

# 慢性腎臓病に対する尿細管再生療法の開発に向けた ヒトES・iPS細胞由来尿細管上皮細胞誘導法の確立

慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科

助教 山口 慎太郎

(共同研究者)

慶應義塾大学医学部 救急科

講師 本間 康一郎

慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科

研究員 鈴木 さゆり

## はじめに

近年多くの疫学研究により20歳以上の成人の約20%が慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease; CKD)であり、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。CKDの発症機序は十分に解明されていないが、腎臓の多くの生理機能を担う近位尿細管細胞の障害がCKDのfinal common pathwayであると考えられている<sup>1)</sup>。そのため、ヒトES・iPS細胞から尿細管細胞への分化誘導法の確立は、CKD発症機序の解明・CKDの新たな治療法の開発に有用である。

我々の研究室では、尿細管細胞に特異的に発現するKidney Specific Protein (KSP)の細胞外ドメインを認識する抗KSPモノクローナル抗体(特許取得済み)<sup>2)</sup>を独自に作成済みであり、KSPに注目して尿細管細胞への分化誘導法の検討を行った。

## 方 法

### **【ヒトES細胞株の培養】**

尿細管細胞は、中胚葉由来であり、中間中胚葉、後腎間葉および上皮化の過程を経る細胞である。すなわち、ヒトES・iPS細胞から尿細管細胞へ分化誘導するためには、中胚葉系統への誘導が必要となる。申請者らの研究室では、以前より、ヒトES・iPS細胞から中胚葉系統への分化誘導研究を精力的に行っており<sup>3,4)</sup>、GSK-3β阻害剤を用い中胚葉への誘導を行った。その後中間中胚葉への分化を促進する増殖因子・培養条件を検討した。

具体的には、ヒトES細胞株(KhES-1)を、動物由来細胞を使用せずに誘導を行った。細胞塊にしたKhES-1をコラーゲンIコートディッシュに移し、GSK-3β阻害剤[(2'Z, 3'E)-6-bromoindirubin-3'-oxime']で3日間培養し、その後7日間尿細管分化培地で培養を行った。分化培地はrenal epithelial growth medium (REGM)、0.5% fetal bovine serum (FBS)、0.1% recombinant human epidermal growth factor (hEGF)、0.1% insulin、0.1%

hydrocortisone, 0.1% epinephrine, 0.1% triiodothyronine, 0.1% transferrin, and 0.1% gentamycin であった。この尿細管細胞への分化誘導過程において、腎発生関連遺伝子発現の網羅的解析および尿細管細胞に特異的に発現するKidney Specific Protein (KSP) の発現量を検討した。

### 【Flow cytometry】

分化誘導したヒトES細胞は、Trypsin-EDTA処理、機械的なピッペッティングの後、Fc blocker(BD Biosciences)、anti-KSP antibody、streptavidin-Alexa Fluor 647(Invitrogen)、(FITC) -conjugated monoclonal anti-TRA1-60 antibody (BD Biosciences)、propidium iodide (Sigma) と反応させた後、MoFlo (Beckman Coulter) でソーティングをおこなった。

### 【ヒトES細胞由来KSP陽性細胞の検討】

フローサイトメーターにより純化したKSP陽性細胞は以下の2通りの三次元培養条件において、尿細管管腔様構造を構築するか調べ、KSP陽性細胞が尿細管細胞の特性を有するかを検討した(図1)。

#### 三次元培養条件

① Wn-4シグナルを恒常的に分泌するNIH3T3-Wnt4細胞 (Harvard Stem Cell Institute、Dr. McMahonより分与) を $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>の密度まで培養した後mitomycin C処理をおこない、MatrigelをNIH3T3-Wnt4フィーダー上に置いた。フローサイトメーターで純化したKSP陽性細胞はMatrigel 上に蒔き、REGMで24-48時間培養した。

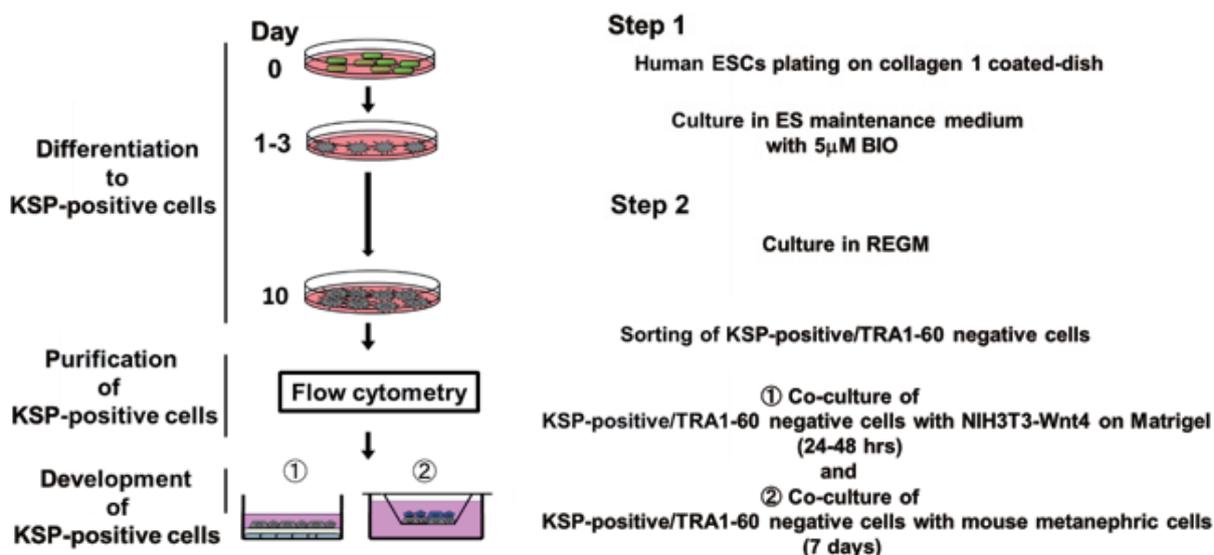


図1 ヒトES・iPS細胞から尿細管細胞への分化誘導方法

② E11.5胎仔マウスから抽出した $1 \times 10^5$  cellsの後腎間葉細胞とフローサイトメーターで分離したKSP陽性細胞 $1 \times 10^4$  cellsを共培養し凝集体を作成した。凝集体をair-medium interfaceで1週間REGMにより培養した。

## 結 果

### 【ヒトES細胞から尿細管細胞への誘導における腎発生関連遺伝子発現】

GSK-3 $\beta$ 阻害剤を用いた3日間の培養により、未分化マーカーであるOct3/4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2)。

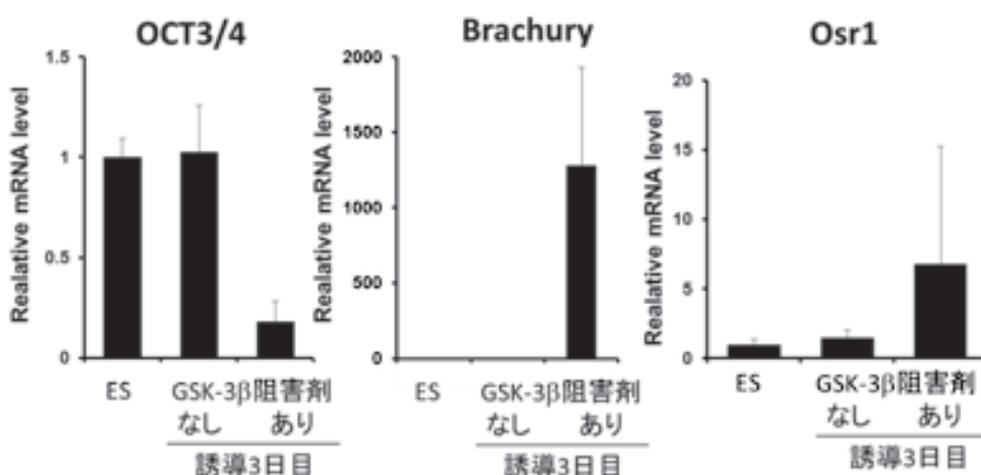


図2 誘導初期段階における腎発生関連遺伝子

その後、REGMによる培養過程で、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3)。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%のKSP陽性細胞の誘導に成功した(図4)。

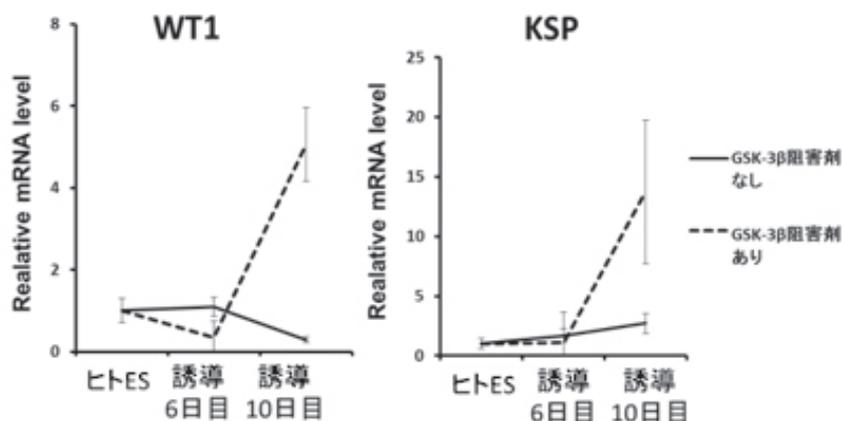


図3 誘導後期段階における腎発生関連遺伝子

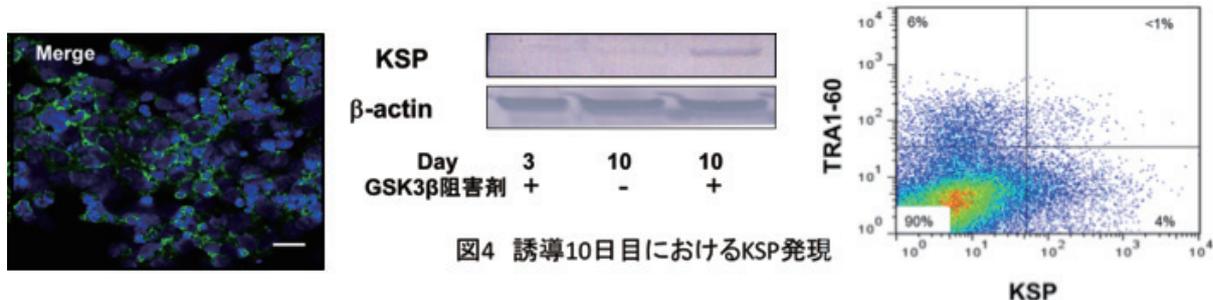


図4 誘導10日目におけるKSP発現

### 【ヒトES細胞由来KSP陽性細胞の検討】

#### ① KSP陽性細胞とNIH3T3-Wnt4細胞との三次元共培養

KSP陽性細胞は管腔様の構造を構築し、一部AQP1、megalin、AQP2などの尿細管マーカーを共発現した (図5a)。また、純化したKSP陽性細胞はOsr1が強発現していたが、Wnt4により上皮化が促進することが確認された (図5b)。

#### ② KSP陽性細胞とE11.5胎仔マウス由来後腎間葉細胞との三次元共培養

一部のKSP陽性細胞が管状の構造を形成し、その細胞は腎尿細管のマーカーであるLTL (Lotus Tetragonolobus lectin) が陽性であった (図6)。

図5 KSP陽性細胞とWnt4分泌細胞の3次元共培養

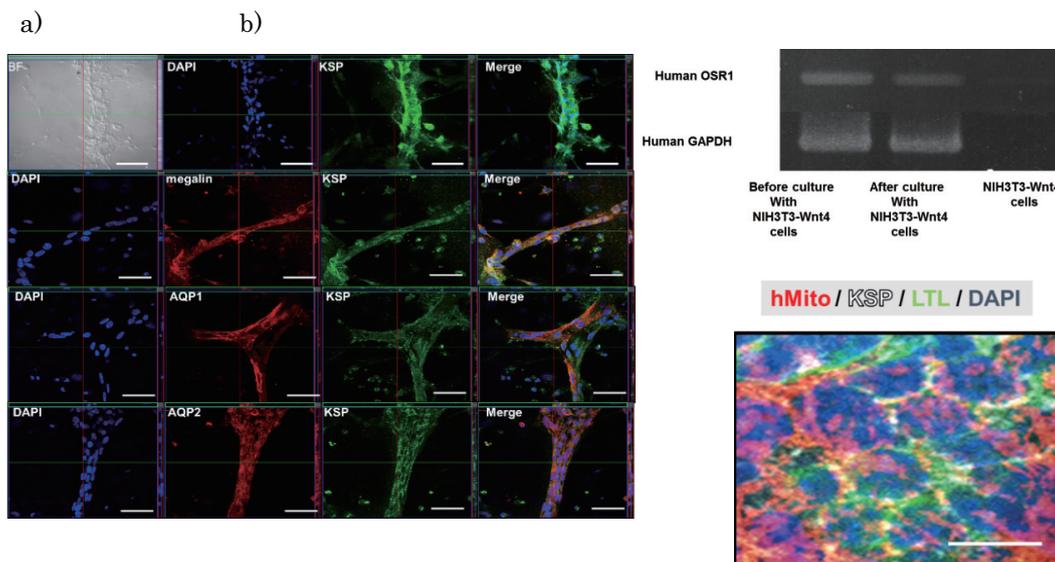


図6 KSP陽性細胞とマウス胎児由来後腎間葉細胞の3次元共培養

## 考察

我々は、独自に作成したKSP抗体を用いてKSP陽性細胞を純化することにより、ヒトES細胞から尿細管細胞に分化誘導することに成功した。我々の研究では、KSP陽性細胞がWnt4お

よびマウス胎児の腎臓細胞との共培養により管腔構造を形成し、さらに尿細管上皮細胞の指標を発現していることを確認した。これらにより、KSP陽性細胞が腎臓の3次元管腔構造を作る能力があることが示した。本研究を足掛かりに、CKD発症機序の解明・CKDに対する細胞移植療法の開発が期待される。

ヒトES・iPS細胞から中胚葉への誘導は、血管細胞への分化誘導に従事してきた我々の研究室の成果をもとに、GSK-3 $\beta$ 阻害剤を用いたcanonical Wnt/ $\beta$ -cateninシグナルを活性化することで行った<sup>3,4)</sup>。また、間葉系細胞から上皮細胞へ分化誘導するためには、Wnt activityを調節する必要があるため<sup>5,6)</sup>、誘導4日目からはGSK-3 $\beta$ 阻害剤を用いず、尿細管分化培地 (REGM) で培養を行った。

本誘導系においては、胚様体を経由せず、動物由来細胞を用いないことにより、10日間という短期間で尿細管の特徴を持つKSP陽性細胞への誘導が可能になったと考えられた。

フローサイトメーターにより純化したKSP陽性細胞は、Osr1を発現しており、間葉系の形質を持つと考えられた。また、成熟した尿細管セグメントマーカーは発現していなかった。したがって、KSP細胞は成熟した尿細管上皮細胞に向けてさらなる分化が必要であると考えられた。我々はマウスES細胞由来KSP陽性細胞をMatrigelを介して、Wnt4の強制発現細胞株であるNIH3T3-Wnt4細胞と共培養することにより管腔形成が促進され、さらに、これらの管腔構造においては、ネフロンセグメント特異的遺伝子の発現を認めることを確認している<sup>2)</sup>。そこで、本研究により得られたヒトES細胞由来KSP陽性細胞を同様の条件により培養したところ、KSP陽性細胞は近位尿細管マーカーであるMegalinとAQP1、集合管マーカーであるAQP2を共発現する管腔構造の形成を認めた。これらの結果は、KSP陽性細胞が管腔構造の形成により成熟尿細管の形質を獲得することを示している。また、マウス胎児の腎臓細胞と共培養したところ、一部の細胞で管状の構造を形成し、その細胞は腎尿細管マーカーが陽性であったことから、KSP陽性細胞が腎臓の3次元管腔構造を作る能力を有することが示された。

これらの研究成果は、ヒト多能性幹細胞から尿細管細胞への分化誘導方法を示したものである。in vitroで誘導された尿細管細胞を用いることで、CKDの病態解明の研究、細胞移植療法などの新たな治療法開発に向け非常に有力なツールとなると考えられる。

## 要 約

我々は、ヒトES細胞からGSK-3 $\beta$ 阻害剤およびREGMを用いた2段階のシンプルな培養方法により腎系統へ分化誘導し、抗KSP抗体を用いたKSP陽性細胞の純化により、ES細胞からin vitroでの尿細管細胞の分化誘導方法を確立した。ES細胞由来のKSP陽性細胞は、間葉細胞の遺伝子発現を有しており、Wnt4による管状構造形成を介して各セグメントの尿細管細胞に分化し成熟尿細管の形質を獲得した。また、マウス胎児の腎臓細胞と共培養することで、KSP陽性細胞が腎臓の3次元管腔構造を作る能力があることが示された。

ヒト多能性幹細胞からの尿細管細胞の分化誘導方法の確立は、尿細管細胞の障害をfinal

common pathwayとするCKDの病態解明・治療法開発にとって、有用なツールになると考えられる。

## 謝 辞

本研究の実施に当たり、調査研究助成を頂きました公益財団法人 大和証券ヘルス財団に心より御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology* 17 (1) :17-25; 2006.
- 2) Morizane R, Monkawa T, Fujii S, Yamaguchi S, Homma K, Matsuzaki Y, Okano H, Itoh H. Kidney specific protein-positive cells derived from embryonic stem cells reproduce tubular structures in vitro and differentiate into renal tubular cells. *PloS one* 8 (6) :e64843; 2013.
- 3) Yamaguchi S, Yamahara K, Homma K, Suzuki S, Fujii S, Morizane R, Monkawa T, Matsuzaki Y, Kangawa K, Itoh H. The role of microRNA-145 in human embryonic stem cell differentiation into vascular cells. *Atherosclerosis* 219 (2) :468-474; 2011
- 4) Homma K, Sone M, Taura D, Yamahara K, Suzuki Y, Takahashi K, Sonoyama T, Inuzuka M, Fukunaga Y, Tamura N, Itoh H, Yamanaka S, Nakao K. Sirt1 plays an important role in mediating greater functionality of human ES/iPS-derived vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 212 (1) :42-47; 2010.
- 5) Park J. S, Valerius M. T, McMahon A. P. Wnt/beta-catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. *Development ( Cambridge, England )* 134 (13) :2533-2539; 2007.
- 6) Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, Nishinakamura R. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 14 (1) :53-67; 2014.