

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：20791119
 研究課題名 (和文) 遺伝子導入 ES 細胞からの腎臓発生分化に関する基礎的研究
 研究課題名 (英文) The basic study about kidney differentiation from gene transferred embryonic stem cells
 研究代表者
 中根 明宏 (NAKANE AKIHIRO)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
 研究者番号：70464568

研究成果の概要 (和文)：テトラサイクリンオフシステムで導入遺伝子を調節できる ES 細胞で Pax2 遺伝子を導入したものを確立し、それらを分化させて胚様体を形成させることで腎臓の発生において重要な因子の integrin $\alpha 8$ や aquaporin 1 の発現を増加させることができました。この実験の成果により、ES 細胞から腎臓をはじめとした様々分野の初期発生において、遺伝子の発現の状況、目的とした細胞種の獲得など細胞を用いた再生医療に応用できることが期待される。

研究成果の概要 (英文)：By establishing tetracycline-inducible overexpression in ES cells, our data suggest that *Pax2* and additional factors that are induced in the embryoid bodies synergistically upregulate the *integrin $\alpha 8$* and *AQP1* that are possibly involved in kidney development. Our method for the generation of tetracycline-inducible ES cell lines will be useful for dissecting the genetic cascades functioning in the early stages of development, as well as for screening candidate genes that direct ES cells toward the desired lineages, which may be applicable to future cell therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：再生医療、胚性幹細胞、遺伝子導入、分化実験、RT-PCR

1. 研究開始当初の背景

(1) 末期腎不全から血液透析導入となる患者数は、推計で年間 3 万人を超え、総数は 25 万人以上であり、今後も増加し続けると予想されている。末期腎不全に対する根本的治療としては腎移植が挙げられるが、ドナーが大

きく不足している。本邦では透析患者の長期予後も良く、成功した治療といえるが、厳しい食事制限、定期的な通院治療による生活の質の低下、長期合併症等が患者の負担を生じ、年間約 1 兆円の透析医療費が医療経済面の負担を生じている。よってその解決策として、

末期慢性腎不全などの難治腎疾患に対する再生医療の開発が求められていた。

(2) 近年、再生医療が様々な分野で脚光を浴びていて、皮膚や軟骨など、すでに臨床応用が進められているものもあるが、排泄器官、内分泌器官として生命維持に不可欠な臓器である腎臓は、発生過程や構造上の複雑さなどの理由により、発生機構の解明やそれに伴う再生医療の研究が他の臓器に比べ立ち遅れている。国内外では現在、マウス ES 細胞から尿細管細胞を分化させることが可能であることが報告されている。しかし、その他の腎機能を改善させる為に必要な細胞、特に糸球体の構成細胞は未だに報告がない。一方で、本邦の研究者らから iPS 細胞の樹立が報告されてた (Takahashi et. al. 2006 *Cell*)。この細胞は ES 細胞と同等の未分化能と万能性を有する細胞で、受精卵の利用が必要である ES 細胞に比べ、倫理面、拒絶反応の面などで実際の再生医療を行う場合に考えられていた制約が解決され、再生医療を実現できる可能性が広がったと考えられる。ES 細胞の研究成果はこの iPS 細胞で応用できるため、本研究による遺伝子導入 ES 細胞を使用した研究成果が新たな腎臓の再生医療発展の糸口になると考えた。

(3) 当施設において、先天的尿路奇形、特に尿道下裂、停留精巣、腎盂尿管移行部狭窄症、尿管膀胱移行部狭窄症、膀胱尿管逆流症や尿路悪性腫瘍に対する治療において欠損した組織の再建を行う中で、どうしても患者本人の生体組織を用いるだけでは限界があることがある。そこで SIS (腸管膜間質) を用いる尿道再建、膀胱再建や荒廃した精巣組織に成長因子や遺伝子導入して組織自体を回復させたり、精子細胞を分化させる研究を行い、臨床治療に活かす研究活動を行ってきた。その中で先天的尿路奇形などで形成は行うものの腎機能が改善せず、慢性腎不全に至る患者も多く存在するため、腎組織自体の再生を行うことの必要性を痛感した。まず腎臓の発生の知識から腎再生の方法を模索することから始めた。複数の腎臓の発生に関連する遺伝子の解析は器官培養やノックアウトマウスの解析で行われているが、共同研究施設においては、Sa11 ファミリーの解析が行われている。Sa111 ノックアウトマウスは後腎間葉が分化されず、結果として腎臓が形成されず胎児致死となる。ヒトでの機能と比較すると SALL1 遺伝子の役割はマウスの Sa111 と Sa114 に対応することが分かってきた。更に腎発生の初期で後腎間葉が発生して

くる中間中胚葉に発現する Pax2 遺伝子に注目した。この遺伝子においても、欠如すると腎臓発生がなされず胎児死することがマウス、ニワトリなどの動物実験で確認されている。またこの遺伝子は、その他の腎臓の発生に関係する遺伝子群の上流にあることが示されている。そこで、この遺伝子を導入した ES 細胞を利用し、再生医療に生かすことを考えた。

2. 研究の目的

(1) ES 細胞の研究では、未分化である特徴を解明する研究と 3 胚様すべてに分化可能である全能性に対する研究が行われている。現在、筋肉、軟骨、骨髄血液細胞、神経、膵臓、肝臓において ES 細胞から分化できることが証明されている。その中で腎構成細胞への分化に対する実験は遅れている傾向にあったが、近年、ES 細胞から尿細管組織への分化が報告された (Kobayashi et. al. 2005 *Biochem Biophys Res Commun*)。

(2) しかし、腎臓は 1 種類の細胞だけでその機能を発揮し維持できる臓器ではないため、その他の細胞、特に腎機能の最も重要な機能を司る糸球体細胞の分化が重要である。ES 細胞から糸球体細胞への分化は過去の報告で示唆されるものの十分な証明はされていない。そこで、糸球体細胞、尿細管細胞を含めた腎臓を構成する複数の細胞を ES 細胞から分化させることを目標とし、ES 細胞から腎構成細胞を分化させうる可能性が示唆されている腎臓の発生にあたっての重要な遺伝子により、腎構成細胞や腎臓の幹細胞へ分化させることが可能であると考え、Pax2 遺伝子に注目し、その遺伝子を導入した ES 細胞を確立し、確立された遺伝子導入 ES 細胞を *in vitro* で培養、ある程度分化させた発生分化のメカニズムを解明することを旨とした。

3. 研究の方法

(1) 導入遺伝子の準備と確認

Pax2 遺伝子の cDNA を、タグ融合タンパクを持つプラスミドベクターに組み込んだものを作成する。HEK-293 細胞を 5% CO₂、37°C、10% FCS (ウシ胎仔血清) 付加 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 中で培養し、リポフェクション法による遺伝子導入キットの FuGENE[®] にて前述のプラスミドベクターを遺伝子導入する。48 時間後、遺伝子導入した HEK-293 細胞を回収し、抗タグ融合タンパク抗体を一次抗体としたウェスタンブロッティング法にて導入遺伝子が発現していることを確認した。以上でこの cDNA が使用可能であると判断し、再度、発現プロモーターを持ったプラスミドベクターに組み込み直した。

(2) ES細胞の培養

マウスより確立されたES細胞の一つであるMG1.19から得た細胞系を用いた。Glasgow MEMに10% FCS、 10^{-4} M 2-メルカプトエタノール、non-essential amino acid、1mM sodium pyruvate、1000U/ml LIF (leukemia inhibitory factor: ESGRO[®])を加えたものを使用した。

(3) ES細胞への遺伝子導入、細胞系の確立

培養したES細胞を0.25%トリプシンEDTA溶液にて回収し、 1×10^7 個の細胞に対し20 μ gの導入する遺伝子を組み込んだプラスミドDNAを用意し、electroporation用キュベット (BIO-RAD Gene Pulser cuvette[®]) 内に混ぜ入れて、960 μ F、250mVの条件でelectroporation法を行い、遺伝子を導入する。48時間、前述の培養条件にて培養後、Neomycin、Puromycinなどの耐性遺伝子に対応した薬剤を含む培養液に替えると遺伝子導入された(同時に耐性遺伝子を発現している)ES細胞のみが生存し選択された。最終的にはサザンブロッティング法にて遺伝子が導入されたことを確認した。

(4) ES細胞の導入遺伝子発現の確認

上記で確認された遺伝子導入ES細胞を用い、まず導入遺伝子自体が発現しているかどうかをRT-PCR法を用い確認する。ディッシュに平面培養したES細胞を0.25%トリプシンEDTA溶液にて回収し、TRISol[®]およびクロロホルムにてmRNAを抽出、2-プロパノール、エタノールにて沈殿させ、回収する。オリゴdTプライマーおよびSuperScript II[®]キット、dNTP mixにて逆転写反応を行う。得たcDNAを鋳型にして導入遺伝子のセンスおよびアンチセンスプライマーでPCR反応を行った。この時、遺伝子未導入ES細胞を対照とし、増幅DNAバンドの有無などで判断した。また同時に、ウエスタンブロッティング法も行いタンパクレベルでの評価もした。

(5) ES細胞の誘導された遺伝子発現の確認

遺伝子導入ES細胞を用い、まず導入遺伝子が発現した状態で他の尿路発生の各段階で発現してくる遺伝子に変化がないかどうかをRT-PCR法を用い確認した。また細胞の形態変化なども評価した。

(6) ES細胞の分化実験

遺伝子導入ES細胞をLIFを除いた培養液中でhanging drop法を用いembryoid body

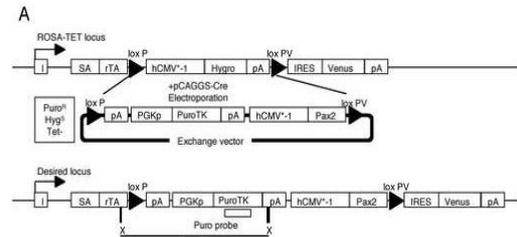
(胚様体: EB)を形成させ、分化させた。5日後にEBを再度ディッシュに付着させ、分化を進めて、時間の経過とともに細胞を回収し、発現してくる遺伝子に変化がないかどうかをRT-PCR法を用い確認した。また分化させた細胞塊を細胞免疫染色法にて発現蛋白や形態を評価した。

4. 研究成果

(1) Pax2遺伝子導入ES細胞の作成

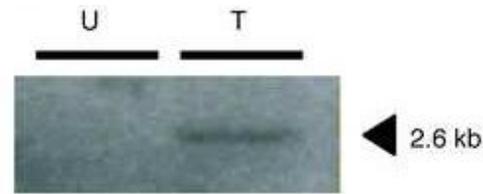
Pax2遺伝子をもったvectorとexchange vectorをES細胞とともにelectroporation法にて遺伝子導入をした。

上記Pax2遺伝子導入ES細胞をSouthern



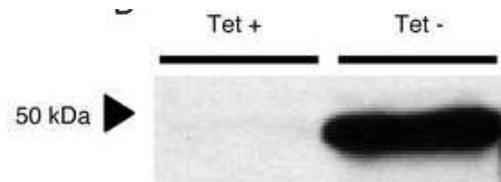
blotting法及びWestern blotting法にて遺伝子導入されていることとタンパクレベルでの発現があることを確認した。

Southern blotting法; 遺伝子導入されたES



細胞(T)のみpick upできた。

Western blotting法: テトラサイクリンオフ



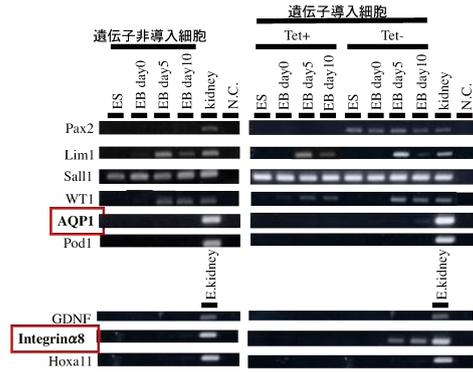
システムにてタンパク質レベルでも発現が調整されていることを確認できた。

(2) RT-PCRによる発現遺伝子の評価

Pax2遺伝子を導入したES細胞をhanging drop法を用いEBを形成させ、時間を追って回収し、RT-PCRにて腎臓の発生に関連した遺伝子について評価した。

RT-PCR: Pax2遺伝子発現ESを分化させたEB

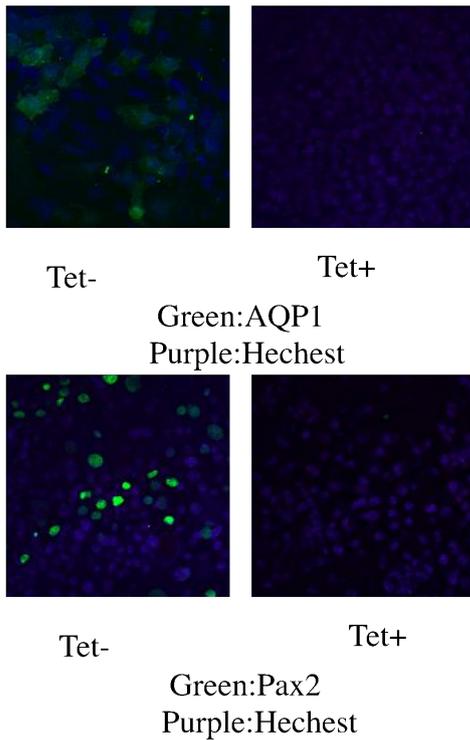
において integrin α 8 と aquaporin 1 の発現



増強が確認できた。

(3) 細胞免疫染色による評価

EB を平面培養し、Pax2 及び AQP1 にて細胞免疫染色を行い組織においてのタンパクレベルでの発現状況を確認した。細胞免疫染色：テトラサイクリン非存在下でのみ Pax2、AQP1 が発現された。



④以上より、Pax2 遺伝子導入 ES 細胞では Pax2 発現時において腎臓の発生に重要な遺伝子の発現が確認できた。その中で AQP1 は近位尿細管に発現する水輸送蛋白であり、近位尿細管が形成されたことが示唆された。

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)

1. Kojima Y, Mizuno K, Nakane A, Kato T, Kohri K, Hayashi Y. Long-term physical, hormonal, and sexual outcome of males with disorders of sex development, J Pediatr Surg. 44:1491-6., 2009 (査読あり)
2. Nakane A, Kojima Y, Hayashi Y, Kohri K, Masui S, Nishinakamura R. Pax2 overexpression in embryoid bodies induces upregulation of integrin alpha8 and aquaporin-1, In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2009 Jan-Feb;45:62-8. Epub 2008 Nov 27. (査読あり)
3. Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Nakane A, Tozawa K, Kohri K. Activation of NF-kappaB associated with germ cell apoptosis in testes of experimentally induced cryptorchid rat model, Urology. 2009 Feb;73:389-93. Epub 2008 Nov 26. (査読あり)
4. Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Kurokawa S, Nakane A, Kohri K. Achieving a natural glanular meatus for distal hypospadias with a narrow and shallow plate: Tubularized incised plate versus modified Barcat repair. International Journal of Urology, 15:616-620, 2008 (査読あり)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 中根 明宏、林 祐太郎、黒川 覚史、水野 健太郎、小島 祥敬、丸山 哲史、郡 健二郎：Pax2 遺伝子導入 ES 細胞からの尿細管細胞分化の基礎研究。第 59 回日本泌尿器科学会中部総会、2009.10.29-31、金沢市
2. 中根 明宏、黒川 覚史、水野 健太郎、小島 祥敬、丸山 哲史、林 祐太郎、郡 健二郎、西中村 隆一：Pax2 遺伝子導入 ES 細胞からの尿細管細胞分化の検討。第 18 回日本小児泌尿器科学会、2009.9.30-10.2、淡路市
3. 中根 明宏、水野 健太郎、小島 祥敬、丸山 哲史、林 祐太郎、郡 健二郎、西中村 隆一：遺伝子導入 ES 細胞からの腎構成細胞の分化をめざして。第 6 回泌尿器科再建再生研究会、2009.6.6、神戸市
4. Nakane Akihiro, Hayashi Yutaro, Kurokawa Satoshi, Kamisawa Hideyuki, Imura Makoto, Mizuno Kentaro, Kato Toshiki, Kojima Yoshiyuki, Maruyama Tetsuji, Kohri Kenjiro: Satisfaction with voiding, appearance, and sexual function in adolescents after

hypospadias repair during childhood.
AUA 2009 Annual Meeting, 2009. 4. 25-30,
Chicago(USA)

5. 中根 明宏、林 祐太郎、丸山 哲史、
水野 健太郎、小島 祥敬、黒川 寛史、
井村 誠、郡 健二郎：膀胱尿管逆流症に
おける排尿状態の検討。第 97 回日本泌尿
器科学会総会、2009. 4. 16-19、岡山市
6. 中根 明宏、永田 大介、河合 憲康、丸
山 哲史：後腹膜炎に発生した脱分化型脂
肪肉腫の 1 例。第 242 回日本泌尿器科学会
東海地方会。2008. 12. 14、名古屋市
7. 中根 明宏、林 祐太郎、水野 健太郎、
小島 祥敬、丸山 哲史、郡 健二郎：尿
道下裂術後の排尿状態、外観、性機能に関
する満足度のアンケート調査。第 58 回日
本泌尿器科学会中部総会、2008. 11. 14-16、
大津市
8. 中根 明宏、永田 大介、河合 憲康、丸
山 哲史：5-FU、CDDP、放射線併用療法が
有効であった膀胱淡明細胞癌の 1 例。第
240 回日本泌尿器科学会東海地方会、
2008. 6. 14、名古屋市

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中根 明宏 (NAKANE AKIHIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
研究員
研究者番号：70464568