

Title	ヒト多能性幹細胞及び肝細胞からの腎尿管細胞への分化誘導法の開発
Sub Title	Renal tubular cells derived from human ES cells and hepatocytes by transcription factor administration
Author	平塚, 健(Hiratsuka, Ken) 洪, 実(Ko, Minoru)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
Abstract	<p>我々は, TF-inducible hES細胞株から得られたデータのin silico解析から, 腎前駆細胞及び腎臓Organoidへの分化誘導を促す転写因子群を明らかにした。4転写因子をヒトES細胞に導入後, 2日で92%と高効率に腎前駆細胞を誘導することに成功した。さらにこの腎前駆細胞に別の4因子を添加し3次元培養を行う事で, 14日間で足細胞, 近位及び遠位尿管からなる腎Organoidを分化誘導することに成功した。RNA-seq法での解析では,</p> <p>腎Organoidはヒト腎臓遺伝子発現プロファイルと類似した遺伝子発現パターンを示し, ヒト腎臓と近い性質を持った腎臓組織が誘導できていることが示された。</p> <p>We utilized the transcription factor (TF)-inducible human ES lines, analyzed correlation of gene expression response to the induction of human TFs with tissue-specific gene expression in silico, and identified candidate TFs for differentiating towards renal lineages. Based on in-silico analysis, we have identified a set of four TFs that induce nephron progenitor cells (NPCs) and another set of four TFs that help differentiate toward pretubular aggregate-like cells. Two days after the transfection of the first set of four TFs together into hESCs, NPCs were induced efficiently (~92%). Subsequent administration of the second set of four TFs transfection induced differentiation into pretubular aggregate-like cells. On day 14, epithelial characteristic changes and multi-segmented kidney structures containing podocyte, proximal tubules, and distal tubules were observed in 3D cultures. RNA-Seq analysis also showed the global expression profile closely resembled human kidney profile.</p>
Notes	研究種目: 研究活動スタート支援 研究期間: 2016 ~ 2017 課題番号: 16H07177 研究分野: 腎臓再生
Genre	Research Paper
URL	<a href="http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16H07177seika">http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16H07177seika</a>

平成30年6月2日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07177

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞及び肝細胞からの腎尿細管細胞への分化誘導法の開発

研究課題名(英文) Renal tubular cells derived from human ES cells and hepatocytes by transcription factor administration

研究代表者

平塚 健 (Hiratsuka, Ken)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80594481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、TF-inducible hES細胞株から得られたデータのin silico解析から、腎前駆細胞及び腎臓Organoidへの分化誘導を促す転写因子群を明らかにした。4転写因子をヒトES細胞に導入後、2日で92%と高効率に腎前駆細胞を誘導することに成功した。さらにこの腎前駆細胞に別の4因子を添加し3次元培養を行う事で、14日間で足細胞、近位及び遠位尿細管からなる腎Organoidを分化誘導することに成功した。RNA-seq法での解析では、腎Organoidはヒト腎臓遺伝子発現プロファイルと類似した遺伝子発現パターンを示し、ヒト腎臓と近い性質を持った腎臓組織が誘導できていることが示された。

研究成果の概要(英文)：We utilized the transcription factor (TF)-inducible human ES lines, analyzed correlation of gene expression response to the induction of human TFs with tissue-specific gene expression in silico, and identified candidate TFs for differentiating towards renal lineages. Based on in-silico analysis, we have identified a set of four TFs that induce nephron progenitor cells (NPCs) and another set of four TFs that help differentiate toward pretubular aggregate-like cells. Two days after the transfection of the first set of four TFs together into hESCs, NPCs were induced efficiently (~92%). Subsequent administration of the second set of four TFs transfection induced differentiation into pretubular aggregate-like cells. On day 14, epithelial characteristic changes and multi-segmented kidney structures containing podocyte, proximal tubules, and distal tubules were observed in 3D cultures. RNA-Seq analysis also showed the global expression profile closely resembled human kidney profile.

研究分野：腎臓再生

キーワード：ヒトES細胞 転写調節因子 リプログラミング 腎臓再生

### 1. 研究開始当初の背景

尿管間質は腎線維化における Final common pathway にあり、腎予後には尿管間質障害が深く関与することが示されている (Risdon et al, Lancet 1968)。また、尿管 S3 セグメントには各セグメントへの多分化能を有する腎臓由来組織幹細胞が存在することも明らかになっており (Kitamura et al, FASEB J 2005)、腎再生において尿管細胞の果たす役割は極めて大きい。申請者らはこれまで Kidney specific protein (KSP) 陽性細胞を分化マーカーとして、ヒト胚性幹細胞 (ES) 細胞の腎構成細胞への分化誘導方法を研究してきた。この中で、マウス ES 細胞において Activin 及び Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) が腎臓の尿管全般に発現している KSP の発現を促進し、さらに KSP 陽性細胞を純化することで管腔構造をもった尿管様細胞の誘導に成功した (Morizane et al, BBRC 2009, PlosOne 2013)。しかし、本分化誘導方法では、胚様体 (EB) 形成ステップを経る必要があること、抗体で選別するため時間がかかる上、十分な細胞数が得られない、という問題がある。

一方、研究協力者の洪教授らは、ヒト細胞の遺伝子発現調節ネットワークの構造と動態を明らかにするため、単一のヒト転写因子を自在に発現誘導できるヒト ES 細胞株 (TF-inducible ES 細胞株) を樹立している。既に 400 種類以上の細胞株が樹立できており、次世代シーケンサーを用いた RNA シークエンス法による遺伝子発現誘導 48 時間後の転写産物測定も、目標の 500 転写因子全全てのトランスクリプトーム解析が終了した。さらに、各転写因子遺伝子をプラスミドやウイルスベクターを用いず、導入遺伝子が細胞のゲノムに取り込まれないフットプリントフリーな遺伝子導入方法として、修飾合成 mRNA による細胞分化誘導技術を開発しており、一部の細胞では、非常に高効率且つ短時間での分化誘導技術の開発に成功している。また、我々は腎尿管細胞に関しても洪教授らの作成した網羅的転写因子遺伝子解析データから、腎尿管細胞分化における新規マスター制御因子の同定に成功し、ある転写因子 1 つの過剰発現により尿管細胞様細胞への分化誘導に成功している。

そこで、申請者はこれまでの一貫した ES 細胞に対する手法をもとに腎尿管発生における分子メカニズムの解明を進めるべく、以下の研究を立案した。

### 2. 研究の目的

(1) ヒト ES 細胞から、機能的に高度なヒト腎尿管様細胞への分化誘導方法の確立

我々は、ヒト腎尿管細胞のマスター制御因子である転写因子 X の同定に成功し、その過剰発現により AQP1 や MEGALIN、KSP といった近位尿管細胞のキャラクターを持った分化細胞を誘導することに成功している。しかし、腎尿管は極めて多くのセグメントか

ら成り立ち、移植に耐え得る機能を保持した、より機能的に高度な尿管細胞を得ることが必要と考える。そこで本研究では、網羅的転写因子遺伝子解析をさらに進め、これまで開発してきた ES 細胞からの尿管様細胞の誘導技術をもとに、転写因子 X に加え、同定した複数の転写因子の修飾合成 mRNA を用いてヒト ES 細胞から、より洗練されたヒト腎尿管様細胞を作成することを目的とする。(2) ヒト肝細胞から、ヒト腎尿管様細胞への直接分化誘導方法の確立

これまで、肝細胞は内胚葉系であり、腎構成細胞は中胚葉系の細胞集団であるため、異なる発生系譜を辿ることが常識となっていた。しかし、我々の研究において同定した腎尿管細胞のマスター制御因子である転写因子 X は肝細胞の発生においても重要な因子であることが知られている。また、自治医科大学の研究グループではブタ臓器脱細胞化技術を用いて脱細胞化した腎臓にブタ肝細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞を充填しこれら腎移植用グラフとの生体内での機能維持に関する報告をしている (日本再生医療学会総会 2016)。以上より、内胚葉系、中胚葉系という枠を超えたエピジェネティックな遺伝子発現制御の再構成が可能と考えた。そこでこれまでの研究でマスター制御因子の類似性が予想された肝細胞から腎尿管細胞への hepatorenal reprogramming を目指し、既知のトランスクリプトームデータ、TF-inducible hES 細胞バンクデータより in silico 解析を行う。その上で、hepatorenal reprogramming に必要と予測された転写因子群をコードする修飾合成 mRNA を添加することによりヒト肝細胞から、ヒト腎尿管様細胞を作成することを行う。特に、肝細胞は生体内において再生されることが実証されていることから、将来的に自身の生検した肝細胞から腎構成細胞の構築が可能であれば移植による拒絶反応、免疫抑制剤を使用することなく移植可能な腎臓を得る手段として画期的であると考えられる。

### 3. 研究の方法

本研究では、腎構成細胞のマスター制御因子の探索、特定した転写因子をヒト ES 細胞及び肝細胞に導入することで、より機能的に高度な腎構成細胞を短時間且つ高効率に生産する技術開発を行う。研究計画は下記に従って行う。

(1) TF-inducible ES 細胞データ (ヒト TF 500 遺伝子分) の in silico スクリーニングによる尿管細胞分化マスター制御因子の同定

(2) 修飾合成 mRNA 添加による、より洗練された高度な ES 細胞由来尿管様細胞の樹立技術開発

(3) KSP 陽性細胞の純化とそれらの 3 次元培養

(4) TF-inducible ES 細胞データと既存の肝細胞、尿管細胞のトランスクリプトームデータを組み合わせたより高度な in silico 解析により hepatorenal reprogramming に必須の

## 転写因子の同定

### (5)修飾合成 mRNA 添加によるヒト肝細胞由来尿細管様細胞の樹立技術開発

#### (1)TF-inducible ES 細胞バンクデータの in silico スクリーニングによる尿細管細胞分化マスター制御因子の同定

研究協力者の洪教授らは、piggyBac トランスポゾンを用いてヒト ES 細胞に外来性の転写因子を遺伝子導入する事により、発現誘導可能なヒト転写因子 ES 細胞株を網羅的に作製している。導入した転写因子は、ドキシサイクリンの添加によって発現を誘導できる。洪教授らは、最終的には最低 500 転写因子分のヒト ES 細胞株 (1,500-2,000 細胞株) の作成を目標とし、転写因子発現誘導 48 時間後の転写産物量の変化を、次世代シーケンサー HiSeq2500 を用いた RNA シーケンス法で解析している。得られた大規模トランスクリプトームデータは、世界最先端のインフォマティクス解析手法で GEO(Gene expression Omnibus)データベースに存在する各臓器、組織ごとの遺伝子発現プロファイルと詳細に比較することで、単一の転写因子の強制発現によって起こる細胞分化方向を、精緻に予測するための大規模データを作成中である。本研究では、GEO データベースより各腎構成細胞の遺伝子発現プロファイルデータを得て、システム医学で作成中のヒト ES 細胞バンクデータとの比較・解析を行う。これによって、尿細管細胞への分化に重要な役割が推察される転写因子群を同定する。システム医学講座では、既にヒト転写因子約 500 遺伝子分のトランスクリプトーム解析データを保有しているが、このデータベースではヒト尿細管細胞への分化誘導が推察される新規転写因子が複数同定されており、既に、ある特定の転写因子 X の過剰発現により AQP1 や MEGALIN、KSP といった近位尿細管細胞のキャラクターを持った分化細胞を誘導することに成功している。しかし、1 因子のみの導入では機能的に高度に分化した尿細管細胞には至っておらず、新たに同定した複数の転写因子を組み合わせて段階的に遺伝子導入することが必要と考えられる。

#### (2)修飾合成 mRNA 添加による、より洗練されたヒト ES 細胞由来尿細管様細胞の樹立

上記で明らかになった候補転写因子を、実際にヒト ES 細胞に導入して尿細管様細胞へ分化誘導し培養維持する方法を開発する。

##### 修飾 mRNA の合成

遺伝子導入方法としては、修飾合成 mRNA をリポフェクション法で細胞に導入する。mRNA は宿主ゲノムを変化させないフットプリントフリーな遺伝子導入法である。

ヒト ES 細胞への遺伝子導入及び尿細管様細胞の分化誘導

精製した複数の修飾 mRNA をヒト ES 細胞に導入する。修飾 mRNA を用いた場合、導入後 12-18 時間で最大のタンパク質発現を示した

後、急速に代謝されるため、複数回の遺伝子導入を行う(Warren et al, Cell Stem Cell 2010)。既に先行実験にて明らかになっている転写因子 X の他に尿細管マスター制御因子をコードすると考えられる複数個の修飾 mRNA の組み合わせを変え、細胞表面マーカーである KSP の発現をマーカーとして腎構成細胞方向への分化を確認することで、最適な尿細管マスター制御因子の組み合わせを特定する。洪教授は、マウス ES 細胞において、既に修飾合成 mRNA で転写因子を導入することで短時間かつ高効率な肝細胞、筋細胞、神経細胞への分化誘導に成功している(Yamamizu et al, Stem Cell Reports 2013)。ヒト ES 細胞についても同様に、TF-inducible ES 細胞バンクから細胞分化方向を決定づける転写因子の大規模解析が進行しており、同時に修飾 mRNA 合成のための鑄型となるヒト転写因子組み込み済みベクター、700 遺伝子分以上を保有している。ヒト修飾合成 mRNA 遺伝子導入に関しては、複数の蛍光タンパク遺伝子を使った先行実験で、有効性が確認された。

##### 分化誘導細胞の解析

分化細胞の形態の確認とともに、尿細管様細胞への分化を確認するため RT-PCR 法やウエスタンブロット法、尿細管セグメント特異的マーカーによる免疫染色法などで確認する。

#### (3)KSP 陽性細胞の純化と 3 次元培養

これまで、マウス ES 細胞から尿細管様細胞への分化誘導に関しては、自製した抗マウス KSP モノクローナル抗体を用い管腔構造を持つ尿細管様細胞を作成する独自技術の開発に成功した(Morizane et al, BBRC 2009, PlosOne 2013, PCT 国際特許出願済み出願番号: PCT/JP2012/074577)。そこで、本研究では新たに抗ヒト KSP 抗体を作成し KSP 陽性細胞を純化し、マトリゲル上での 3 次元培養も試みる。

#### (4)TF-inducible ES 細胞データと既存の肝細胞、尿細管細胞トランスクリプトームデータを組み合わせたより高度な解析により hepatorenal reprogramming に必須の転写因子の同定

腎尿細管細胞のマスター制御因子である転写因子 X は、肝細胞の培養条件下では Alb や AFP といった肝細胞特異的マーカーの発現を誘導し、肝細胞へと分化を促進することを研究協力者洪教授らは実証している。このことは中胚葉系と内胚葉系という発生の系譜に関わらず、エピジェネティックな標識を再構築することで肝細胞から腎尿細管細胞へと分化を進める可能性を示唆している。そこで、研究協力者である若林らと共に GEO データベースよりヒト肝細胞と腎尿細管細胞のトランスクリプトームデータを得て、これらを比較し、その差分を埋める転写因子をヒト ES 細胞バンクデータとの比較・解析を行うことにより hepatorenal reprogramming に深く関

わると考えられる転写因子を同定する。

(5)修飾合成 mRNA 添加によるヒト肝細胞由来尿細管様細胞の樹立技術開発

hepatorenal reprogramming に関わると考えられる転写因子をコードする修飾 mRNA を既に研究室で所持しているヒト肝細胞株 HuH-7 にリポフェクション法で導入する。内胚葉系から中胚葉系への形質転化、さらには腎構成細胞方向への分化を確認する。

#### 4. 研究成果

ヒト修飾合成 mRNA 遺伝子導入に関しては、複数の蛍光タンパク遺伝子を使った先行実験において、単回のトランスフェクションで 90%と高効率に蛍光タンパクが発現することを示し、その有効性を確認した。

次に、TF-inducible hES バンクを用いて、in silico による遺伝子発現比較解析から、ヒト ES 細胞から腎構成細胞細胞への分化に重要な役割が推察される転写因子群を同定した。腎臓前駆細胞への分化を促進すると考えられる転写因子を 14 個、ネフロン上皮細胞への分化を促進すると考えられる転写因子を 17 個を同定することができた。

腎臓前駆細胞への分化を促進すると考えられた 14 個の転写因子のうち、SIX2<sup>+</sup>SALL1<sup>+</sup>となる最適な組み合わせを qPCR 及び免疫染色、Flow cytometry を用いて検証したところ、これらのうち 4 因子を導入することで、誘導開始後わずか 2 日間で 92%と高効率に SIX2<sup>+</sup>SALL1<sup>+</sup>ネフロン前駆細胞を誘導することができた。

さらにネフロン前駆細胞からネフロン上皮細胞への分化を促進するため、in silico 解析で得られた候補転写因子 17 種類を、合成 mRNA を用いて上記で得られた SIX2<sup>+</sup>SALL1<sup>+</sup>のネフロン前駆細胞に過剰発現させた。低接着 dish にて 3 次元培養を行った結果、これらのうち 4 因子を導入することで(既に明らかにしている転写因子 X を含む)、14 日間で免疫染色上、最も効率良く PODXL 陽性足細胞、LTL 陽性近位尿細管、CDH1 陽性遠位尿細管からなるネフロン様構造を誘導できる事が分かった。

illumina 社 HiSeq2500 を使用し、RNA シークエンス法で誘導したオルガノイドの遺伝子発現プロファイルを解析し、腎臓の既知の遺伝子発現プロファイルと詳細に比較したところ、誘導した腎臓オルガノイドは、糸球体上皮、近位尿細管、遠位尿細管という多数のセグメントに特異的な遺伝子を発現しており、さらにヒト成人腎臓の遺伝子発現プロファイルと類似していた。

さらに、誘導した腎臓オルガノイドの機能性を評価するため、下記の機能検証を行った。

(1)腎毒性アッセイ、(2)近位尿細管のアルブミン再吸収能評価、(3)近位尿細管細胞でのアミノ酸再吸収能を反映する  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT) の活性評価にて、誘導された尿細管が複数の機能を有している事が示された。現在、論文投稿中である。

また、当初、hepatorenal reprogramming に関わると考えられる転写因子をコードする修飾 mRNA を既に研究室で所持しているヒト肝細胞株 HuH-7 にリポフェクション法で導入することによって肝細胞から腎構成細胞への分化誘導を検討したが、候補転写因子である 2 因子の同定には成功したものの、完全に分化した細胞への転写因子の導入効率が低く、導入方法につき現在再検証を行なっている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 4 件)

(1)平塚健, 門川俊明, 秋山智彦, 中武悠樹, Sravan Kumar Goparaju, 小田真由美, 木村寛美, 納富奈々, 佐藤紗恵子, 山口慎太郎, 森實隆司, 洪 繁, 洪 実, 伊藤 裕: 転写因子をコードする修飾合成 mRNA を用いた腎前駆細胞及び腎オルガノイドへの分化誘導法の開発, 第 61 回日本腎臓学会学術総会 2018

(2)Ken Hiratsuka, Toshiaki Monkawa, Shintaro Yamaguchi, Ryuji Morizane, Shigeru B.H. Ko, Hiroshi Itoh, Minoru S.H. Ko: Multi-segmented kidney organoids derived from human ES cells by stepwise transcription factor administration, Kidney Week 2017(ASN)

(3)平塚健, 門川俊明, 秋山智彦, 中武悠樹, Sravan Kumar Goparaju, 小林紗恵子, 納富奈々, 木村寛美, 山口慎太郎, 森實隆司, 鈴木さゆり, 洪 繁, 洪 実, 伊藤 裕: ヒト尿細管マスター制御因子の検索と、転写因子をコードする修飾合成 mRNA を用いたヒト多能性幹細胞から尿細管様細胞への分化誘導方法の開発. 第 7 回分子腎臓フォーラム (2016)

(4)Ken Hiratsuka, Toshiaki Monkawa, Shintaro Yamaguchi, Ryuji Morizane, Shigeru B.H. Ko, Hiroshi Itoh, Minoru S.H. Ko: A novel method to differentiate human ES cells into renal tubule-like cells by a combination of transcription factors administration, Kidney Week 2016(ASN)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

平塚 健 (HIRATSUKA, Ken)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教  
研究者番号: 80594481

##### (2)研究協力者

洪 実 (KO, Minoru)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・教授  
研究者番号: 50631199