

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 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790794

研究課題名（和文）

強制発現系を用いた足細胞分化転換の試みと治療応用を目指した移植アッセイ法の確立

研究課題名（英文）

Development of gene transducing methods into the kidney

研究代表者

小林 千余子 (KOBAYASHI CHIYOKO)

奈良県立医科大学・医学部・講師

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。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。特に糸球体を構成するポドサイト（足細胞）は腎臓前駆細胞に由来する最終分化細胞であり、慢性腎不全の際、最初に障害を受けることが報告されていることから、足細胞の誘導法開発は臨床的にも非常に意義のあることだと考える。そこで本研究ではまず、足細胞に発現している転写因子群に着目し、レンチウイルスによる強制発現系を立ち上げ、後腎間葉の培養系での足細胞への分化転換に挑戦した。

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. The kidney glomerulus is a specialized filtration unit, capable of filtering large volumes of plasma into primary urine. Filter failure results in proteinuria, which may lead to a pathologic chain reaction with end-stage renal disease as a final outcome. In recent years, the podocytes, in particular their foot processes and the SD located between them, have been shown to play a central role in glomerular disease. There exists two strategies of regenerative medicine for glomerular disease: (1) Cell transplantation of podocytes which were induced in vitro culture system and (2) Conversion adult cells into podocytes in vivo by gene transducing system. 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
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：発生・分化・腎臓

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。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。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。

ポドサイト（足細胞）は高度に分化した上皮細胞であり、その細胞間接着機構はスリット膜を形成し、原尿産生に重要な役割を担っている。スリット膜は多数の膜蛋白からなる分子網で形成され、ネフリン、ポドシンは最も有名な遺伝子の一つである (Moeller M. J, 2002)。ネフリンのノックアウトマウスは先天性ネフローゼ症候群を呈すること (Putala H, 2001)、また慢性の腎不全において最初に障害を受けるのは足細胞であり、この時ネフリン、ポドシンの発現が減少していることが報告されている。(Furness P. N, 1999)。すなわち足細胞の機能を保つためにはネフリン、ポドシンの発現維持が不可欠であり、前駆細胞からの足細胞の誘導に関してこれらの分子を指標にすることで臨床応用にも生かせるような細胞誘導が行なえると考えた。

2. 研究の目的

我々が単離した *Sall1* 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 R, 2001)。*Sall1* は E11.5 の後腎間葉から発現していることから、*Sall1* 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 M, 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 ファイバ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した (Osafune K, 2005)。つまり後腎間葉中の多能性前駆細胞の存在が示され、逆に糸球体、近位尿細管、遠位尿細管を持つ 1 ネフロン細胞系譜は非常に近いことが明らかとなった。

2006 年の iPS 細胞誘導報告以来 (Takahashi, K and Yamanaka, 2006)、転写因子による細胞分化転換の報告が相次いでいる。特に最近発表された膵臓の外分泌細胞からの β 細胞誘導の研究報告では、系譜の近い細胞は遺伝子導入することで比較的高確率で分化転換を引き起こせる可能性が示された (Zhou, Q, 2008)。そこで足細胞に発現している転写因子群に着目し、強制発現の系を立ち上げ、ポドシンの発現を指標とすることで、後腎間葉の培養系および成体腎での足細胞への分化転換に挑戦することを考えた。

3. 研究の方法

(1) 強制発現系としては導入効率のよいレンチウイルスの使用を考えた。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ている *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。

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細胞に有効である可能性が示唆された。そこで、足細胞で発現していると報告がある遺伝子のうち、転写因子に着目し、11 種の候補遺伝子に関して単離、tag をつけ、導入細胞の同定が出来るようにしたレンチウイルスベクターの作製を試みた。

(2) またポドシンプロモーター下にテトラサ

イクリンアクチベーター (podocin-rtTA) を繋げたトランスジェニックマウスと、テトラサイクリンアクチベーターに反応するプロモーター制御下にジフテリア毒素 A サブユニットを発現するマウス (tetO-DTA) をかけ合わせることで、それぞれの遺伝子をヘテロにもつ組織及びマウスはテトラサイクリンを培養液に添加 or 経口投与することで時期特異的に足細胞に障害を与えることができるかを検討した。

4. 研究成果

(1) 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1)。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。そこで 11 種類の糸球体特異的転写因子を単離、導入細胞の同定が出来るようにした tag をつけたウイルスベクターに組み込み、ウイルスを産生させて、タイターチェックを行った。しかしながら理想とされるタイターまで十分にあげることができず、感染効率が非常に低かった。現在濃縮方法や、遺伝子導入の条件を検討中である。

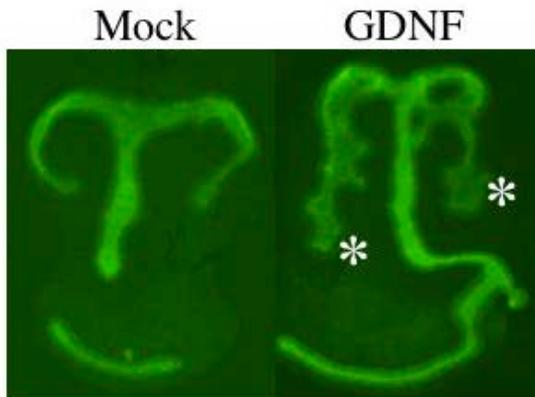


図1 GDNF 遺伝子を発現するウイルスを E11.5 の後腎に感染させると、過剰な尿管芽

の分岐が確認された。

(2) ポドシンプロモーター下にテトラサイクリンアクチベーター (podocin-rtTA) を繋げたトランスジェニックマウスと、テトラサイクリンアクチベーターに反応するプロモーター制御下にジフテリア毒素 A サブユニットを発現するマウス (tetO-DTA) をかけ合わせることで、それぞれの遺伝子をヘテロにもつ組織及びマウスはテトラサイクリンを培養液に添加 or 経口投与することで時期特異的に足細胞に障害を与えることができると考えられた。そこで経口投与による足細胞障害過程を発生期、成体期で観察したが、糸球体疾患が見られなかった。しかしながら E13.5 からの後腎間葉の器官培養では、テトラサイクリンを培養液に添加することで、糸球体の発生が阻害された。現在個体内でのテトラサイクリンの有効濃度の条件を検討中である。

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 2 件)

(1) 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.

(2) 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. 107:9240-9245.

〔学会発表〕（計 1 件）

(1) 小林千余子, 石原悟, 裏山悟司, 永渕昭良

β カテニン分解機構の新たなモデル：E-カドヘリン- β カテニン融合タンパク質の機能解析

第 8 回宮崎サイエンスキャンプ 2012 年 2 月 17 日、宮崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 千余子 (KOBAYASHI CHIYOKO)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：20342785