

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10629

研究課題名(和文)セルソーティングシステムを用いた選択的な腎前駆細胞の分化と腎再生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of selective renal progenitor differentiation and renal regeneration mechanism using cell sorting system

研究代表者

中根 明宏(Nakane, Akihiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70464568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Pax2遺伝子導入ES細胞をアクチビンAとレチノイン酸添加の条件で分化させ、各種遺伝子発現をPCR法により評価し、BMP7、Ret、Pax8、aquaporin-1、Podocinの発現亢進を認めた。免疫染色においてもaquaporin-1の発現を確認できた。Pax2遺伝子を発現させたEBsをPax2とaquaporin-1で二重標識し、セルソーティングを行ったところ、両者の陽性細胞の増加を確認することができた。以上から、Pax2遺伝子を強制発現させることで、一部の腎構成細胞あるいは前駆細胞の構成比率が増加し、ES細胞から腎細胞への分化が誘導されたと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Pax2 transgenic ES cells were differentiated under the condition of addition of activin A and retinoic acid. Expression of various genes was evaluated by PCR method, and expression of BMP 7, Ret, Pax 8, aquaporin-1, and Podocin was enhanced. Expression of aquaporin-1 was also confirmed in immunostaining. EBs expressing the Pax2 gene was double-labeled with Pax2 and aquaporin-1 and cell sorting was carried out. It was possible to confirm increase of positive cells of Pax2 and aquaporin-1. From the results of this study, it was considered that the constitution ratio of some renal constituent cells or progenitor cells increased, and differentiation from ES cells to renal cells was induced by expressing the Pax2 gene.

研究分野：泌尿器科

キーワード：再生医療 セルソーティング 腎臓

### 1. 研究開始当初の背景

末期腎不全から血液透析を行う患者数は増加し、年間約1兆円以上の医療費や根本的治療の腎移植のドナー不足が問題視されている。解決策として臨床応用され始めている再生医療の開発が注目されているが、発生や構造が複雑な腎臓では再生医療の研究が他の臓器に比べ遅れている。一方で私たちは、様々な腎尿路疾患、生殖器疾患で失われたり、先天的に傷害された臓器の治療法を確立するために、組織再建、細胞培養の技術を用いた研究を行ってきた。その中で、特にすべての胚葉に分化可能な胚性幹細胞(ES細胞)の研究を行い、腎臓を再生することを試みた。腎・尿管発生に重要な働きをしている遺伝子である Pax2 に着目し、この遺伝子の発現調整することが可能な ES 細胞を作製し、腎構成細胞へ分化させる研究を継続的に行ってきた。現在まで、Pax2 遺伝子導入 ES 細胞から尿細管に発現する AQP1 蛋白陽性の細胞が分化できることを報告した。以上から、これまでの研究成果を進展させた本研究による研究成果が新たな腎臓の再生医療発展の糸口になると考えた。しかし、これらの分化させた細胞を選択的に採取することや、腎に移植して腎機能を改善させる為に必要な細胞を集める方法については有用な報告は未だなかった。ES 細胞を用い、組織本研究において、これらの成果を進展させて、ES 細胞を腎構成細胞に分化させ、それらの細胞をセルソーティングシステムである Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) でより選択的に回収培養し、必要な細胞のみ生体に移植を行う新しい腎臓の再生医療の技術の確立を試みることができると考えた。

### 2. 研究の目的

近年、本研究室以外からも ES 細胞から尿細管組織への分化が報告された。しかし、腎臓は1種類の細胞だけでその機能を発揮し維持できる臓器ではないため、その他の細胞、特に腎機能の最も重要な機能を司る糸球体細胞の分化が重要である。本研究において、腎・尿管発生に重要な働きをしている遺伝子である Pax2 に着目し、この遺伝子導入した ES 細胞を作製し、そこから腎構成細胞を分化させることを考えた。その際に問題となるのが、ES 細胞をそのまま生体に移植すると teratoma (奇形種)を形成するため、すべての胚葉の成分が混在した組織となってしまう腎組織を形成することはできない点であった。

本研究では、発生の初期に重要な遺伝子を導入し、その発現を調整することで ES 細胞を未分化のまま維持し培養することと、必要に応じて実験系で分化させることが出来る細胞を用いることが可能なメリットがある

考えた。そこで、まず確立された Pax2 遺伝子導入 ES 細胞を in vitro で培養、ある程度分化させた状態で、FACS を行うことで未分化な ES 細胞を除去することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) Pax2 ES 細胞の培養

マウスより確立された ES 細胞の一つである MG1.19 から得た細胞系を用いた。培養条件は 5% CO<sub>2</sub>、37 °C で、培養液は DMEM もしくは Glasgow MEM に 10% FCS、10<sup>-4</sup>M 2-メルカプトエタノール、non-essential aminoacid、1mM sodium pyruvate、1000U/ml LIF (leukemia inhibitory factor: ESGRO<sup>®</sup>) を加えたものを使用した。培養した ES 細胞を 0.25%トリプシン EDTA 溶液にて回収し、1 x 10<sup>7</sup> 個の細胞に対し 20 µg の Pax2 遺伝子を組み込んであるプラスミド DNA を用意し、electroporation 用キュベット (BIO-RAD Gene Pulser cuvette<sup>®</sup>) 内に混ぜ入れて、960 µF、250mV の条件で electroporation 法を行い、遺伝子を導入した。48 時間、前述の培養条件にて培養後、Neomycin、Puromycin などの耐性遺伝子に対応した薬剤を含む培養液に替えると遺伝子導入された (同時に耐性遺伝子を発現している) ES 細胞のみが生存し選択された。

#### 2) Pax2 ES 細胞の分化

作製した Pax2 遺伝子導入 ES 細胞を LIF を除いた培養液中で hanging drop 法を用い embryoid body (胚様体: EB) を形成させ、分化させた。5 日後に EB を再度ディッシュに付着させ、分化を進めて、時間の経過とともに細胞を回収し、発現してくる遺伝子に変化がないかどうかを RT-PCR 法を用い確認する。EB 自体 (0 日目)、5 日目、10 日目の複数の時期で細胞塊を回収した。

#### 3) RT-PCR による発現遺伝子の確認

ディッシュに平面培養した ES 細胞および EB を 0.25%トリプシン EDTA 溶液にて回収し、TRISol<sup>®</sup>、クロロホルムにて mRNA を抽出、2-プロパノール、エタノールにて沈殿させ回収する。回収した Pax2 ES 細胞および EB にまずは Pax2 遺伝子が発現しているかどうかを RT-PCR 法を用い確認する。Oligo dT primer、SuperScript<sup>®</sup> キット、dNTP mix にて逆転写反応を行う。得た cDNA を鋳型にして導入遺伝子のセンスおよびアンチセンスプライマーで PCR 反応を行い、増幅 DNA バンドの有無などで判断する。同様に他の腎発生の各段階で発現してくる遺伝子に変化がないかどうかを SYBR<sup>®</sup> green による定量 PCR 法を用い確認した。

#### 4) 腎構成細胞の抽出

Pax2 抗原で Pax2 陽性細胞を標識し、また近位尿細管マーカーである aquaporin-1 の抗原を標識した、二重標識により FACS を行った。

#### 4. 研究成果

近年急激に様々な医療技術の進歩が報告されているが、末期慢性腎不全に対する治療としては、ドナー不足である腎移植治療の現状から主な治療は人工透析である。透析治療は国の財政を圧迫し、また患者の生活への負担も大きい。人工透析に変わるような治療への糸口となる研究が必要とされていると考えた。そこで本研究では、非常に複雑な構造と多くの細胞群により構成される腎臓を再生するために、当研究室で確立している腎・尿管発生に重要な働きをしている遺伝子である Pax2 を遺伝子導入した ES 細胞から腎構成細胞を分化させることで新しい腎臓の再生医療の技術を確認することを試みた。

以前当研究室で行った検討では、Pax2 遺伝子導入 ES 細胞を分化させると、aquaporin-1 遺伝子(近位尿細管マーカー)の発現亢進を認めることが分かり報告した。そこで作成に成功し、確立した Pax2 遺伝子導入 ES 細胞において、胚様体(EBs)を形成させ、中胚葉分化因子であるアクチビン A とレチノイン酸(RA)を(1)非添加、(2)添加の条件別に EBs の平面培養を行った。EBs をそれぞれ回収し、腎臓発生に関連する各種遺伝子発現を PCR 法により評価した。さらに、糸球体や尿細管など腎構成細胞の有無について免疫染色法を用い検討した。(1)アクチビン A・RA 非添加群で Pax2 遺伝子を発現させた EBs では、integrin 8 遺伝子(間葉細胞に発現する接着因子)と aquaporin-1 遺伝子の発現亢進を認めた。免疫染色では、aquaporin-1 陽性細胞数の増加を確認することができた。(2)アクチビン A・RA 添加群においては、BMP7 遺伝子(間葉細胞から尿細管への分化に関連する因子)、Ret 遺伝子(GDNF と協調し尿管芽形成する因子)、Pax8 遺伝子(Pax2 遺伝子と協調し尿管形成する因子)、Podocin 遺伝子(糸球体の足細胞のマーカー)などの発現亢進を認めた。ただし免疫染色では Podocin の発現は確認できなかった。以上から、Pax2 遺伝子を強制発現させることで、一部の腎構成細胞あるいは前駆細胞の構成比率が増加し、ES 細胞から腎細胞への分化が誘導されたと考えられた。

そこで、免疫染色で確認可能であった、aquaporin-1 を用い、アクチビン A・RA 非添加の条件下で分化させた Pax2 遺伝子を発現させた EBs を Pax2 と aquaporin-1 で二重標識し、FACS を行ったところ、両者の陽性細胞の増加を確認することができた。この結果から、この分化条件で一定の近位尿細管の前駆細胞が得られている可能性が示唆された。この方法で得られた細胞を免疫不全マウスに移植したところ、分化した細胞塊が確認できた。免疫染色では Pax2 の発現が確認できたが、他の腎構成細胞を示すものでは染色できなかった。この結果から、細胞の分化が進みすぎている、移植する時期が乖離して

いた可能性が示唆された。これらの点を改善させるためには、もう少し前段階で発現しているマーカーでの FACS が必要であると考えられた。その点を改善させることで、これらの結果から、中胚葉分化因子との協調により、腎を構成する多様な細胞への分化が可能と考えられ、腎発生メカニズムの解明や将来の腎再生医療への応用が期待できると考えられた。

#### 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)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Nishio H, Mizuno K, Kato T, Moritoki Y, Kamisawa H, Kurokawa S, Nakane A, Okada A, Yasui T, Hayashi Y. A rare case of epididymal abscess in an infant treated successfully with needle aspirator. Urology Case Reports 2017. 13: 26-27.
2. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Kamisawa H, Nishio H, Moritoki Y, Nakane A, Maruyama T, Okada A, Tozawa K, Kohri K, Yasui T, Hayashi Y. Robot-assisted laparoscopic pyeloplasty for ureteropelvic junction obstruction: comparison between pediatric and adult patients-Japanese series. Journal of Robotic Surgery 2017. 11: 151-157.
3. Kurokawa S, Mizuno K, Nakane A, Moritoki Y, Nishio H, Kamisawa H, Kubota Y, Okada A, Kawai N, Hayashi Y, Yasui T. Adrenal Neuroblastoma in an Adult: Effect of Radiotherapy on Local Progression after Surgical Removal. Case Report in Urology 2016.

[学会発表](計 3 件)

1. Nishio H, Mizuno K, Kato T, Moritoki Y, Umemoto Y, Hayashi Y, Yasui T: Gene function analysis of Kdm5a, a histone demethylase, in testicular dysfunction.

第 105 回日本泌尿器科学会総会、  
2017.4.21-24

2. 中根 明宏、水野 健太郎、林 祐太郎、窪田 裕樹、守時 良演、西尾 英紀、加藤 大貴、安井 孝周：小児先天性水腎症に対する術式の比較検討 多因子比較から検討した低侵襲手術の選択。第 105 回日本泌尿器科学会総会、2017.4.21-24

3. Nishio H, Kato T, Mizuno K, Moritoki Y, Kamisawa H, Kurokawa S, Nakane A, Maruyama T, Hayashi Y, Yasui T: Kdm5a inhibits gonocyte differentiation to spermatogonial stem cells by suppressing Ret gene function via epigenetic regulation. American Urological Association Annual Meeting 2017. 2017.5.12-16

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中根 明宏 (NAKANE AKIHORO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：70464568

### (2) 研究分担者

西尾 英紀 (NISHIO HIDENORI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：10621063

水野 健太郎 (MIZUNO KENTARO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：70448710

丸山 哲史 (MARUYAMA TETSUJI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：50305546

林 祐太郎 (HAYASHI YUTARO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：40238134

安井 孝周 (YASUI TAKAHIRO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：23592375

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし