

令和元年6月12日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15214

研究課題名(和文) in vivo細胞再構築による腎臓微細環境の解明

研究課題名(英文) Investigation of kidney microenvironment by cell reconstruction in vivo

研究代表者

金井 正美 (KANAI, Masami)

東京医科歯科大学・統合研究機構・教授

研究者番号：70321883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトジフテリア毒素とその受容体を用いて、マウスの特定細胞のみを任意の時期に死滅させることが可能である。本トランスジェニックマウスは閉鎖環境に外来細胞を置換することが可能となるため、そこで、AMH-TRECKに加えて、ROSA26-iDTR(全身性のiDTR-Tg)とLtf(Lactoferrin)-iCre Tgの組み換えトランスジェニックマウスラインを作成した。Ltf-TRECKは、生後60日成熟雄で、精のう腺、精巣上体、精管の上皮細胞で発現する。本申請では、これらのトランスジェニックマウスにジフテリア毒素を性成熟後投与し、異種細胞移植が可能な系の作出を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精細管は管状の閉鎖空間で、比較的免疫寛容を受け易い環境を有する。AMH-Treck Tgマウス(GFP KI)や、Ltf/ROSA26-iDTRトランスジェニックマウスに中胚葉系上皮様細胞などの移植条件を決定し、その後、免疫寛容を呈するNODマウスへ遺伝背景のバッククロスすることで、ヒトiPS由来細胞異種細胞の移入しいては、xenotransplantationの確立へと展開させることが可能となる。将来的には、ヒトiPS細胞から腎各種細胞へのin vivo分化系の探索の糸口となり、その結果、社会的意義が大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：By use of the combination of human diphtheria toxin (DT) and its receptor, it is possible to kill the certain cells in vivo. We have succeed to development of transgenic lines to replace host cells to recipient new transgenic mouse (Tg) line. We have tried to the combination of ROSA26-iDTR and Ltf (Lactoferrin)-iCre Tg. Ltf is expressed in seminal vesicles, epididymis and epithelial cells of the vas deferens in 60-day-old mature males. Administration of diphtheria toxin in this line made it possible to replace these epithelial cells after sexual maturation. We have succeeded in creating a system that allows xenogeneic cell transplantation using a new DT line.

研究分野：発生工学

キーワード：再生 ジフテリア毒素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病患者は生活習慣病との関連も深く、日本では 1,330 万人 8 人に 1 人とされている。また末期腎不全患者への透析治療には年間 1 兆 5000 万が費やされ根治方法は臓器移植のみである。腎臓は 20 種類の細胞からなる複雑な臓器構成であり、細胞のターンオーバーが遅いため、腎疾患治療は再生医療において最も困難な分野であり、再吸収を伴う尿生成課程は複雑で、そのプロセス再生が重要である。

## 2. 研究の目的

腎臓透析や移植手術が必要な末期腎不全患者は 30 万人、年間 4-5% 増加しているものの、腎疾患治療は再生医療において最も困難な分野の 1 つである我々は、ジフテリア毒素と受容体を用いて、特定の細胞のみを任意の時期に死滅させ、精細管内閉鎖環境に外来細胞を置換することが可能な新規トランスジェニックマウス (AMH-Treck Tg) と Ltf-TRECK Tg の 2 ラインを開発した。本申請では、TRECK-Tg マウスに精巣と同じオリジンである腎臓細胞を移植・定着させる新規の方法開発を目標とし、新規トランスジェニックマウス開発を作出する。

## 3. 研究の方法

### (1) AMH-Treck Tg への幼弱細胞の移入

レシピエントに AMH-Treck Tg(line94-GFP)3週令雄マウス、ドナーには H2B-mCherry マウスを用いることで移植細胞を識別する (図)。AMH-Treck Tg マウスに 4 µg/kgDT を腹腔内投与し 4 日後 (4日放置することで DT 無毒化を行う) に移植する。生後 8 日齢の腎臓細胞を精細管内へ移植し、7-10 日後サンプリング、4% PFA 固定し、組織学的観察を実施した。

### (2) NOD-Scid IL2R null マウスへのバッククロス

AMH-Treck Tg 雄マウス(N6)と NOG 雌マウスで体外受精-胚移植を実施する。得られた産子 (♀:♂) 作出後、この内の Tg をゲノムチェックし NOD マーカー 100% の雄個体を算出する。Scid と sirpa などサテライトマーカーを確認した後、Scid をホモにするため、この Tg NOD100% 雄個体と NOG 雌マウスで体外受精-胚移植を実施した。

### (3) AMH-Treck Tg 以外の TRECK マウスの作出

Wnt7a-Cre、Pgr-Cre、Ltf-iCre (Daikoku T et al., Endocrinology 2014) の 3 種類のマウスを、Cre 依存的に tdTomato を発現する ROSA-tdTomato と掛け合わせ、組換えが生じた部位が赤色蛍光で可視化されるマウスを作製した。Ltf-iCre は雄では精巣上皮、雌では子宮内膜上皮特異的に発現するため、毒素受容体である霊長類ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (HB-EGF) を発現する ROSA-iDTR マウスと交配した。8 週齢から 18 週齢で毒素の濃度検討、および投与回数 (1 回または 2 回) の検討を行った。また、Ltf-iCre; ROSA-iDTR に ROSA-tdTomato を交配することで、毒素受容体が発現している部位が赤色蛍光により可視化されるマウス (Ltf-iCre; ROSA-iDTR; ROSA-tdTomato) を作製した。

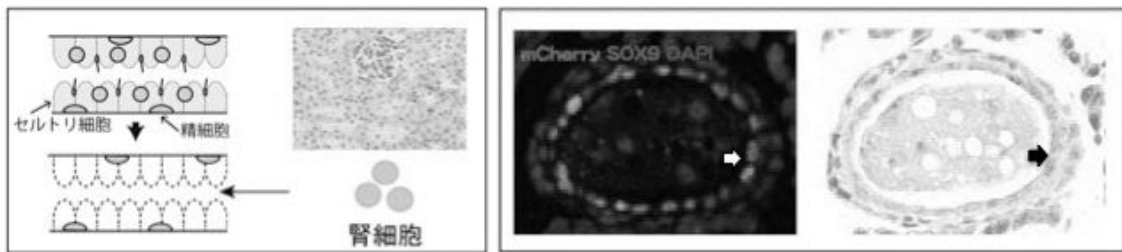


図)AMH-TRECK マウスへの移植細胞の定着像

#### 4. 研究成果

慢性腎不全の治療において、臓器移植に変わる細胞レベルでの再生移植治療が待ち望まれている。再生医療分野を担う Ectopic な移植系としては 2012 年に Komori らにより、マウスリンパ節への肝臓細胞、胸腺細胞、膵臓細胞の移植が報告され(Nat Biotech. 30;976-988. 2012)、クローンブタを用いた異種間移植 (Yokote S et al., PRNAS 2015) など報告は数少ない。我々の開発した AMH-Treck Tg マウスは、ヒトジフテリア毒素 (DT) を投与することで、雄精細管内のセルトリ細胞 (支持細胞) を死滅させ、外来支持細胞に置換することが可能である。胎児発生過程で、泌尿器系と生殖器系は同じオリジンである中間中胚葉から発生する。preliminary なデータであるが、AMH-Treck Tg マウスを DT 処理後 4 日目に、精細管内へ生後 8 日マウス腎臓細胞を移植すると、その 10 日後に外来細胞が定着した。観察された置換細胞は mCherry 陽性、セルトリ細胞マーカー Sox9 陰性、腎臓マーカー Pax2 陽性を示した。

本マウスへの未分化腎臓幹細胞を AMH-Treck Tg マウスの遺伝子背景を免疫不全症マウス (NOD) にバッククロスしたマウスへ移入し、最終的には、SPF ヒト化マウスフローにて NOD-Scid IL2R null マウスへ最終的に遺伝背景を移行し、ヒト細胞 xenotransplantation 異種間移入することを可能とするために、AMH-Treck Tg 雄マウス (N6) と NOG 雌の掛け合わせを実施した。現在、産子 24 匹 (♀11:♂13) 作出し、この内の Tg11 匹 (♀3:♂8) から NOD マーカー 100% の雄個体 3 匹を得ている。Scid をホモにするため、この Tg NOD100% 雄個体と NOG 雌マウスで体外受精-胚移植を実施中である。今後、ヒト細胞定着率を HLA 並びに MHC の variation に関して、PCR モニタリングシステムを構築し、最終的には高品質のヒト化マウスの維持を目指している。

AMH-Treck Tg 以外の TRECK マウスの作出として、今回、Ltf-iCre; ROSA-iDTR マウスを作出した。Ltf-iCre は雄では精巣上体上皮、雌では子宮内膜上皮特異的に発現する。サンプリングが容易である子宮内膜上皮を用いて、Ltf-iCre; ROSA-iDTR マウスを使用し、細胞死を誘導可能な毒素濃度の検討、ならびに子宮内膜上皮の継時的変化を観察した。投与濃度の検討は、0-4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の範囲の 4 段階で行った。毒素 1 回投与 4 日において、0-0.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  では上皮に変化がみられないのに対し、4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  では上皮構造の消失が確認できた。この結果から毒素の投与濃度を 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  に決定した。今後、これらの新規トランスジェニックマウスを用いることで、異種細胞、異種間移植が可能となることが予想される。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Kishi K, Uchida A, Takase HM, Suzuki H, Kurohmaru M, Tsunekawa N, Kanai-Azuma M, Stephen A. Wood and Kanai Y. Spermatogonial deubiquitinase USP9X is essential for proper spermatogenesis in mice. *Reproduction*. 154(2):135-143. 2017

### 〔学会発表〕(計 3 件)

1. 平松竜司、村田千晴、三浦健人、平手良和、金井正美、金井克晃、Amh 欠損雄マウスを用いたミューラー管遺残症における遺残子宮の比較病態解析、「第 41 回日本分子生物学会」、2018 年 11 月 28 日-30 日、パシフィコ横浜
2. 潮田裕紀、高瀬比菜子、上村麻実、平手良和、平松竜司、金井正美、金井克晃、luminal flow を形成する精巢網上皮でのマウス Sox17 遺伝子の役割、「第 161 回日本獣医学会」、2018 年 9 月 11 日-13 日、つくば国際会議場
3. 村田千晴、三浦健人、東山大毅、平手良和、金井正美、平松竜司、九郎丸正道、金井克晃、Amh 欠損雄マウスにおける遺残子宮の形態学的解析、「第 160 回日本獣医学会」、2017 年 9 月 13 日-15 日、鹿児島大学

### 〔図書〕(計 2 件)

1. 金井正美:「ジュンケイラ組織学 第 5 版(原書 14 版)」第 6 章 脂肪組織、丸善出版、2017 年 8 月、翻訳分担
2. 木曾康郎・日下部健・金井正美:「獣医組織学 第七版」第 15 章 胎盤、学窓社、p.219-224、2017 年 3 月、翻訳分担

### 〔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 <http://www.tmd-cea.jp/eam/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。