

腎臓由来ヒトiPS細胞を応用した新規CKD治療法の開発

東京大学大学院 医学系研究科 先端腎臓・再生医学講座

特任助教 高瀬 敦

(共同研究者)

東京大学医学部附属病院 ティッシュ・エンジニアリング部 准教授 菱川 慶一

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 教授 中内 啓光

はじめに

慢性腎臓病（CKD）患者は日本で約1,330万人、成人の8人に1人がCKDであり、CKD予備軍も含めると2,000万人にもなると言われている。その内、透析患者数も毎年約1万人ずつ増加し2011年には30万人を超え、国民総医療費約36兆円のうち、透析医療は実に1.4兆円以上を占めている。この事から透析に入る前のCKDを治す事が大事である。しかし、CKDに対する治療はARB、ステロイド、免疫抑制剤、抗凝固剤など病態により様々な薬物治療が成果を挙げているものの、一度進行した腎機能を取り戻すものではない。新たなCKD治療法の開発は急務である。

近年、京都大学山中教授が樹立したiPS細胞^[1]のノーベル賞受賞を機に、日本の再生医学は大きく前進した。iPS細胞を用いた再生医療の新規治療も現実的なものとなってきている。しかしながら、その中で腎臓領域でのiPS研究は十分なものとは言えない。更に再生研究においてはエピジェネティクス機構の概念が検討されており、様々な疾患や、再生医学における細胞恒常性とリプログラミングなどに関与すると言われている。2010年には様々な組織に由来するiPS細胞には、起源を反映したEpigenetic Memoryの残存があり、それがiPS細胞株の分化能に影響を与えると報告されている^[2]。また腎臓由来iPS細胞の樹立もいくつか報告されている^[3-5]。最近、iPS細胞を使った特異的腎臓分化誘導法がいくつか報告されている。ポドサイトへの分化^[6]、中間中胚葉を介した腎臓前駆細胞への分化^[7]、体軸幹細胞を介した腎臓前駆細胞への分化^[8]などである。

再生医療は既存の治療法と違い、全く新しい治療法である。特に自己細胞を使ったiPS細胞は倫理的、免疫学的にも問題を生じない現実的な研究である。今後、iPS細胞を使った治療は多彩な病態、疾患に活用される事が想定され、CKDへの応用も期待される。現状の研究から腎臓全体を再生させる為には、まだ時間がかかりそうであるが、腎臓構成細胞の再生やCKD治療への応用は十分可能である。例えば蛋白尿の改善（糸球体細胞再生）、腎機能の改善（尿細管細胞再生）、腎性貧血の改善（間質細胞再生）などが考えられ、既存のCKD治療薬との併用にて更に透析導入患者数を減らし、透析患者自身の病態も改善でき得る。iPS細胞を使っ

た新規CKD治療法の確立は近いと考えられる。

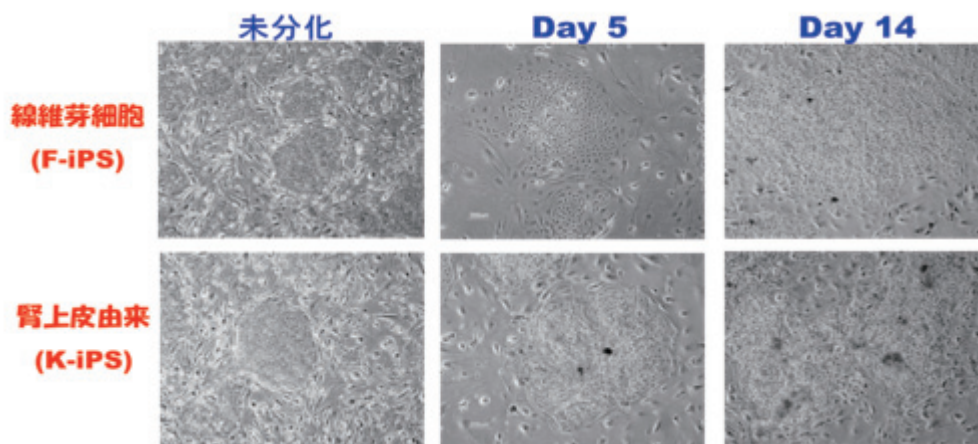
本研究は、独自に樹立した腎臓由来ヒトiPS細胞を使って、既報の腎系統特異的分化誘導法を考慮しながら独自の腎臓再生法を目指す。

方法・結果

これまで我々は3つの腎臓構成細胞（腎上皮細胞、メサングウム細胞、近位尿細管細胞）より腎臓由来ヒトiPS細胞を独自に樹立した。この樹立iPS細胞の一部を使って、すでに我々は研究成果を報告している^[9]。本研究では、既に腎臓由来iPS細胞が皮膚由来iPS細胞と比べDNA Methylationに相違があることを見出しており、腎臓構成細胞への分化誘導に最適であるとする。既報のNature Communicationの報告^[7]に従い、アクチビン、レチノイン酸、BMP-7などで処置して特異的腎臓分化誘導を目指す。更に腎臓由来iPS細胞にEpigenetic ModificationとしてHDAC 阻害剤（TSA）を処置して、Epigeneticsが分化誘導に及ぼす影響を検討する。

① 培養細胞の形態の違い

ヒト線維芽由来iPS細胞（F-iPS）、腎上皮細胞由来iPS細胞（K-iPS）を用いて、腎系統特異的分化誘導法における培養細胞の状態を時間経過と共に観察した。（Fig. 1）

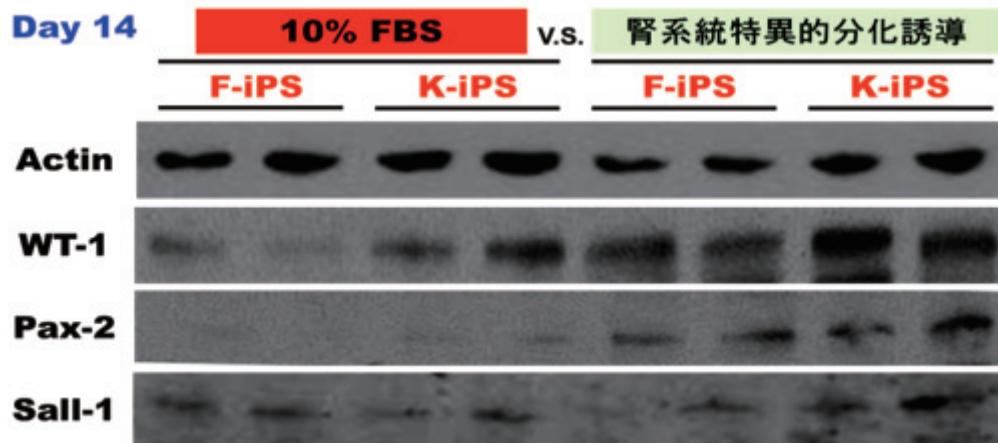


(Fig.1)

結果、腎系統特異的分化誘導法で処置したiPS細胞は、由来別iPS細胞の種類によって若干の発育速度は異なるが、一定の期間を超えると同様な細胞集塊となった。

② 誘導法の違い(Western Bolt)

F-iPSとK-iPSを用いて、通常血清培養と特異的腎臓分化誘導法における腎臓発生・分化因子の発現を比較検討した。（Fig. 2）

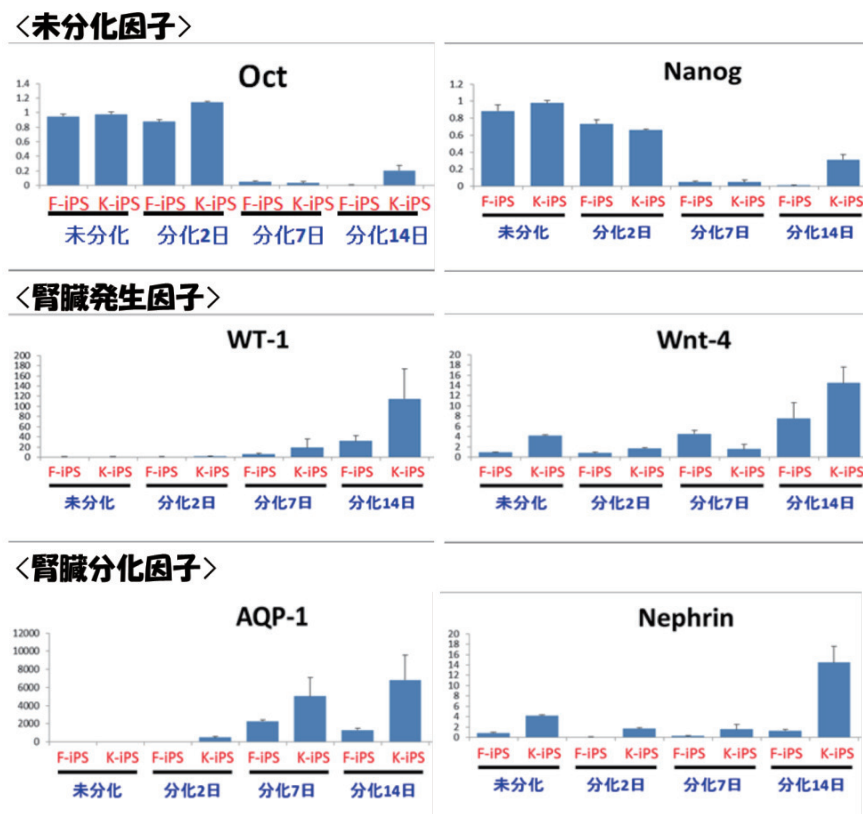


(Fig.2)

結果、腎系統特異的分化誘導法で処置したiPS細胞は、通常の10% FBS Mediumで培養したiPS細胞より腎臓発生因子の発現が強く、更にF-iPSと比べてK-iPSの方がその発現は強い傾向にあった。

③ 腎系統特異的分化誘導法の時間経過 (Real Time-PCR)

F-iPSとK-iPSを用いて、各未分化iPS細胞と腎系統特異的分化誘導iPS細胞における未分化因子、腎臓発生・分化因子の発現を比較検討した。(Fig. 3)

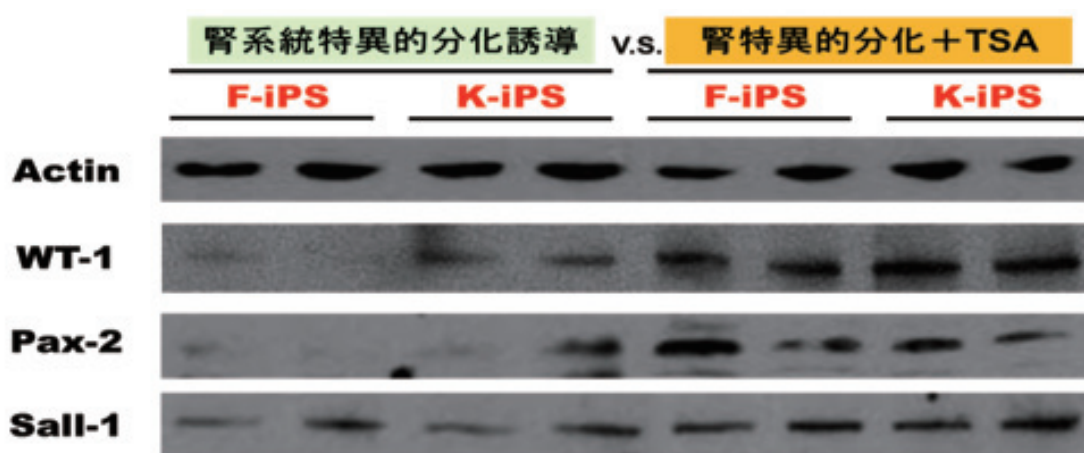


(Fig.3)

結果、両未分化iPS細胞は共に未分化因子の発現のみを認め、分化iPS細胞は誘導期間依存性に腎臓発生、分化因子の発現を強く認めた。いずれの腎臓発生、分化因子もF-iPSと比べK-iPSで強い発現を認めた。

④ 腎系統特異的分化誘導法へのEpigenetics修飾 (Western Blot)

Epigenetic memoryを有すると考えられるK-iPSに、Epigenetics修飾としてHistone Deacetylase (HDAC) 阻害剤であるTrichostatin A (TSA) を一緒に添加処置した。HDAC阻害剤は遺伝子発現が促進される方向と考えられる。F-iPSとK-iPSを用いて、腎系統特異的分化誘導およびTSA処置したiPS細胞における腎臓発生因子の発現を比較検討した。(Fig. 4)



(Fig.4)

結果、腎系統特異的分化誘導法とTSA処置したiPS細胞は、通常の腎系統特異的分化誘導法で培養したiPS細胞より腎臓発生因子の発現が強い傾向にあった。TSA処置でのF-iPSとK-iPSにおけるいずれの発現に違いはなかった。

考 察

iPS細胞の腎系統特異的分化誘導法の検討に関して、Nature Communicationの既報の方法はその有効性を確認できた。更にF-iPSと比べてK-iPSを用いた誘導の方が優れていた。その腎臓発生・分化因子の発現の相違は時間経過と共にK-iPSの方が増強された。これらの事よりEpigenetic memoryを有するK-iPSの方が腎臓再生には有利に働く可能性が示唆され、DNAメチル化の相違が関係しているものと考えられた。加えてEpigenetics修飾のためHDAC阻害剤 (TSA) を添加すると、いずれの腎臓発生因子の発現は増強したが、F-iPSとK-iPSを比較してその発現に相違はなかった。これらの事よりDNAコアヒストンのアセチル化による遺伝子制御が分化誘導に大きく働いているものと考えられた。以上よりiPS細胞の分化誘導機構において、Epigeneticsの重要性を見出した。

今後はEpigenetics制御を考慮したiPS細胞の分化誘導を、更なる腎系統特異的分化誘導法で試みる。またin vivoでの応用研究として組織内腎臓再生や腎疾患への細胞治療、新規CKD治療法を目指す。我々の研究が今後の再生医療に大きく貢献できるものとする。

要 約

慢性腎臓病 (CKD) 患者は日本において成人8人に1人がCKDであり、新規CKD治療法の開発は望まれる。近年、iPS細胞を用いた再生医療の新規治療も現実的なものとなってきているが、腎臓領域でのiPS研究は十分なものとは言えない。本研究はEpigenetic memoryを利用した腎臓由来ヒトiPS細胞 (K-iPS) を使い、更にHDAC阻害剤を使って既報の腎系統特異的分化誘導法での腎臓再生法を目指す。iPS細胞の腎系統特異的分化誘導法の検討に関して、K-iPSを利用した分化誘導法が腎臓発生・分化因子の発現を増強した。また、HDAC阻害剤 (TSA) を添加すると、いずれの腎臓発生因子の発現を増強した。以上より、Epigenetic memoryを有するK-iPSの利用によるDNAメチル化の相違、HDAC阻害剤の添加によるコアヒストンのアセチル化修飾、それらが及ぼすiPS細胞の分化誘導機構において、Epigenetics制御の重要性を見出した。

今後はEpigenetics制御を考慮したiPS細胞の腎系統特異的分化誘導にて新規CKD治療法を目指す。

文 献

1. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. 131 (5) : p. 861-72.
2. Kim, K., et al., *Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells*. Nature, 2010. 467 (7313) : p. 285-90.
3. Rogers, I., *Induced pluripotent stem cells from human kidney*. J Am Soc Nephrol, 2011. 22 (7) : p. 1179-80.
4. Song, B., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells from human kidney mesangial cells*. J Am Soc Nephrol, 2011. 22 (7) : p. 1213-20.
5. Zhou, T., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells from urine*. J Am Soc Nephrol, 2011. 22 (7) : p. 1221-8.
6. Song, B., et al., *The directed differentiation of human iPS cells into kidney podocytes*. PLoS One, 2012. 7 (9) : p. e46453.
7. Mae, S., et al., *Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells*. Nat Commun, 2013. 4: p. 1367.
8. Taguchi, A., et al., *Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables*

generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. Cell Stem Cell, 2014. 14 (1) : p. 53-67.

9. Takase, O., et al., *The role of NF-kappaB signaling in the maintenance of pluripotency of human induced pluripotent stem cells*. PLoS One, 2013. 8 (2) : p. e56399.