

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目： 若手研究(B)  
 研究期間： 2008～2009  
 課題番号： 20790596  
 研究課題名（和文）  
 腎前駆細胞の自己複製及び分化誘導の試み  
 研究課題名（英文）  
 Guided differentiation of kidney precursor cells into specific cell lineages of the nephron  
 研究代表者  
 小林 千余子（KOBAYASHI CHIYOKO）  
 熊本大学・発生医学研究所・助教  
 研究者番号： 20342785

## 研究成果の概要（和文）：

腎臓は尿管芽の周りに後腎間葉と呼ばれる前駆細胞集団が凝集し、糸球体、近位尿細管、遠位尿細管へと分化していくことで形成される。しかしこの間葉は生後速やかに分化して消失してしまう。この間葉を増幅させ、特定の細胞腫へと分化させることは腎臓再生にむけて大きな意味を持つ。そこで腎臓前駆細胞のマーカーとして用いた *Sall1* を後腎間葉で発現させ続けることで未分化性の維持及び増殖が出来ないかを検討した。また遺伝子導入によって間葉の未分化維持および分化誘導を引き起こせないかと考え、レンチウイルスを用いた強制発現系の開発を行った。

## 研究成果の概要（英文）：

The metanephros is the main filtrating organ of the mammalian organism. The basic structural and functional unit of the kidney is the nephron, which performs a multitude of tasks including blood filtration, re-absorption of salt, water and other compounds. These functions can be related to specific 'units' in each nephron that are formed in a tightly controlled manner during development. Induction of the kidney occurs through reciprocal interactions between the ureteric bud and the metanephric mesenchyme. The mesenchymal cell sequentially form condensates, renal vesicles, comma- and S-shaped bodies, and terminal epithelia of glomeruli, proximal and distal tubules. To generate multiple cell lineages for kidney regeneration, there exist three obstacles to be overcome; (1) derivation of the renal progenitors; (2) expansion of the renal progenitors; and (3) control of lineage commitment of the renal progenitors toward differentiated cell types. The recent work on iPS formation suggests that a specific combination of multiple factors might be the most effective way to reprogram the cells. To develop of gene transducing methods into the kidney, we first tested lentivirus vector system.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

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：腎臓学・腎臓発生・前駆細胞

### 1. 研究開始当初の背景

日本で人工透析を受ける人は26万人を越え、腎不全等の医療費は年間1兆円を超える。現時点での末期慢性腎不全に対する根治療法は腎移植しかないが、ドナーが決定的に不足しており、腎臓器売買や病腎移植が重大な社会的問題になっている。そこで臓器移植に代わる新しい治療法として再生医療が期待されているが、この再生医療で期待されていることの一つは、特定の腎臓細胞を誘導し、細胞移植によって損傷部位の機能を回復させることができないかというものである。

Sal11は10個のジンクフィンガーを持つ核内因子で、ノックアウトマウスは腎臓を完全に欠損する(Nishinakamura, *Development*, 2001)。Sal11はE11.5の後腎間葉から発現していることから、Sal11遺伝子座に蛍光タンパク質GFPを導入したノックインマウスを作成(Takasato, *Mech. Dev.*, 2004)し、後腎間葉からFACS(fluorescence activated cell sorting)を用いてGFP高発現細胞を選別し、Wnt4を発現するNHI3T3フィーダー細胞上で培養すると、1個の細胞からコロニーが形成され、糸球体、近位尿細管、遠位尿細管のマーカーを発現する。またこれら個々のGFP高発現細胞を再凝集させて器官培養すると、3次元構造を再構築し、糸球体や尿細管様の構造が認められる(Osafune, *Development*, 2006)。この系の開発で我々は胎児の後腎間葉内に多能性の前駆細胞が存在することを示したが、成体ではこのSal11-GFPが高発現する間葉領域は消失してしまう。ではSal11-GFPを高発現する間葉細胞を自己複製させ、かつ望みの系統へ分化誘導出来ないかと考えた。さらに誘導した細胞を成体へ細胞移植することで、成体での腎臓の再生に繋がれる可能性がある。

### 2. 研究の目的

Sal11ノックアウトマウス、E11.5の後腎間葉を単一細胞に解離しWnt4を発現する3T3フィーダー上で培養すると上皮化は起こるが形成されるコロニーの大きさが小さい。つまり後腎間葉の増殖に関与していると考えられる。Six2ノックアウトマウスでは異所的な間葉細胞の早熟な上皮化が起こり、前駆細胞が減少し腎臓が低形成になる。さらにSix2ノックアウトマウスの後腎間葉でWnt4の発現領域が拡大していることから、Six2はWnt4の上皮化シグナルを抑制することにより、後腎間葉の前駆細胞を未分化な状態に保って

いるものと考えられている(Self, 2006)。Wnt4のノックアウトマウスでは後腎間葉が上皮化を起こせず(Kispert, 1998)、Notch2のhypomorphicノックアウトマウスでは上皮化は起こるが、最終的に糸球体形成不全となる(McCright, 2001)。このような種々のノックアウトマウスの解析から、腎臓発生および分化の基本的カスケードは、尿管芽のまわりに後腎間葉が凝集し、増殖しながら(Sal11及びSix2が関与)Wnt4のシグナルを受けて上皮化が始まり、その後Notchのシグナルや他の分化シグナルが入ることで、多系統の細胞分化が起こると考えられている。

そこで本研究ではこれらの基本カスケードに関わる遺伝子の働きを操作することで、  
・腎臓前駆細胞の自己複製法の確立  
・腎臓前駆細胞集団からの特定細胞系譜への分化誘導法の確立  
を行いたいと考えた。

### 3. 研究の方法

自己複製法の確立については、Sal11遺伝子の関与に関して、この遺伝子を後腎間葉で強制発現させることで、自己複製が亢進するかを検討した。

分化誘導法に関してはNotch2のhypomorphicノックアウトマウスとNotchのシグナルを活性化させる-secretaseの構成タンパクであるpresenilinノックアウトマウスにおける解析にヒントを得た。presenilinノックアウトマウスでは糸球体と近位尿細管が欠失する(Wang, 2002)。ということは、取り出してきた後腎間葉にNotchシグナルを操作することで、近位尿細管や糸球体への分化が誘導出来るようになるかもしれない。そこでリガンド刺激や活性化型Notch2強制発現マウスによるNotchシグナル活性増強を試み、後腎間葉細胞が一方向性に分化するかを検討した。また遺伝子導入によって間葉を糸球体細胞へと分化誘導させるべく、レンチウイルスを用いた強制発現系の開発を行った。

### 4. 研究成果

(1) 腎臓前駆細胞のマーカーとして用いたSal11を後腎間葉で発現させ続けることで未分化性の維持及び増殖が出来ないかを検討した。そのためにまずROSA26遺伝子座にloxP配列及びSal11 cDNAを挿入したマウス(Rosa-Sal11)を作成し

た。腎臓前駆細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Six2-Cre マウスと掛け合わせることで、E11.5 から腎臓前駆細胞特異的に Sall1 を強制発現させたが、未分化前駆細胞の数や分化の状態に変化がなかった。腎臓における Sall1 の外来性タンパクの発現量が少ないことが表現型の現れにくい原因の一つかもしれない。そこで全身性に Cre リコンビナーゼを発現する CAG-Cre マウスと Rosa-Sall1 マウスを交配した。腎臓、脳、肝臓、肺等の臓器で外来性の Sall1 の発現を確認することが出来、Sall1 の強制発現マウスの有効性は確認できたが、やはり腎臓前駆細胞の数や分化の状態に変化は見られなかった。しかしながら、体重が優位に小さくなり(図1)、脳下垂体での Sall1 の発現量変化によってホルモン量の変化した可能性が考えられた。

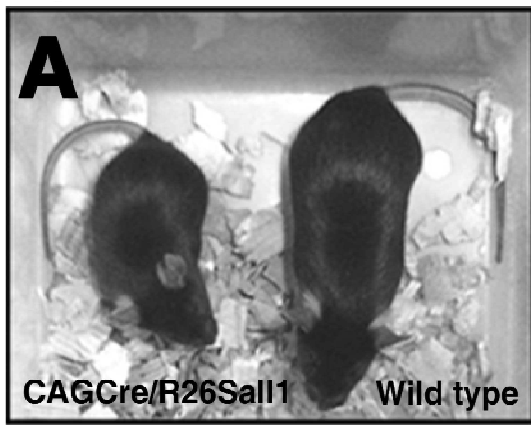


図1 全身性に Sall1 を発現したマウスは低体重になった。

(2) Notch シグナルを操作することで細胞系譜をコントロールできるかを検討した。Notch のリガンドである Jagged を発現するフィーダー細胞上で、後腎間葉を培養したが、糸球体および近位尿管の分化が促進されることはなかった。また、ROSA26 遺伝子座に loxP 配列及び細胞内領域のみをもつ Notch2 遺伝子を挿入したマウス(Rosa-ICN2)を作成し、腎臓前駆細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Six2-Cre マウスと掛け合わせることで腎臓前駆細胞特異的に Notch2 を強制発現させたところ、腎臓の低形成がみられた(図2)。発生過程においては、Six2 陽性の腎臓前駆細胞が消失するとともに Wnt4 の異所的な発現が観察された(図3)。このことから腎臓前駆細胞での Notch2 の活性化は近位ネフロンへの細胞運命決定に関与するよりは、上皮化を促進することで未分化な腎臓

前駆細胞を枯渇させることが明らかとなった。また Six2 の上流因子である Pax2 の発現が Hesr 遺伝子を介して行われていること等が明らかとなり、Six2 を介した Notch2 と Wnt4 の positive feed back loop の存在が示唆された(図4)。

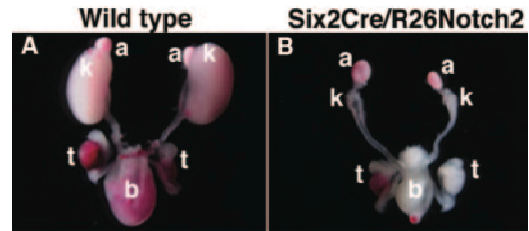


図2 腎臓前駆細胞で Notch2 を強制発現させると腎臓の低形成がみられた。

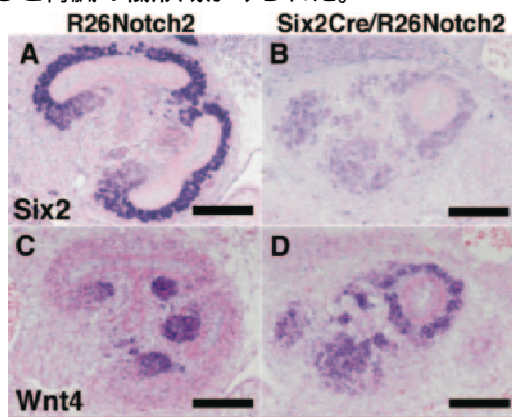


図3 腎臓前駆細胞で Notch2 を強制発現させると Six2 遺伝子の発現低下(A, B)および Wnt4 遺伝子の異所的発現(C, D)が観察された。

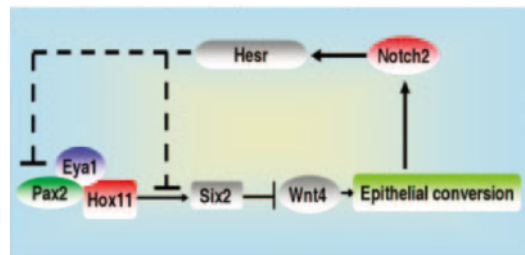


図4 ネフロン前駆細胞に対する Notch2 の機能

(3) コントロールレンチウイルスベクターを使った結果、MOI 5 で解離した腎臓前駆細胞の約 80%が感染することを突き止めた。また予備実験の結果から解離した後腎間葉に Wt1 遺伝子を発現するウイルスを感染させると、下流で働くことされる VEGF の発現が誘導されること、また尿管芽の引き寄せに関わる GDNF 遺伝子を発現するウイルスを E11.5 胚の腎臓

に感染させると、過剰な尿管芽の分岐誘導が観察された(図5)。これらからレンチウイルスベクターを用いた強制発現系は腎臓に有効である可能性が示唆された。現在、糸球体細胞への分化誘導因子候補 11 種と未分化維持因子候補 2 種のウイルス作製を行っており、コロニーアッセイまたは器官培養系での効果を検証したい。

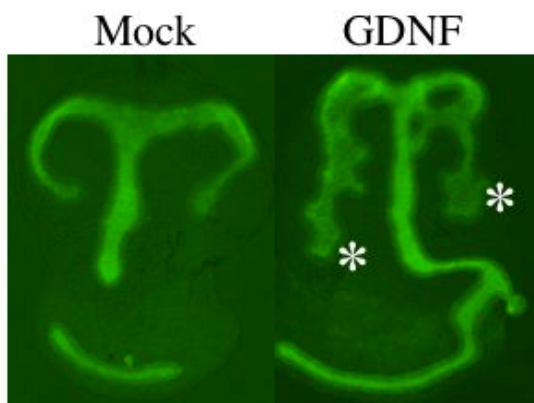


図5 GDNF 遺伝子を発現するウイルスをE11.5の後腎に感染させると、過剰な尿管芽の分岐が確認された。

#### 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4件)

Yukako Uchiyama, Masaji Sakaguchi, Takeshi Terabayashi, Toshiaki Inenaga, Shuji Inoue, Chiyoko Kobayashi, Naoko Oshima, Hiroshi Kiyonari, Naomi Nakagata, Yuya Sato, Kiyotoshi Sekiguchi, Hiroaki Miki, Eiichi Araki, Sayoko Fujimura, Satomi Tanaka, Ryuichi Nishinakamura. (2010)

Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney mesenchyme.

Proc. Natl. acad. Sci. USA. (in press). 査読有

Sayoko Fujimura, Qing Jiang, Chiyoko Kobayashi, Ryuichi Nishinakamura. (2010)

Notch2 activation in the embryonic

kidney depletes nephron progenitors.

J. Am. Soc. Nephrol. 21:803-810. 査読有

Qing Jiang, Sayoko Fujimura, Chiyoko Kobayashi, Ryuichi Nishinakamura. (2010)

Overexpression of Sall1 in vivo leads to reduced body weight without affecting kidney development.

J. Biochem. 147: 445-450. 査読有

Minoru Takasato, Chiyoko Kobayashi, Koji Okabayashi, Hiroshi Kiyonari, Naoko Oshima, Makoto Asashima, Ryuichi Nishinakamura (2008)

*Trb2*, a mouse homolog of *tribbles*, is dispensable for kidney and mouse development.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 373: 648-652. 査読有

[学会発表](計5件)

Chiyoko Kobayashi. (2009)

Development of gene transducing methods into the kidney.

Global COE-IMEG Joint Summer Retreat Seminar in ASO, At Hotel Green Pia Minami Aso Aso, Kumamoto, Japan. Sep, 3.

阪口雅司, 内山裕佳子, 稲永敏明, 小林千余子, 藤村幸代子, 西中村隆一  
腎臓形成不全を示すKIF-Kノックアウトマウスの解析

第5回宮崎サイエンスキャンプ 2009年2月21日、ワールドコンベンションセンターサミット宮崎, 宮崎.

Chiyoko Kobayashi (2008)

Guided differentiation of kidney precursor cells into specific cell lineages of the nephron.

Global COE-IMEG Joint Summer Retreat

Seminar in ASO, At Hotel Green Pia  
Minami Aso. Aso, kumamoto, Japan. Aug,  
28.

Yukako Uchiyama, Toshiaki Inenaga,  
Shuji Inoue, Chiyoko Kobayashi, Ryuichi  
Nishinakamura. (2008)

KIF-K, a kinesin family gene, regulates  
Gdnf maintenance and controls ureteric  
bud attraction in kidney development.

The 41<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese  
Society of Developmental Biologists.  
Tokushima Arts Foundation for Culture,  
Tokushima, Japan. May, 29.

Yukako Uchiyama, Toshiaki Inenaga,  
Shuji Inoue, Chiyoko Kobayashi, Ryuichi  
Nishinakamura. (2008)

The roll of KIF-K, a kinesin family gene,  
in a renal progenitor population.

The 6<sup>th</sup> annual meeting of International  
Society for Stem Cell Research.  
Pennsylvania Convention Center,  
Philadelphia, PA USA. June, 13.

[その他]

ホームページ等

[http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/integrative\\_cell\\_biology](http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/integrative_cell_biology)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小林 千余子 (KOBAYASHI CHIYOKO)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：20342785

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：