

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08735

研究課題名(和文) Foxc1/2とネフロン発生

研究課題名(英文) Roles of Foxc1/2 in nephron development

研究代表者

本島 英 (Motojima, Masaru)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：80468636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、腎発生に重要な転写因子であるFoxc1とFoxc2 (Foxc1/2) は、ネフロン前駆細胞を維持すると同時に、腎間質前駆細胞の分化にも寄与することが示唆された。シングルセルレベルでの遺伝子発現解析により、Foxc1/2がネフロン前駆細胞ではFgf20やFrem1、腎間質前駆細胞ではFoxd1やSall1といったそれぞれの分化に必須の因子の発現誘導を行い、腎発生を制御することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Foxc1とFoxc2 (Foxc1/2) は、腎発生に必須の転写因子であることは知られていたが詳細は不明であった。本研究により、Foxc1/2がネフロン前駆細胞とその周囲の腎間質前駆細胞の分化を制御していることが明らかになった。シングルセルRNA-seq解析により、それぞれの分化経路やFoxc1/2によって発現調節される遺伝子も判明した。これらの研究成果は腎再生や腎治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Nephron development proceeds with reciprocal interactions among three layers: nephron progenitors (NPs), stromal progenitors (SPs), and ureteric buds. We found Foxc1 and Foxc2 (Foxc1/2) expression in NPs and SPs. Systemic deletion of Foxc1/2 at E13.5 resulted in ectopic epithelialization of NPs and anemia. NP-specific deletion did not cause these phenotypes, indicating that Foxc1/2 in SPs contributed to the maintenance of NPs and differentiation of stromal erythropoietin-producing cells. Single-cell RNA-seq analysis indicated transformation of some NPs to vascular endothelial cells, reduced numbers of self-renewing NP and SP populations, downregulation of crucial genes for kidney development, and upregulation of genes that were not usually expressed in NPs and SPs. Thus, Foxc1/2 maintains NPs and SPs by regulating the expression of multiple genes.

研究分野：発生、分子生物学、腎臓病学

キーワード：ネフロン発生 エリスロポエチン産生細胞 腎間質前駆細胞 Foxc1 Foxc2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Foxc1/2 はネフロン前駆細胞 (NP) の維持に必須である

フォークヘッド転写因子のメンバーである Foxc1 と Foxc2 は、腎尿路系の発生に必須であるが、ネフロン発生にどのように関わっているのか不明な点が多かった。

研究代表者らは鋭意研究を進め、全身で誘導型 Cre を発現するマウスを利用することで、Foxc1/2 を特定の時期に欠失するマウス (ROSA26-CreER^{T2}; Foxc1^{flox/flox}; Foxc2^{flox/flox}、以降 Foxc1/2) を作製した。腎発生開始約三日後 (E13.5) の母マウスにタモキシフェン (TAM) を投与したところ、Foxc1/2 マウスは出生時に生存しなかったため、出生一日前

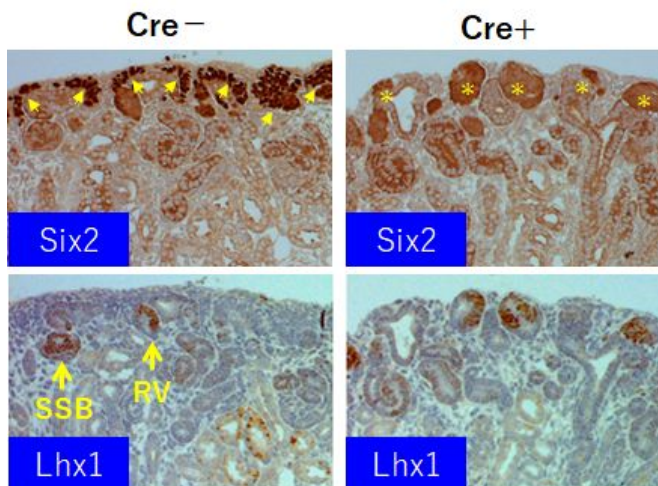


図 1. Δ Foxc1/2腎の異常

(E18.5) の胎仔腎を、誘導型 Cre を発現しない同腹仔と比較した。ネフロン発生は NP、間質前駆細胞 (SP) と Ureteric tip (UT) の相互作用によって進行する。Foxc1/2 の腎臓では Six2 陽性の NP (Δ) が間充細胞の形態から上皮様の円柱状の形態 (*) へと変化していた (図 1)。この細胞では Six2 の染色パターンは核型の分布から、細胞全体に分布するように変化した。また、時には管状構造を示し、Renal vesicle (RV) 以降の分化マーカーである Lhx1 陽性となり、明らかに上皮化していた。Six2 陽性で、なお且つ Lhx1 陽性の RV 様の構造が、本来ならば Cap mesenchyme (CM) である領域 (NP が自己複製する場合) にも認められた。これら異常な NP にネフロンへと分化する能力があるかどうか検証するために、各発生段階の中間体の分布を検討した結果、異常な上皮化 CM と RV の占める割合が非常に高くなっており、RV で発生が停止し先に進んでいないのではないかと推察された。正常なネフロン前駆細胞の減少も相まって、Foxc1/2 マウスの腎臓は低形成となることが示唆された。以上の結果から、後腎発生開始後に Foxc1 と Foxc2 を欠損させると NP を維持せずに分化させる圧力 (NP 自己複製促進因子の減少あるいは分化誘導因子の増大) が強まること、この過程で生じた異所性の RV にはネフロンへの分化能が減弱していることが示唆された。また、Foxc1/2 には貧血も認められ、間質前駆細胞からエリスロポエチン (Epo) 産生細胞への分化異常の可能性も示唆された。

Foxc1/2 はネフロン前駆細胞 (NP) のみならず間質前駆細胞 (SP) にも発現する

胎仔腎の免疫染色の結果では、Foxc1 と Foxc2 はポドサイトと間質細胞に強い染色を認めたが、NP と SP が存在する後腎間充全体に発現が認められた。Foxc1 はヘンレのループや遠位尿管細管での染色も認められた (図 2)。一方、尿管芽が分枝して形成される Ureteric tip (UT) には

どちらも発現が認められなかった。TAM を投与後の Foxc1/2 マウスでは、わずかなポドサイトと間質細胞に染色性が残っていたものの、ほとんどの細胞で発現は認められず高い KO 効率であることを示した。

2. 研究の目的

NP に発現する Foxc1/2 と SP に発現する Foxc1/2 のどちらが NP の維持により重要であるか？ Foxc1/2 の制御下にある NP 維持に必須の因子は何か？ SP の Foxc1/2 は Epo 産生細胞の分化に必須か？が本研究課題における「問い」であり、それに答えることが目的である。

3. 研究の方法

Foxc1/2 をネフロン前駆細胞 (NP) だけで KO する

まず、NP で発現する Foxc1/2 のみを欠損させて、Foxc1/2 マウスと同様な NP の分化異常が引き起こされるかどうか検討した。Six2-EGFP/CreER^{T2}; Foxc1^{fllox/fllox}; Foxc2^{fllox/fllox} では、NP 特異的な Foxc1/2 の KO が観察された。一方で、SP 特異的な Foxc1/2 の KO のために導入した Foxd1-EGFP/CreER^{T2}; Foxc1^{fllox/fllox}; Foxc2^{fllox/fllox} は EGFP/CreER^{T2} の発現が少なすぎて機能しなかった。

Foxc1/2 の制御下にある NP 維持に必須の因子を同定する

第二の目標は、NP と SP それぞれにおいて Foxc1/2 が制御する遺伝子の中で、腎発生の鍵を握る遺伝子を同定することである。E18.5 の NP 特異的な Foxc1/2 KO マウスの腎細胞を分散させ、Six2-EGFP/CreER^{T2} を発現する細胞を EGFP の蛍光を利用して FACS で単離した。一方、FACS で Foxd1-EGFP/CreER^{T2} の蛍光は検出できなかったため、SP とそれ由来の細胞は Foxc1/2 の腎細胞を蛍光標識 Pdgfrb 抗体でラベルすることにより単離した。先進ゲノム支援の支援を受け、シングルセル RNA-seq を行い、正常の腎細胞と KO で遺伝子発現を比較した。

4. 研究成果

NP 特異的な Foxc1/2 の KO では、Foxc1/2 のような異所性の RV は観察されなかった。したがって、NP の異常な形態には SP の Foxc1/2 も関与していることが示唆された。にもかかわらず、シングルセル RNA-seq の結果では、Fgf20、Frem1 や Cxcr4 といった腎発生への関与が示されている遺伝子の発現が著しく低下していた。qPCR では腎皮質における Fgf20 の発現は正常の 12% に低下した。一方、上皮化のマーカーである Pax8 の発現はすべてのクラスターで上昇した。NP 特異的な Foxc1/2 の KO では、異所性の RV 形成には不十分であるが、多くの遺伝子の発現が変動することが分かった。また、Six2 高発現でありながら、Pecam1、Kdr や Tie1 といった血管内皮細胞のマーカーを発現する異常な細胞集団も出現した。

Foxc1/2 の Pdgfrb 陽性細胞では、Foxd1 や Sall1 といった SP の形成に必須の遺伝子の発現が著しく低下した。qPCR では腎皮質における Foxd1 の発現は、正常の 6% に低下し、抗 Sall1 抗体に対する染色性は失われた。Epo を発現する細胞は正常で 1 つ検出されたが、Foxc1/2 には 1 つも無かった。腎皮質における Epo mRNA の発現は正常と同等に低いままであった。貧血であるにもかかわらずこれらの結果は、Foxc1/2 では Epo 産生細胞の分化が阻害されていることを示唆した。

また、通常の腎発生では発現が見られない様々な遺伝子の発現が上昇していた。

以上の結果は、Foxc1/2 が多くの遺伝子の発現制御により、腎発生を制御することを示してい

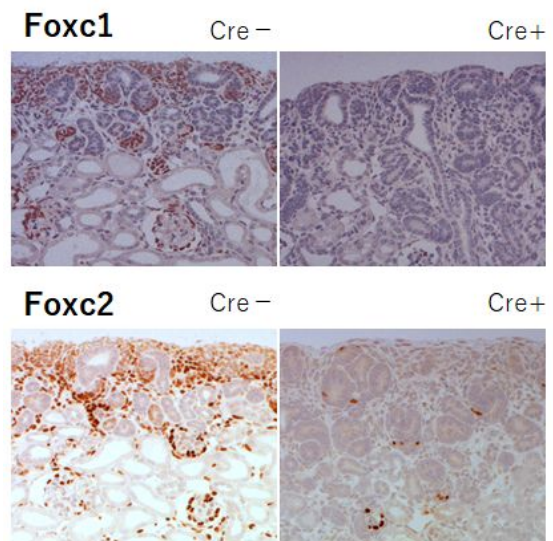


図2. 胎仔腎でのFoxc1/2の発現

る。

以上を論文にまとめ投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松阪 泰二 (Matsusaka Taiji) (50317749)	東海大学・医学部・教授 (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関