殖腺、副腎皮質などの中間中胚葉由来臓器の構成細胞に分化可能であった(図 2、論文リバイス中)。現在、中間中胚葉から腎前駆細胞を経て尿細管や集合管細胞を作製する高効率の分化誘導法開発を行っている。

⑤.肝病変(肝嚢胞)モデル作製に向けたヒト iPS 細胞からの胆管上皮への分化誘導法開発

ヒト iPS 細胞から本疾患の肝嚢胞を発生させる胆管上皮への分化誘導法開発を行った。酵素処理を用いた単一細胞への解離と無フィーダー培養を組み合わせた独自の分化誘導法を開発し、90%以上の高効率で胚体内胚葉を作製することに成功した。その内胚葉細胞に既報(Hay DC, 2008)にあるヒト ES 細胞から肝臓系譜への分化誘導に使用される因子である DMSO, HGF, OSM を添加することにより効率は低いが、CK19, AQP1 などのマーカー陽性の胆管上皮細胞が形成されることを確認した(図 3)。現在、増殖因子および低分子化合物のスクリーニングを行い、胆管上皮への分化誘導効率を向上させる化合物の探索とそれを用いた新規分化誘導法の開発研究を進めている。

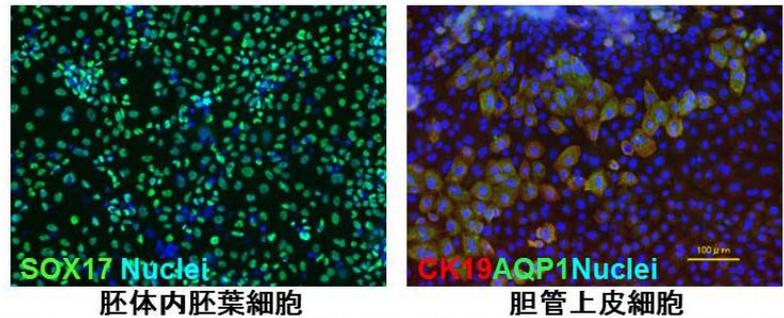


図3. ヒトiPS細胞から作製された胚体内胚葉および胆管上皮細胞

3. 今後の展開

これまでのヒト iPS 細胞の分化誘導研究、ADPKD 特異的 iPS 細胞研究を基盤とし、「ヒト iPS 細胞から腎尿細管、集合管細胞への分化誘導法開発と腎嚢胞モデルの作製」、「ヒト iPS 細胞から胆管上皮細胞への分化誘導法開発と肝嚢胞モデルの作製」、「ADPKD の血管合併症に対する新規診断法・治療法開発」を目指す。

4. 自己評価

本研究では、ADPKD 患者より疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、同疾患の主要な病変である腎嚢胞、肝嚢胞、動脈瘤などの血管病変に対する疾患モデル作製とそれを用いた病態解析を目指した。まず、腎嚢胞、肝嚢胞モデルを作製するためにヒト iPS 細胞から罹患細胞種である腎尿細管細胞、集合管細胞と肝内胆管細胞を分化誘導しなければならないが、これらの細胞種への分化誘導法は未だ確立されていない。腎臓に関しては、本さきがけ研究期間内にヒト iPS 細胞から腎臓を派生させる胎生初期の組織である中間中胚葉を高効率に分化誘導することを目標に研究を行ったが、期間内に 90%以上の高効率で作製する方法を確立し、実際にヒト iPS 細胞由来の中間中胚葉が、尿細管細胞や集合管細胞に効率は低いが生分化可能であることを確認した。よって、当初の目標は達成しつつあるが、引き続き次の数年間で尿細管や集合管細胞を高効率に分化誘導する方法を確立し、ADPKD の腎嚢胞モデル作製を行う予定である。中間中胚葉と腎臓の分化誘導法は、その報告も少なく未だ確立されていないため、本研究の成果は、腎臓のみならず中間中胚葉が派生させる副腎皮質や生殖腺の発生再生研究の進展にも寄与するものであると考えられる。

次に、血管病変に関しては本研究開始時に既に血管構成細胞への分化誘導法は開発されていたため、それを活用した。本疾患の血管合併症のうち、高い致死率を有すクモ膜下出血を引き起こすため最も重篤なものである脳動脈瘤を合併する患者と合併しない患者の間で iPS 細胞由来の血管内皮および平滑筋細胞において有意な発現差を生じる遺伝子群を同定した。現在、それらの分子の臨床検体(血清、尿など)中の濃度を測定する臨床研究を準備しており、本疾患における脳動脈瘤合併との関連の裏付けを行う予定である。そして、疾患特異的 iPS 細胞を用いた疾患モデル作製研究によって、日常臨床に役立つ診断法や新規治療薬などの開発が実際に可能であることを示すことを目指している。

一方、本研究の計画では、疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した細胞のみならず、それらを用いた三次元の罹患組織作製を行い、in vivo の病態をより模倣するモデルを作製する予定であったが、このプロジェクトに関しては全く着手できていない。iPS 細胞や ES 細胞の分化誘導研究の大きな課題の一つとして、三次元の組織や臓器を作ることの困難さが近年認識されている。今後、この課題の克服も眼中に置いて、組織化を用いたより高度な疾患モデルを作製することにも取り組みたいと考えている。

5. 研究総括の見解

1期生のなかでも、この分野に最も準備ができており、今注目されている疾患の iPS についていち早くチャレンジした事は評価できる。残念ながら期間中に、この課題での論文を掲載するところまでは至らなかったが、研究は順調に進んでいると評価している。実際、患者由来 iPS の作製、突然変異で影響される分化細胞の誘導、さらには正常と ADPKD 由来細胞の比較など、研究は着実に進んでおり、一つの方向へあらゆる資源を集中させ研究を進めるオーガナイザーとしての能力の高さを示している。これからは、細胞生物学と病理学を結びつけるためのアイデアが必要で、焦らずこの壁を克服し独自の分野を切り開いてほしい。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* 11, 1269-1275, 2008.
2. Chen S, Borowiak M, Fox J, Maehr R, Osafune K, Davidow L, Lam K, Peng L, Schreiber S, Rubin L, Melton DA. A small molecule that directs differentiation of human embryonic stem cells into the pancreatic lineage. *Nat Chem Biol* 5, 258-265, 2009.
3. Lau F, Ahfeldt T, Osafune K, Akutsu H, Cowan CA. Induced pluripotent stem (iPS) cells: an up-to-the-minute review. *F1000 Biol Rep* 1, 84, 2009.
4. Osafune K. *In vitro* regeneration of kidney from pluripotent stem cells. *Exp Cell Res* 316, 2571-2577, 2010.

5. Osafune K. iPS cell technology-based research for the treatment of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* in press.

(2)特許出願

研究期間累積件数:4件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

(学会発表)

1. 長船 健二: 腎再生研究の進歩: 第41回日本腎臓学会西部学術大会、教育講演2、徳島、2011年9月30日(招待講演)
2. 長船 健二: 糖尿病治療に向けたiPS細胞からの膵β細胞再生: 第39回日本臨床免疫学会総会、ワークショップ5「再生医学と免疫疾患」、東京、2011年9月17日(招待講演)
3. 長船 健二: Towards regenerative medicine for chronic kidney disease, diabetes mellitus and chronic liver disease using iPS cell technology: 日独修好150周年記念シンポジウム「人類の未来を拓く研究者のグランドチャレンジを支える日独の取り組み」、東京、2011年7月15日(招待講演)
4. 長船 健二: iPS細胞技術を用いた腎臓再生医療の開発: 第21回日本サイトメトリー学会学術集会、シンポジウム1「iPS細胞の臨床応用を目指して」、京都、2011年6月25日(招待講演)
5. 長船 健二: iPS細胞: 第54回日本腎臓学会学術総会、よくわかるシリーズ1、横浜、2011年6月16日(招待講演)
6. 長船 健二: iPS細胞技術を用いた糖尿病と糖尿病性腎症の解決に向けた研究: 第54回日本糖尿病学会年次学術集会、Leading-edge Lectures-1、札幌、2011年5月20日(招待講演)
7. 長船 健二: iPS細胞技術を用いた慢性腎臓病・糖尿病・肝不全に対する再生医療開発に向けた研究: 第84回日本内分泌学会学術総会、ミニシンポジウム4「内分泌代謝疾患と再生医療」、神戸、2011年4月22日(招待講演)
8. 長船 健二: iPS細胞技術を用いた肝臓再生医療の開発: 第28回日本医学会総会、シンポジウム3-S-1「肝再生の基礎と臨床」、東京、2011年4月8日(招待講演)
9. 長船 健二: iPS細胞技術を用いた腎臓再生医療の開発: 第40回日本心脈管作動物質学会、シンポジウム4「最先端研究」、香川、2011年2月5日(招待講演)
10. Osafune K.: Modeling for Intractable Disorders with Patient-specific iPS Cells. *Mini-symposium for Stem Cell Research*, Taipei, Taiwan, November 8-9, 2010. (Invited Speaker)
11. 長船 健二: 幹細胞から腎臓への分化の戦略: 第53回日本腎臓学会学術総会、シンポジウム2「臨床応用に向けた腎臓再生」、神戸、2010年6月16日(招待講演)
12. 長船 健二: ケミカルバイオロジーを用いたヒト多能性幹細胞から膵臓系譜への分化誘導: 第53回日本糖尿病学会年次学術集会、シンポジウム4「膵内分泌機能の再生～移植から再生医療まで～」、岡山、2010年5月27日(招待講演)

13. 長船 健二：ヒトES細胞の不均一性：第8回日本再生医療学会総会、シンポジウム
15 「ES細胞研究の現状と課題」、東京、2009年3月6日（招待講演）

（受賞）

CKD Award 2009 奨励賞（2009年11月）

（著作物）

Osafune K and Yamanaka S. Stem cells in regenerative processes; Induced pluripotent stem cells. Regenerative nephrology (Elsevier), 2010, pp203-15.