

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19790710

研究課題名 (和文) 胎児腎臓幹細胞分化の分子基盤解明とそのアッセイ法の開発

研究課題名 (英文) Analysis of molecular mechanism and development of assay system in differentiation of renal embryonic stem cells

研究代表者

臼井 丈一 (USUI JOICHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：70447340

研究成果の概要：幹細胞医療の臨床実現化の際に、発達臓器の分化制御プロセスを詳細に解析し、幹細胞の再生プロセスに応用することは重点課題である。胎児腎臓における幹細胞システムの導入を評価のためのアッセイ系の確立を目指し研究を遂行した。ES 細胞、iPS 細胞と腎臓欠損マウスを用いた発達腎臓の *in vivo* アッセイ系および腎臓発生に必須な分子である *wnt4* 蛋白過剰発現フィーダー細胞との共培養でのコロニーアッセイを行う *in vitro* アッセイ系の再現に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：腎臓発生、幹細胞、再生医学

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞や ES 細胞を含む幹細胞医療の臨床実現化を念頭に置いた際に、発達臓器の分化制御プロセスを詳細に解析・把握することで、幹細胞の再生プロセスに応用することは重点的な課題と思われる。しかし、再生医学という観点で、腎臓は、他の臓器と比較し、構成細胞の種類が多い点 (数十種類)、生理学的に高度な機能を担っている点等、再生することが難しい臓器と位置付けられている。そのため、発達腎臓の分化プロセスの解明は他臓器と比較し重要視されている。すなわち、腎臓の再生医療の臨床実現のためには、胎児

腎臓 (後腎間葉) の発生プロセスを解明する必要があり、その研究基盤としてまず後腎間葉における幹細胞・前駆細胞レベルの高度かつ安定した純化方法の開発は必須である。分化プロセスへの幹細胞システムの導入を評価するにあたり、クローナルな *in vitro* および *in vivo* での分化アッセイ系の確立を目指し研究を遂行している。

一方、本邦で開発、世界に発信された iPS 細胞の出現に伴い本研究期間内に幹細胞学研究を取り巻く現状は本研究期間内で劇的に変化してきた。この時代背景に敏感に対応することは必要と判断し、胎児腎臓幹細胞と

同時に ES 細胞および iPS 細胞を主体に腎臓発生・再生研究を遂行することと研究計画を多少変更している。

2. 研究の目的

幹細胞医療等の再生医学研究の臨床実現化を最終目的とし、胎児腎臓（後腎間葉）の発生プロセスを解明することを本研究の目的と位置付けた。

(1) これらの分化プロセスへの幹細胞システムの導入を評価するにあたり、クローナルな *in vivo* での分化アッセイ系の確立を目標とする。このアッセイ系の開発には、腎臓欠損の表現系を呈する遺伝子改変マウスおよびキメラマウス作成を含む高度な胚操作技術を利用している。

(2) 同時に *in vitro* での分化アッセイ系の確立を目標とする。腎臓発生において後腎間葉細胞のネフロンへの上皮化の必須な遺伝子と報告されている *wnt4* 遺伝子の過剰発現培養細胞を利用している。

(3) これらの *in vivo* および *in vitro* でのアッセイ系を用いた後腎間葉における幹細胞・前駆細胞レベルの高度かつ安定した純化方法の開発を目的とする。まず、第一に後腎間葉細胞の表面抗原に対するモノクローナル抗体とフローサイトメトリーを用いた網羅的アッセイを計画し、後腎間葉における細胞群の選別に関する解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞（ドナー細胞：ES 細胞、iPS 細胞）と腎臓欠損マウス（*sall1* 遺伝子ノックアウトマウス・ホモ接合体）との間でキメラマウスを作成することにより、腎臓を置換することが可能か否か検討する。具体的には、初期胚（胚盤胞）に ES 細胞等の幹細胞を注入することでキメラマウスを作成する手法の応用であり、一般にキメラマウスアッセイや *blastocyst complementation* と呼ばれている。この手法により初期胚に注入した幹細胞による欠損臓器の全ての置換が可能であることが証明されれば、A. 成熟ネフロンへの分化能を有する幹細胞の同定を可能とすること（腎臓発生や幹細胞のアッセイ法としての有用性）、B. 遺伝子改変幹細胞を使用することにより腎臓発生に重要な遺伝子の同定が可能となること、C. 生理機能的、形態学的に複雑な腎臓を丸ごと作成する方法の開発へとつながること（ドナー腎臓の作成法の開発）等応用性の高い研究成果となる。具体的な解析の方法として、フローサイトメトリーを用いた単細胞レベルでの解析および組織学的解析を用いた。本実験系では、キメラマウスの *genotyping* 作業が大変に重要であり、

レシピエント由来細胞の回収として、*sall1* 遺伝子の発現しているものの臓器欠損などの発現形の出現しない脳細胞（ホモ接合体でもキメラになることが推察される）、胎児肝臓由来造血細胞コロニーアッセイを、成体では、造血幹細胞のコロニーアッセイを用いて実施した。

(2) 腎臓発生におけるネフロン形成に必要な分子とされている *wnt4* 蛋白過剰発現フィーダー細胞（Harvard 大学 McMahon 先生より供与）との共平面培養での低密度培養を行い、培養可能細胞の存在を確認する。まず、後腎間葉に前駆細胞あるいは幹細胞が存在することの証明から実施する。

(3) フローサイトメトリーを用いマウス胎仔後腎における表面抗原の網羅的発現解析を行い、一部の細胞群を選別可能な表面マーカーを同定する。同時に各臓器にて幹細胞活性を持つことが報告されている *side population* 細胞の存在を確認する。この解析成果を元に細胞の選別を行い、方法 (1) (2) にて確立した *in vivo*、*in vitro* のアッセイ系と組み合わせて後腎間葉細胞の中で幹細胞・前駆細胞活性のある細胞集団を判定する。

4. 研究成果

(1) ES 細胞、iPS 細胞と腎臓欠損マウスとの間でキメラマウスを作成すると、腎臓は ES 細胞あるいは iPS 細胞由来の細胞で置換できることを確認できた。これにより、発達腎臓の *in vivo* アッセイ系の再現できたと同時に、再生医学的にはドナー腎臓を丸ごと作成する一つの手法の開発に成功した。キメラ腎臓と大脳をサンプルとしたフローサイトメトリーでの解析では、ドナー細胞（ES 細胞あるいは iPS 細胞）とレシピエント細胞（*sall1* 欠損マウス由来細胞）との間で細胞融合がないこと、ホモ接合体で優位に高率なキメラ腎臓となっていることを明らかにできた。キメラ腎臓の組織学的解析では、後腎間葉に由来するネフロンの大部分はドナー細胞（幹細胞）由来である一方、尿管芽はドナー由来とレシピエント由来細胞のキメラとなっていた。キメラ腎臓の糸球体は血流を伴い、尿腔を形成し、基底膜形成を含む正常な形態形成を確認した。PNA レクチン陽性の糸球体上皮細胞、LT レクチン陽性の近位尿管上皮細胞等の各種細胞マーカーとの二重染色により、これら主たる後腎由来ネフロン構成細胞はドナー細胞（注入幹細胞）由来細胞で全て置換されていることを確認した。

(2) 幹細胞・前駆細胞活性のある細胞群を判定する *in vitro* アッセイ系の再現にも成功した。低密度平面培養によるコロニー形成の確認がなされ、後腎間葉細胞群の中にこのアッセイ系に反応する細胞が存在していた。

(3) 一部の細胞群を選別可能な接着分子等の表面マーカーを6ヶ同定し(未発表データ)、side population 細胞の存在を確認した。現在この解析成果を元に多重染色により組み合わせる細胞画分の選別を行い、研究成果(1)(2)にて確立したアッセイ系を用い幹細胞・前駆細胞活性のある細胞集団の判定作業を進めている。

以上、研究成果(1)(2)(3)を統合し研究を遂行することで、発生腎臓の幹細胞・前駆細胞を同定することが可能となると思われ、現在その評価を進めている。特に、研究成果(1)は、腎臓発生プロセス、特に、各ネフロン構成細胞の発生活源の同定や機能分子のノックアウト ES 細胞を注入することによる腎臓発生に関わる分子機能の評価に応用可能と考えられ、将来への腎臓発生学研究への大きな寄与が望まれる。いまだにコンセンサスの得られていない糸球体内皮細胞やメサンギウム細胞の起源を明らかにできる可能性がある。同時に、臓器作成方法の一手法となると思われ再生医学的に臨床実現化への大きな一歩となる可能性がある。この臓器作成方法は、腎臓のみならず、中枢神経、膵臓等の全身他臓器への応用も可能な有意義な手法と思われ、研究成果として国際特許の取得に至っている。今後、大型動物への応用を視野に入れた腎臓欠損大型動物の開発、ヒト細胞由来ドナー腎臓の作成を前提とした異種間キメラの実現性検討等のプロジェクトを次年度以降の研究課題として推進する予定である。

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)

[雑誌論文] (計3件)

①長田道夫、横尾隆、西中村隆一、櫻井裕之、臼井丈一。座談会：腎再生研究の現状と将来性。腎と透析 66(3)：369-378；2009、査読無

②臼井丈一、山縣邦弘。腎疾患アプローチのための解剖生理。薬局増刊号 60(4)：420-423；2009、査読無

③ Naoya Takayama, Hidekazu Nishikii, Joichi Usui, Akira Sawaguchi, Takashi Hiroyama, Koji Eto, Hiromitsu Nakauchi. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. Blood 111(11)：5298-5306；2008、査読有

[学会発表] (計4件)

①臼井丈一、小林俊寛、西中村隆一、山縣邦弘、中内啓光。腎臓欠損モデルマウスと blastocyst complementation を組み合わせたマウスES細胞由来腎臓の作成。第8回腎不全病態治療研究会 2007年12月1日、東京

②臼井丈一、小林俊寛、西中村隆一、山縣邦弘、中内啓光。腎臓欠損モデルマウスと blastocyst complementation を組み合わせたマウスES細胞由来腎臓の作成。第43回日本移植学会総会 2007年11月24日、仙台

③ Joichi Usui, Toshihiro Kobayashi, Ryuichi Nishinakamura, Kunihiro Yamagata, Hiromitsu Nakauchi. Organization of ES cell-derived kidneys in kidney-deficient mice by using blastocyst complementation. The American Society of Nephrology Renal Week 2007, Nov 4th 2007 in San Francisco

④高山直也、江藤浩之、臼井丈一、錦井秀和、寛山隆、中内啓光。ヒトES細胞由来造血支持構造体、嚢状構造物(ES-Sac)からの血液細胞の分化誘導。第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月12日、横浜

[産業財産権]

○取得状況(計1件)

名称：Blastocyst complementation を利用した臓器再生法

発明者：中内啓光、小林俊寛、李允秀、臼井丈一

権利者：国立大学法人東京大学

種類：国際特許

番号：WO 2008/1-2602 A1

取得年月日：2008年8月28日

国内外の別：国際出願

[その他]

ホームページ等

①読売新聞・ウェブサイト 2009年3月9日配信
iPS 細胞使い腎臓作成、マウス実験で成功、東大チーム

②朝日新聞 2008年3月12日夕刊
ES 細胞使って腎臓・膵臓再生、東大教授マウス実験

③MSN 産経ニュース・ウェブサイト 2008年3月12日配信
マウス ES 細胞で体内に腎臓や膵臓を再生

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井 丈一 (USUI JOICHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：70447340

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし