

京都大学教育研究振興財団助成事業
成果報告書

平成26年8月7日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会長 辻 井 昭 雄 様

所属部局・研究科 iPS細胞研究所長船研究室

職名・学年 研究員

氏名 荒岡 利和

助成の種類	平成25年度・若手研究者在外研究支援・在外研究長期助成		
研究課題名	「ハンチンソン-ギルフォード早老症」疾患特異的iPS細胞を使った腎臓老化メカニズムの解明		
受入機関	Salk institute for biological studies (San Diego, USA), Juan Carlos Izpisua Belmonte Lab.		
渡航期間	平成25年7月16日 ~ 平成28年7月15日 (助成対象期間/当初1年)		
成果の概要	タイトルは「成果の概要/報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有()		
会計報告	交付を受けた助成金額	2,500,000 円	
	使用した助成金額	2,500,000 円	
	返納すべき助成金額	0 円	
	助成金の使途内訳	米国ビザ交付費用 (SEVIS含)	30,000 円
		渡航時航空運賃	100,000 円
		宿泊費 (San Diego到着時6泊)	90,000 円
		宿泊費 (アパートメント賃料・12か月)	2,000,000 円
交通費 (12か月)		100,000 円	
	日当 (12か月)	180,000 円	
当財団の助成について	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 貴財団からの貴重な助成により、円滑に留学環境を整えることができ感謝しています。今後の助成については、1年間に加えて、さらに2年間の助成の枠を作っていただけると、今後留学を目指す方たちにとって、さらに有意義になるように思います。その際に、初年度の1年間の成果をもとに、さらにもう1年助成を延長できるかどうか決定するというシステムがあれば、留学する人たちの研究意欲、競争力をさらに向上させるのではないかと思います。		

平成 25 年度・在外研究長期助成の援助を受け、平成 25 年 7 月 16 日より米国カリフォルニア州サンディエゴ市にあるソーク研究所の Dr. Juan Carlos Izpisua Belmonte 研究室に留学し、平成 26 年 8 月 7 日現在も、同研究所にて研究を継続中である。研究助成を受けた過去 1 年間の成果の概要を報告する。

まず、最初に留学先の都市であるサンディエゴについてであるが、この地方は一年中雨が少なく気候は温暖で、素晴らしい海岸線を有するとともに、治安がよく、街の人も親切で、家族も安心して生活することができるため、研究に集中することができるという利点があった。さらに、ソーク研究所の周辺にはスクリプス研究所やカリフォルニア大学サンディエゴ校や、バイオ系の様々な企業やベンチャーが研究所を構えており、共同研究や研究についてディスカッションをする上でも、非常に恵まれた環境であった。

次に、留学先のソーク研究所は、1963 年にポリオワクチンの開発で知られる Dr. Jonas Edward Salk によって創設された生物医学系の研究所である。同研究所は、過去に 5 人のノーベル賞受賞者を輩出し、現在の教授陣は各研究分野の最先端を走っているといわれ、Nature をはじめとした世界的な雑誌に、毎年何本も研究成果が掲載されるほど、活発に研究の発展に寄与している。私の所属する研究室の主任研究者である Dr. Juan Carlos Izpisua Belmonte は、世界的な幹細胞研究の権威であり、様々な分野から臓器再生及び幹細胞を使った治療法の開発に向けて、積極的にアプローチを続けている。最近では、ヒト iPS 細胞を腎臓特異的な細胞の一つである尿管芽に分化誘導する方法を世界に先駆けて報告したり、幹細胞研究に老化研究と遺伝子ターゲティング技術を融合させた分野を新たに開拓したり、その研究範囲は多岐にわたっている。また、Dr. Juan Carlos は基礎研究にバックグラウンドを持つものの、常に臨床応用のためには何が必要かを最初に問う研究者であり、バックグラウンドとして腎臓内科医である自分にとっては、議論や研究の方向性が自分の考えと非常に近く、さらに、Dr. Juan Carlos が現在、力を入れている分野が、腎臓再生と老化研究であったことも研究をすすめていく上で、非常にプラスに働いている。

研究課題である、『「ハンチンソン・ギルフォード早老症」疾患特異的 iPS 細胞を使った腎臓老化メカニズムの解明』に関して、当初はこの早老症特異的 iPS 細胞を腎臓細胞に分化誘導する予定であったが、現在報告されているヒト iPS 細胞から腎臓細胞を誘導する方法は、誘導効率が著しく低く、研究を進めていく上で大きな支障となっていた。そこでまず、私は新たな高効率の腎臓細胞の誘導法の開発に着手した。また、腎臓の老化現象は幹細胞の老化が病態の本質であると仮説をたてており、その証明のために、腎臓組織幹細胞の探索と、その老化現象についても同時に研究をすすめてきた。この 1 年間で次のことを明らかにした。

1) ヒト iPS 細胞から腎臓細胞を効率よく誘導する新たな方法の開発

「ハンチンソン・ギルフォード早老症」疾患特異的 iPS 細胞を、腎臓細胞に誘導し腎臓の老化現象について検証する予定であったが、現在報告されている腎臓細胞を誘導する方法の誘導効率が低く、研究が困難であった。そこで、私が留学した際に、3 か月前からすでに同僚がヒト iPS 細胞から腎臓細胞を誘導する新たな方法の開発に着手していたため、研究室内共同研究

を開始した。当初、共同研究者の誘導法は、従来の腎臓細胞を誘導する方法による誘導効率を超えるのは困難であった。しかし、私が有する、京都大学 iPS 細胞研究所において研究していた、腎臓の胎生初期の胚葉組織の一つである中間中胚葉の効率的な誘導方法 (Araoka, T. *et al.*, 2014) の知見を基に、様々な増殖因子の組み合わせを試み、さらに、ラットの正常腎臓を脱細胞化した Scaffold を用いた新たな誘導方法を開発することによって、従来の方法より短時間で高効率に腎臓細胞を誘導できるようになった。この研究成果は、現在投稿準備中である。

また、次のステップとして、この誘導方法をさらにブラッシュアップして、「ハンチンソン・ギルフォード早老症」疾患特異的 iPS 細胞に適用し、腎臓の老化現象のメカニズムを解明する予定である。

2) Lgr5 陽性細胞の腎臓組織幹細胞としての可能性

腎臓の老化現象の本質は、腎臓幹細胞の老化現象であると仮説を立てており、それを立証するために、まず、腎臓組織幹細胞の探索を行った。腎臓組織幹細胞は、SP 細胞や CD133+/CD24+細胞、Slow-cycling 細胞、間葉系細胞などが報告されているものの、まだその存在と機能については議論がある。そこで、腎臓組織幹細胞探索への最初のアプローチとして、マウスにおいて、腎臓虚血再灌流モデル、一側尿管結紮モデル及び 5/6 腎臓摘出モデルを作製し、腎臓が障害を受けた際に、様々な臓器で報告されている組織幹細胞マーカー遺伝子の発現が増加するかどうかを検証した。腎臓虚血再灌流モデルは急性腎臓病のよいマウスモデルとして認識されており、さらに、5/6 腎臓摘出モデル及び高度な腎臓の線維化を伴う一側尿管結紮モデルは、慢性腎臓病のマウスモデルとして知られている。それらのマウスモデルの腎臓内で組織幹細胞の mRNA の変化を時系列で確認したところ、腸管の再生に深く関わる、組織幹細胞マーカーの一つである Lgr5 (Barker, N. *et al.*, 2007) の発現が、腎臓障害とともに増加していることを見出した。

次に、この Lgr5 の発現について詳細に検証するために、Lgr5 が発現すると、GFP が誘導される 12 週齢の Lgr5-EGFP-ires-CreERT2 マウス(以下 Lgr5-EGFP マウス)に、一側尿管結紮を施したところ、成体マウスの腎臓では発現しない Lgr5 が (Barker, N. *et al.*, 2012)、障害された腎臓の中に再び発現してくることを、フローサイトメトリーで確認した。また、この Lgr5-EGFP マウスを Cre 依存性の組み換えによって確率論的に複数のうちの一つの蛍光タンパク(RFP, YFP, GFP)を発現するレポーターマウス (R26R-Confetti マウス) を交配させて、Lgr5-EGFP-ires-CreERT2/R26R-Confetti マウス (以下 Lgr5/Confetti マウス) を作製した。Lgr5/Confetti マウスは、Lgr5 が発現した細胞が将来どの細胞に分化するのかをトレースできる優れたマウスである。このマウスの新生仔期 P1 の腎臓の下極を切除し、タモキシフェン投与によって Cre を発現させると、4 日後に切断面周囲に Lgr5 陽性細胞に由来を持つ細胞が集まり、尿細管細胞に分化していることが分かった。

以上の結果は、Lgr5 陽性細胞が腎臓組織幹細胞の候補であることを示しており、現在、マウス腎臓への移植実験によって、組織幹細胞としての機能を確認中である。また、Lgr5 陽性細胞に老化ストレスを与えることによって、in vitro において、腎臓組織幹細胞の老化現象を示せないか検証中である。

3) 組織幹細胞の老化現象

上記の *Lgr5* 陽性細胞に加えて、腎障害モデルマウスの腎臓内で、さらに別の幹細胞マーカー遺伝子 X の発現増強を認めた。(遺伝子名及びタンパク名については特許の関係上、記載の許可が下りていないため、この場では遺伝子 X、タンパク X と記載した) この遺伝子 X は上記の、腎臓虚血再灌流モデル、一側尿管結紮モデル及び 5/6 腎臓摘出モデルにおいて強力に発現が増強していた。また、慢性腎障害モデルにおいて、老化の phenotype の一つを反映するとされる senescence-associated β -galactosidase (SA β -galactosidase) が染色されることから、慢性腎障害と老化現象の間には密接な関係があることを見出すとともに、SA β -galactosidase の染色部位とタンパク X の発現が一致していることを世界で初めて示した。これは、慢性腎障害において、腎臓内にある幹細胞に老化という現象が引き起こされている可能性を示した画期的な研究成果である。現在このタンパク X 陽性細胞の機能について詳細に確認中である。

4) 組織幹細胞を標的とした新たな早期腎障害マーカーの創出

急性腎障害モデルマウス及び慢性腎障害モデルマウスの病態形成初期の遺伝子発現の変化を確認したところ、組織幹細胞マーカーとして知られる、いくつかの遺伝子群の発現が増加していることを見出した。このことは、これらの遺伝子群が急性腎臓病及び慢性腎臓病の早期診断マーカーに応用できる可能性を示唆する重要な所見であった。これら遺伝子発現を臨床応用に早期に結び付けるために、カリフォルニア州で尿中 Exosome 内の mRNA の発現を安価で高純度に測定する技術を持つ企業に共同研究を持ちかけ、最近、共同研究がスタートした。(まだ正式に MTA の締結が済んでいないため、企業名は記載せず) Exosome は血漿、尿、唾液など非侵襲的に得られる体液に存在しており、臓器由来の細胞成分(タンパク、核酸情報など)を含んでいる。今回見出した遺伝子群は、腎障害早期に腎臓内で発現が上昇しているため、尿中 Exosome 内からこれらの mRNA が検出できる可能性は極めて高いと考えられる。現在、腎障害モデルマウスから尿サンプルを回収し、データを蓄積するとともに、将来的には Dr. Juan Carlos が提携するバルセロナの病院や、京都大学をはじめとして日本の様々な病院からヒトのサンプルを集めて、新たな早期腎障害マーカーを創出したいと考えている。

過去1年間に於ける研究成果の概略は以上である。これらの研究成果を今後さらに発展させていく予定である。

この1年間の間に、ヒト iPS 細胞から腎臓細胞を誘導する新たな誘導法を開発できたこと、慢性腎障害と老化と腎臓組織幹細胞の関係性を新たに見出すことができたこと、さらには、組織幹細胞マーカーを使った早期腎障害診断マーカーの創出の第一歩を踏み出すことができたのは、京都大学教育研究振興財団からの貴重な助成によって、早期に研究環境を整備することができたからであり、私を助成対象に選んでくれた財団に心より感謝したい。

平成 26 年 8 月 7 日

荒岡 利和