

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題
(英語) Projects for Technological Development, Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
- 研究開発課題名 : (日本語) 慢性腎臓病に対する再生医療開発に向けたヒト iPS 細胞から機能的な腎細胞と腎組織の作製
(英語) Generation of functional kidney cells and tissues from human induced pluripotent stem (iPS) cells towards development of regenerative medicine strategy for chronic kidney diseases
- 研究開発担当者 (日本語) iPS 細胞研究所 教授 長船 健二
所属 役職 氏名 : (英語) Kenji Osafune, Professor, Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University
- 実施期間 : 平成 28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) 尿を産生する異所性腎組織の作製
開発課題名 : (英語) Generation of functional ectopic kidney tissues in vivo that generate urine
- 研究開発分担者 (日本語) 横浜市立大学大学院医学研究科 教授 谷口 英樹
所属 役職 氏名 : (英語) Hideki Taniguchi, Professor, Graduate School of Medicine, Yokohama City University

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

ヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞など胎児期の腎前駆細胞の分化誘導法と単離法の開発を行っている。H27 年度に開発した 2 次元の平面培養にて 80%以上の高効率で SIX2 陽性ネフロン前駆細胞を作製する分化誘導の過程で、複数の中間中胚葉とネフロン前駆細胞マーカーである WT1, SALL1 などの発現を確認した。さらに、ネフロン前駆細胞に対する上皮化因子を分泌することで知られる胎生マウス脊索組織との共培養を行ったところ、ヒト iPS 細胞由来ネフロン前駆細胞塊が自己組織化し、内部に Podocalyxin, Nephtrin, WT1 陽性の糸球体や LTL, CDH6 陽性の近位尿細管、CDH1 陽性の遠位尿細管などの構造を形成することを確認した。よって、新規分化誘導法で作製されたヒトネフロン前駆細胞がマウス胎仔内のネフロン前駆細胞と同等の糸球体や尿細管などへ分化する発生生物学的機能を有することが明らかとなった。

H26 年度に発表した虚血再灌流による急性腎障害(AKI)マウスモデルに対して治療効果を有するヒト iPS 細胞由来の OSR1(+)/SIX2(+)腎前駆細胞に対する表面抗原の候補を同定するために、他プロジェクトにて抗体パネルのスクリーニングを行い 4 種類の抗体の組み合わせを候補として見出した。そして、本研究においてこの抗体の組み合わせにて単離される細胞の大部分が OSR1(+)/SIX2(+)腎前駆細胞一致すること、さらに本単離法で単離された細胞は、前述の虚血再灌流による AKI マウスに移植すると、OSR1(+)/SIX2(+)細胞と同様に AKI 増悪を抑制する治療効果があることを確認した。

慢性腎臓病(CKD)に対する細胞移植療法を開発するために、腎線維化を起こす慢性腎不全モデルマウスの樹立を行っている。既報にある C57BL/6 マウスを用いた 2 種の CKD モデルを改良し、NOD-Scid マウスにおいて徐々に BUN と血清 Cre 値が上昇する慢性腎不全の惹起を確認した。また組織学的にも HE 染色による細胞浸潤、PAS 染色による円柱形成、PAM 染色による基底膜肥厚などの慢性腎不全の所見と MT(Masson trichrome)染色による線維化を確認し、線維化を来す慢性腎不全モデルの樹立に成功した。

これまでの腎被膜下への細胞移植では腎被膜のポケットを作ってそこに細胞を投与するため技術的に簡便ではなく、また十分な細胞数も移植できなかった。また一度移植を行うと、移植部位とホストマウスの周囲組織が癒着するため、複数回の移植が不可能であった。これらの問題を解決し CKD モデルマウスへの十分な細胞数を複数回移植可能とするために、腎被膜ポケットを使用しない新規の方法を開発した。

ヒト iPS 細胞から作製した腎細胞を用いて尿を産生する異所性腎組織の作製を行っている。本年度において独自の腎被膜下への移植法を開発し、免疫不全マウス腎被膜下へヒト iPS 細胞由来ネフロン前駆細胞を細胞塊として移植したところ、血管化されたヒト糸球体と尿細管を含むヒト腎組織の形成に成功した。また糸球体を形成する血管内皮はマウス CD31 抗原を発現していることを確認し、ホストマウス血流との統合を確認した。

We are establishing methods to differentiate human iPS cells into embryonic renal progenitor cells, such as nephron progenitors, and to isolate these progenitor cells. In fiscal year 2016, we confirmed that SIX2(+) nephron progenitors, which are induced at around 80% efficiency by our two-dimensional differentiation method established in fiscal year 2015, expressed marker genes for intermediate mesoderm and nephron progenitors, such as WT1 and SALL1. Furthermore, when co-cultured with embryonic mouse spinal cord tissues known to express epithelializing factors for nephron progenitors, the human iPS cell-derived nephron progenitors self-organized and formed kidney organoids that contain PODOCALYXIN(+)NEPHRIN(+)WT1(+) glomeruli, LTL(+)CDH6(+) proximal renal tubules and CDH1(+) distal renal tubules. These results suggest that nephron progenitors generated from human iPS cells with our new differentiation protocol have comparable developmental potential to counterparts in embryonic mouse kidneys.

In another project that uses an unbiased screening of antibodies, we identified a candidate combination of four monoclonal antibodies for cell surface antigens to isolate human iPS cell-derived OSR1(+)SIX2(+) renal progenitors that have therapeutic effects on mouse models for acute kidney injury (AKI) induced by ischemia reperfusion injury (Toyohara T. et al., 2015). In this project, we validated the isolation method and confirmed that most cells isolated by flow cytometry using the antibody combination overlapped the OSR1(+)SIX2(+) progenitor cell population and showed therapeutic effects for AKI mouse models induced by ischemia reperfusion injury.

In an attempt to develop a cell therapy strategy for chronic kidney disease (CKD), we are generating mouse CKD models with renal fibrosis. By modifying two previously reported methods for generating CKD models in C57BL/6 mice, we succeeded in inducing chronic renal failure state on NOD-Scid immunodeficient mice as marked by a gradual elevation of blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine levels. In addition, histological examination revealed that the mouse models developed cellular infiltration as evaluated by HE staining, urinary cast formation by PAS staining, thickening of the basement membranes by PAM staining and fibrosis by MT (Masson trichrome) staining, confirming the generation of chronic renal failure models with interstitial fibrosis. We also developed a novel transplantation method by which we can repeatedly transplant a sufficient amount of cells into the renal subcapsules of CKD mouse models by preventing post-operative adhesion of the grafts to the surrounding tissues.

Finally, we are generating ectopic kidney tissues *in vivo* that generate urine from human iPS cell-derived renal cells. In fiscal year 2016, we developed an original method for renal subcapsular transplantation and succeeded in generating renal tissues that contain vascularized glomeruli and renal tubules by transplanting human iPS cell-derived nephron progenitors into the renal subcapsules of immunodeficient mice. Moreover, we found that the vascular endothelia of the generated glomeruli expressed mouse CD31 antigen, confirming functional connection between the generated human renal tissues and host mouse vasculature.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 9 件、国際誌 1 件）

1. 辻本啓, 長船健二. 腎疾患に対する再生治療戦略. *Medical Science Digest*. 2017, 43, 1, 26-29.
2. 小高真希, 長船健二. iPS細胞と移植医療. *細胞*. 2017, 49, 1, 23-26.
3. 長船健二. 腎臓再生医療. *日本臨床腎移植学会50周年記念誌*. 2017, 310-315.
4. 長船健二. iPS 細胞による再生医療（総論）. *臨床薬学テキストシリーズ バイオ医薬品と再生医療*. 2016, 181-187.
5. 豊原敬文, 長船健二. iPS 細胞を用いた腎前駆細胞の作製と急性腎障害軽減の治療効果評価. *iPS 細胞の安全・高品質な作製技術*. 2016, 75-80.
6. Toyohara T, Osafune K. Novel Regenerative Therapy for Acute Kidney Injury. *Renal Replacement Therapy*. 2016, 2, 34.
7. 長船健二. iPS 細胞を用いた成人血管病関連疾患に対する再生医療開発と病態解析に関する研究. *最新医学*. 2016, 71, 7, 169-175.
8. 落合美由希, 長船健二. 腎疾患とiPS細胞. *臨床免疫・アレルギー科*. 2016, 65, 6, 588-592.
9. 末田伸一, 長船健二. iPS細胞を用いた腎疾患に対する再生医療の展望. *医学のあゆみ*. 2016, 257, 11, 1141-1145.
10. 松井敏, 長船健二. 再生医療の現状と展望. *新時代の臨床糖尿病学（下）*. 2016, 74, 2, 207-211.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. iPS 細胞を用いた腎疾患と糖尿病に対する再生医療の開発に向けて, 口頭, 長船健二, 第 130 回日本薬理学会近畿部会, 2016/11/19, 国内.
2. iPS 細胞由来の腎細胞を用いた ADME 研究の実現に向けて, 口頭, 長船健二, 日本薬物動態学会第 31 回年会, 2016/10/14, 国内.
3. iPS 細胞を用いた腎疾患に対する再生医療の開発に向けて, 口頭, 長船健二, 第 20 回腎間質障害研究会, 2016/9/10, 国内.
4. 霊長類を用いた再生医療評価システム, 口頭, 揚山直英, 鯉江洋, 藤城康世, 中山駿矢, 柴田宏昭, 片貝祐子, 金山喜一, 長船健二, 保富康宏, 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016/9/7, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. iPS 細胞を用いた腎疾患に対する再生医療の開発に向けて, 長船健二, 第 6 回広島腎疾患研究会, 2017/3/7, 国内.
2. iPS 細胞を用いた腎疾患と糖尿病に対する再生医療開発の現状と展望, 長船健二, 第 17 回全腎協東海ブロック青年交流集会 in 愛知, 2017/2/26, 国内.

3. iPS細胞を用いた腎疾患と糖尿病に対する再生医療の開発に向けて, 長船健二, 第17回枚方・寝屋川CKD研究会, 2017/2/9, 国内.
4. iPS細胞を用いた腎疾患と糖尿病に対する再生医療の開発に向けて, 長船健二, 第4回Tokyo Islet Research Conference, 2016/11/30, 国内.
5. iPS細胞を用いた腎疾患に対する再生医療の開発に向けて, 長船健二, Kumamoto Kidney & Translational Research Seminar (K²TRS), 2016/11/24, 国内.
6. iPS細胞を用いた腎疾患と糖尿病に対する再生医療の開発に向けて, 長船健二, 第70回富山腎・高血圧講演会, 2016/11/17, 国内.
7. Renal differentiation of iPSCs towards regenerative therapy and disease modeling, Osafune K, Life Science Workshop Series 2016 Induced pluripotent stem cells: applications and technologies for drug discovery, 2016/11/11, 国外.
8. iPS細胞を用いた腎臓病治療, 長船健二, 東京女子医科大学第34回公開健康講座, 2016/10/8, 国内.
9. Towards iPS cell technology-based regenerative therapy for kidney disease and diabetes, 長船健二, つくばグローバルサイエンスウィーク (TGSW2016), 2016/9/19, 国内.
10. 腎再生とベータ細胞再生の成果から見えたCKDと糖尿病の克服, 長船健二, 第37回金沢医科大学連携病院会議における特別講演, 2016/8/5, 国内.
11. iPS細胞を用いた腎疾患と糖尿病に対する再生医療の開発に向けて, 長船健二, 第13回やまと循環器連携懇話会, 2016/7/16, 国内.
12. 多発性嚢胞腎とiPS, 長船健二, 多発性嚢胞腎 Forum, 2016/6/26, 国内.
13. iPS細胞を用いた腎臓病と糖尿病に対する再生医療開発の現状と展望, 長船健二, 福井県腎友会第44回定期総会記念講演(県民公開講座), 2016/6/12, 国内.
14. iPS細胞を用いた腎臓病と糖尿病に対する再生医療の開発に向けて, 長船健二, NPO法人神奈川県腎友会創立40周年記念講演, 2016/5/22, 国内.
15. iPS細胞を用いた糖尿病と腎疾患に対する再生医療の開発, 長船健二, 全国講演会-New Wind for Diabetes and Complication-, 2016/4/10, 国内.
16. iPS細胞を用いた腎疾患と糖尿病に対する再生医療の開発に向けて, 長船健二, 第13回甲賀湖南CKD研究会, 2016/4/9, 国内.

(4) 特許出願
該当なし。

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 技術開発個別課題
(英語) Projects for Technological Development

研究開発課題名： (日本語) 慢性腎臓病に対する再生医療開発に向けたヒト iPS 細胞から機能的な腎細胞と腎組織の作製
(英語) Generation of functional kidney cells and tissues from human induced pluripotent stem (iPS) cells towards development of regenerative medicine strategy for chronic kidney disease

研究開発担当者 (日本語) 横浜市立大学・教授・谷口英樹

1. 所属 役職 氏名： (英語) Yokohama City University Graduate School of Medicine
Professor, Hideki Taniguchi

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 尿を産生する異所性腎組織の作製
開発課題名： (英語) Generation of ectopic kidney tissue producing urine.

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：京都大学 iPS 細胞研究所 教授 長船 健二 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願