

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 23日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390237

研究課題名（和文） 胚性幹細胞からの中間中胚葉及び腎臓前駆細胞の誘導と単離

研究課題名（英文） Induction of intermediate mesoderm and kidney progenitors from embryonic stem cells

研究代表者

西中村 隆一（ NISHINAKAMURA RYUICHI ）

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：70291309

研究成果の概要（和文）：

本計画は、胚性幹細胞（ES細胞）から腎臓の起源である中間中胚葉及び前駆細胞である後腎間葉を誘導することを目的とした。これらの細胞がGFPで蛍光発色するマウスを作成して発生の各段階で単離し、2つの集団に共通するあるいは異なる遺伝子群を同定した。また機能的には、胎生9.5日以降ではコロニーを形成する腎臓前駆細胞が存在するものの、8.5日の中間中胚葉からは検出されなかった。ES細胞からもコロニーは確認されなかったため、8.5日相当までの誘導に留まっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This project aims at induction of the intermediate mesoderm and metanephric mesenchyme, which contains nephron progenitors, from embryonic stem (ES) cells. We generated a knock-in mouse strain in which these two kidney precursor populations were marked with GFP. Sorted GFP-positive cells were subjected to the colony-forming assay upon Wnt4 stimulation. We revealed that embryos at E9.5, but not at E8.5, contained colony-forming cells. As GFP-positive cells induced from ES cells were unable to form colonies, we assume that they may correspond to the E8.5 intermediate mesoderm. Further investigation is needed to derive nephron progenitors from ES cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：腎臓発生学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 腎臓内科学

キーワード：ES細胞、腎臓発生

1. 研究開始当初の背景

腎不全に対する医療費の社会的負担は大きいにもかかわらず、腎機能を回復させる画期的な治療法はいまだ存在しない。腎臓の再生を目指して、ES細胞や骨髄などから腎臓細胞を誘導しようとするとき、腎臓前駆細胞だけが生育し、かつ何個あるかを正確に検出する系ができて初めて、どの細胞源からのどの誘導条件が最適かを探索できる。単なるマーカー発現や移植実験ではこの壁を乗り越えることはできない。

そこでまずこの前駆細胞を検出する系を確立した。た。Sal11は我々が単離した核内因子で、そのノックアウトマウスは腎臓を欠損する (Nishinakamura et al., Development, 2001)。Sal11の遺伝子座にGFPを導入したマウスでは、腎臓前駆細胞集団である後腎間葉が蛍光発色する。GFPが強く発現する細胞をFACSで選別し、Wnt4を発現するフィーダー上で培養することによって、1個の細胞からコロニーが形成され、糸球体、近位尿細管、遠位尿細管という多系統に分化することを見いだした (Osafune et al., Development, 2006)。

このコロニーアッセイという前駆細胞検出系を基盤として、ES細胞から腎臓前駆細胞の誘導を目指すに際して、もう一つ乗り越えなければならない壁が、前駆細胞だけを純化単離することである。このためさらに新たなGFPマウスを作成した。転写因子Osr1 (Odd-skipped related 1) は腎臓が発生してくる中間中胚葉と後腎間葉に強く発現し、その欠失マウスはSal11よりも早期に腎臓発生異常をきたすことが報告されている (James et al., Development, 2006)。中間中胚葉に発現すること、後腎間葉においてもSal11より未分化な細胞群に発現が限局していること、Sal11と異なり未分化ESでは発現が全く認められないことの3点からOsr1はSal11より優れた指標になりうると判断した。そこで、Osr1の遺伝子座にGFPを組み込んだES (Osr1-GFP ES) を相同組み換え法を用いて単離し、それからキメラマウスを作成し、さらに交配によって最終目的であるマウスを作成したところ、期待通りに中間中胚葉と後腎間葉が強く蛍光発色するマウスを得ることができた。よってもともとなったES細胞のGFP発色は、生体内を正確に再現することが保証されていることになる。このES細胞と上述のコロニーアッセイという前駆細胞検出系

を組み合わせることによって、中間中胚葉と後腎間葉の誘導法の開発を試みた。

2. 研究の目的

腎臓は中間中胚葉という組織から発生し、そこから前腎、中腎が形成され、さらに後腎間葉という前駆細胞集団が派生し、それがWnt4の刺激を受けて糸球体足細胞、近位及び遠位尿細管に分化していく。しかしこの後腎間葉は、生後には完全に分化して消失してしまう。この間葉の消失が成体腎臓が再生しない一因である可能性があり、この間葉という前駆細胞を誘導することは腎臓再生に向けて重要な意味をもつ。よって本計画は、胚性幹細胞 (ES細胞) から腎臓の起源である中間中胚葉及び前駆細胞である後腎間葉を誘導することを目的とする。その際、誘導したものが生体の中間中胚葉及び後腎間葉と同一であるかを検定することが極めて重要であり、今回作成したマウスからそれらを単離して、ES細胞由来の細胞と比較することが可能になった。比較する際には、遺伝子発現だけでなく、前述の検出系によって前駆細胞の個数を測定することによって、誘導方法を改善していく計画である。

3. 研究の方法

- (1) まずOsr1-GFPマウスの中間中胚葉及び後腎間葉を蛍光を指標にして単離し、器官培養を行い、糸球体や尿細管への分化が見られるかを確認する。
- (2) 次に、後腎間葉中の前駆細胞の検出のために開発した我々のコロニーアッセイが、中間中胚葉まで遡れるかを検討し、それに適した条件変更を行う。アッセイ系が遡れる発生時期の上限と、ES細胞から誘導できる時期の下限が重なることが誘導成功の鍵である。培養液組成、フィーダー細胞の変更など条件検討を重ね、できるだけ早期の前駆細胞を検定できるようにする。
- (3) さらに中間中胚葉及び後腎間葉をGFPを指標にFACSで集めてマイクロアレイにかけることによって、その遺伝子発現の違いと共通性を明らかにする。
- (4) これら生体での機能的アッセイと遺伝子発現の結果を指標として、Osr1-GFP ES

からの腎臓前駆細胞誘導に着手する。つまりES細胞から誘導されたGFP陽性細胞がin vitroに限ったものではなく、in vivoと一致することが必須であり、それを確認しながら進められるのがこの計画の強みでもある。誘導したGFP陽性細胞をFACSで選別し、機能的アッセイと遺伝子発現から中間中胚葉及び後腎間葉なのかを厳密に検定しつつ、GFP陽性細胞の頻度が上がる誘導法を開発していくことになる。

- (5) 応用を目指す上では、さらにOsr1-GFPを使わない方法論が必要である。そのためにマウス及びES由来のGFP陽性細胞に発現する細胞表面抗原の同定と、その組み合わせによる選別法の開発を行う。これが可能になればヒトES細胞への応用が可能になるはずである。

4. 研究成果

主な成果

- (1) Osr1-GFP マウスの GFP 陽性細胞を発生各段階で単離し、マイクロアレイで解析することによって、2つの集団に共通するあるいは異なる遺伝子群を同定した。この中には転写因子、成長因子、細胞表面因子が含まれており、各段階におけるシグナルの違いを示唆した。
- (2) マイクロアレイ解析で得られた表面抗原と GFP を組み合わせることにより、より純度の高い腎臓前駆細胞の単離が可能になった。GFP が不要になれば、正常の ES 細胞やヒト ES / iPS 細胞にも応用が可能ならずである。
- (3) Wnt4 発現フィーダー上で培養する機能アッセイでは、胎生 9.5 日以降ではコロニーを形成する腎臓前駆細胞が存在するものの、8.5 日の中間中胚葉からは検出されないことが明らかとなった。よって 8.5 日から 9.5 日にかけて腎臓分化に向けて大きな変化が起きていることになる。
- (4) 上記マウスを作成するもととなった ES 細胞をアクチビンとレチノイン酸を使った胚様体 (embryoid body) 形成法や、コラーゲン上での 2 次元分化法で分化誘導を行った。その結果、高率に GFP 陽性の細胞を得ることができた。これを Wnt4 発現フィーダー上で培養して検定したが、コロニーは形成されなかった。よって、ES 細胞から誘導された細胞は、

現時点では 8.5 日相当の中間中胚葉に留まっている可能性が示唆された。

成果のインパクト

上記内容は平成 23 年のアメリカ腎臓学会の口頭発表に採択され、高く評価された。

今後の展望

胎生 8.5 日と 9.5 日の間に腎臓への分化に向けて大きな変化が起きるため、この 1 日間に生じる現象をマイクロアレイ等で詳細に解析中である。この過程を試験管内で再現することができれば、ES 細胞からの腎臓前駆細胞誘導に向けて大きく前進するはずであり、今後も注力する計画である。

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 6 件)

- ① Usui J, Kobayashi K, Yamaguchi T, Knisely AS, Nishinakamura R and Nakauchi H. Generation of Kidney from Pluripotent Stem Cells via Blastocyst Complementation. *Am. J. Pathol.* in press. 査読有
- ② Nishinakamura R, Uchiyama Y, Sakaguchi M, and Fujimura S. Nephron progenitors in the metanephric mesenchyme. *Pediatr. Nephrol.* 26(9):1463-1467, 2011. 査読有
- ③ Uchiyama Y, Sakaguchi M, Terabayashi T, Inenaga T, Inoue S, Kobayashi C, Oshima N, Kiyonari H, Nakagata N, Sato Y, Sekiguchi K, Miki H, Araki E, Fujimura S, Tanaka SS, and Nishinakamura R. Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney mesenchyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(20): 9240-9245, 2010. 査読有
- ④ Fujimura S, Jiang Q, Kobayashi C, and Nishinakamura R. Notch2 activation in the embryonic kidney depletes nephron progenitors. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21(5):803-810, 2010. 査読有
- ⑤ Inoue S, Inoue M, Fujimura S, and

Nishinakamura R. A mouse line expressing *Sall1*-driven inducible Cre recombinase in the kidney mesenchyme. *Genesis* 48(3):207-212, 2010. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 西中村隆一 Nephron progenitors in the embryonic kidney 第 34 回日本分子生物学会年会シンポジウム Development and regeneration of internal organs 2011.12.13、パシフィコ横浜 (神奈川県) (口頭発表及びシンポジウムオーガナイザー)
- ② 太口敦博、西中村隆一 Identification of Early Stage Renal Progenitors in E9.5 Embryos by Using *Osr1*-GFP Knock-In Mice. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011.12.13、パシフィコ横浜 (神奈川県) (ポスター)
- ③ Taguchi A, Nishinakamura R. Identification of Early Stage Renal Progenitors in E9.5 Embryos by Using *Osr1*-GFP Knock-In Mice. The American Society of nephrology, 2011. 11.12, Philadelphia Convention Center, Philadelphia, USA (口頭発表)
- ④ 西中村隆一 発生期におけるネフロン前駆細胞維持機構 第 54 回日本腎臓学会ワークショップ 2011.6.15、パシフィコ横浜 (神奈川県) (口頭発表)
- ⑤ Nishinakamura R. Nephron progenitors in the embryonic kidney. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology. 2011.6.2, 福岡国際会議場 (福岡) (招待講演)
- ⑥ Nishinakamura R. Nephron progenitors in the embryonic kidney The 16th International Conference of the International Society of Differentiation. From Stem Cells to Organisms. 2010.11.7, 奈良県新公会堂 (奈良) (招待講演)
- ⑦ Nishinakamura R. Renal stem cells: Roles in the embryonic kidney. 15th congress of the international pediatric nephrology association.

2010.8.31. New York Hilton, NY, USA. (招待講演)

- ⑧ Nishinakamura R. Progenitor cell populations in the metanephros. 11th International Workshop on Developmental Nephrology. 2010.8.25, Mohonk Mountain Resort, New Paltz, NY, USA. (企画及び口頭発表)
- ⑨ Taguchi A, Nishinakamura R. "Generation of *Osr1*-GFP knock-in mice and ES cells." International Workshop on Developmental Nephrology. 2010.8.25, Mohonk Mountain Resort, New Paltz, NY, USA, (ポスター)
- ⑩ 西中村隆一 ネフロン前駆細胞による腎臓形成機構 日本生化学会 2009.10.21、神戸ポートアイランド (兵庫) (口頭発表)
- ⑪ 西中村隆一 間葉からみた腎臓発生と再生 第 52 回日本腎臓学会 2009.6.3、パシフィコ横浜 (神奈川県) (企画及び口頭発表)
- ⑫ Nishinakamura R. Tubulogenesis from embryonic renal progenitors. American Society of Nephrology Renal Week. 2008.11.7, Philadelphia Convention Center, Philadelphia, USA. (招待講演)

[その他]

ホームページ等

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/integrative_cell_biology/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西中村 隆一 (NISHINAKAMURA RYUICHI)
熊本大学・発生医学研究所・教授
研究者番号：70291309

(2) 研究分担者

田中 聡 (TANAKA SATOMI)
熊本大学・発生医学研究所・助教
研究者番号：10321944