

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 4 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791485

研究課題名(和文) Pax2 遺伝子導入胚性幹細胞を用いた腎発生機構の解析と腎再生に向けた基礎研究

研究課題名(英文) The basic research about the investigation of the mechanism about the kidney generation and the application to kidney regeneration medicine using Pax2-recombinant 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):

Pax2 遺伝子導入 ES 細胞から胚様体(EBs)を形成させ、アクチビン A(AA)とレチノイン酸(RA)を添加し培養し、RT-PCR 法および免疫染色法を用い検討した。Pax2 遺伝子を発現させた EBs では、integrin $\alpha 8$ 、AQP1 の発現亢進を認めた。AA・RA 添加すると、BMP7、Pax8、Podcin の発現亢進を認めた。Pax2 遺伝子を発現させることで、ES 細胞から腎細胞への分化が誘導されたと考えられた。腎発生メカニズムの解明や腎再生医療への応用が期待された。

研究成果の概要(英文):

We have generated ES cell lines that repress Pax2 expression and examined their differentiation potential by embryoid body (EB) formation. EBs were cultured with retinoic acid and activin A. EBs were analyzed by reverse transcription (RT)-PCR and immunocytochemical analysis. EBs expressed Pax2 and subsequently integrin $\alpha 8$ and AQP1. With retinoic acid and activin A, EBs overexpressed Pax2-induced BMP7, Pax8 and Podocin, ES cell lines with inducible Pax2 expression may be useful for dissecting genetic cascades functioning in the development of various organs, including the kidney, 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
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、腎再生、Pax2 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 末期慢性腎不全の現状

末期腎不全から血液透析導入となる患者数は、平成19年の推計で年間3万人を超え、総数は28万人以上であり、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る。

(2) 腎臓の再生医学の現状

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た。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ている。

(3) 私たちが行ってきた再生医学研究

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わない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、Sallファミリーの解析が行われている。Sall1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Sall1とSall4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に取り組んできた。現在まで、Pax2遺伝子導入ES細胞から尿細管に発現するAQP1蛋白陽性の細胞が分化できることを証明し報告した。今後はさらにこの知見を発展させ、生体内への移植を試みたい。

2. 研究の目的

本研究は、幹細胞を用いた再生医療の技術およびティッシュ・エンジニアリングの技術を相補的に利用し、Pax2遺伝子を導入したES細胞から分化させる腎臓の構成細胞を実際の再生医療に応用できる方法で、細胞から生体内への移植を行い、慢性腎不全状態から腎機能を改善することが可能であることを検討し、確立することが目標である。

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、本研究室以外からもES細胞から尿細管組織への分化が報告された。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 細胞から腎臓細胞を分化させ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、腎臓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 細胞を確立した。この細胞から近位尿管を分化できる可能性があるが、実際に生体内で生着し機能するかどうかは不明である。

本研究では、まず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状態で、その細胞塊を複数の方法を用いマウス成体、特に腎臓に移植することで生着や腎臓組織へ分化することを確認する。以上のことを本研究期間内に達成したいと考えている。臓器幹細胞を得られない臓器は、より未分化な ES 細胞から組織の幹細胞を分化させる手段が考えられる。また臓器を再生させるためには、その素材となる細胞の量も重要となるが、ES 細胞は未分化な状態で大量に増殖させることが可能である。このように ES 細胞を用いて各臓器を構成することは、非常に先駆的で発展性の高い研究である。また複雑な形態、構造を持つ腎臓の構成細胞を得るためにはそれぞれのセグメントでの幹細胞を得る必要がある可能性がある。このような状況からもより未分化で、すべての細胞に分化できる能力を有する ES 細胞を用いることは有用であると考えられる。さらに、腎臓の分化に重要である遺伝子を導入し、強制発現させた ES 細胞または分化させた細胞塊を用いることでその可能性がさらに広がることを期待される。

Pax2 遺伝子導入 ES 細胞を分化させることで、腎臓細胞が誘導されることが予想される。腎臓の機能を再生させるため、必要な細胞を得るという観点や、研究ツールとして ES 細胞、特に遺伝子導入可能なものを用いることには大きな意義があると考えられる。

3. 研究の方法

(1) ES細胞への遺伝子導入

マウスより確立されたES細胞のMGZRTcH2(Mをキュベット(BIO-RAD Gene Pulser cuvette[®])内に混ぜ入れ、960 μ F、250mVの条件でelectroporation法を行い、Pax2遺伝子を導入する。更に、Neomycin、PuromycinでselectionしたPax2遺伝子導入ES細胞(以後Pax2 ES細胞)を得る。

(2) ES細胞の培養と分化

5% CO₂、37°Cで、培養液はGlasgow MEMに10% FCS、10⁻⁴M 2-メルカプトエタノール、non-essential aminoacid、1mM sodium pyruvate、1000U/ml LIF (leukemia inhibitory factor: ESGRO[®])を加えたもので培養する。Pax2 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る。5日後にEBを再度ディッシュに附着させ、分化を進めて、時間の経過とともに細胞を回収および細胞の形態変化を観察する。また培養時は3次元培養など様々な培養法を試みる。当研究室で行った以前の検討では、EBを再度ディッシュに附着させて5日目~10日目でaquaporin-1の上昇を認めているので、この時期を目安にEB自体(0日目)、5日目、10日目のように複数の時期で細胞塊を回収し、次の遺伝子発現確認実験および移植実験に向けて準備する。

(3) RNAの抽出と回収

ディッシュに平面培養したES細胞およびEBを0.25%トリプシン EDTA 溶液にて回収し、TRISol[®]、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。

(4) RT-PCRによる発現遺伝子の確認

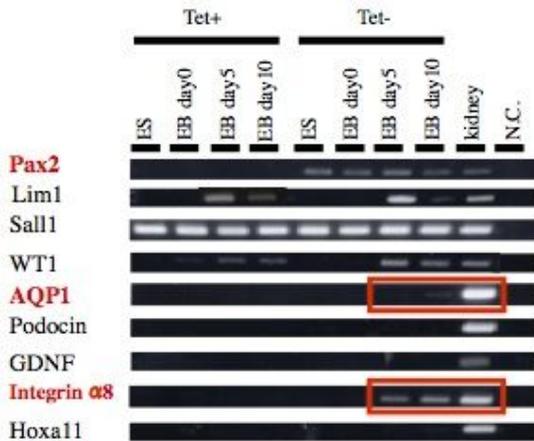
回収した Pax2 遺伝子導入 ES 細胞および EB にまずは Pax2 遺伝子が発現しているかどうかを RT-PCR 法を用い確認する。オリゴ dT プライマー、SuperScript II[®]キット、dNTP mix にて逆転写反応を行う。得た cDNA を鋳型にして導入遺伝子のセンスおよびアンチセンスプライマーで PCR 反応を行い、増幅 DNA バンドの有無などで判断する。同様に他の腎臓の各段階で発現してくる遺伝子に変化がないかどうかを RT-PCR 法を用い確認する。

(5) Pax2 ES細胞から作成したEBの免疫不全マウスへの移植

hanging drop 法を用い、Pax2 ES 細胞から分化させた EB とそれを数日間分化させた細胞塊をそれぞれ免疫不全マウス (Sevfe Combined ImmunoDeficiency: SCID マウス) の腎被膜下、腎実質に移植、または経静脈的に注入して数週間後に腎臓組織を摘出し、HE 染色や免疫染色で組織学的検索を行う。この際、ES 細胞や EB を生体に移植すると teratoma (奇形腫) を形成することが知られているので、すべての胚葉の成分が混在した組織である。Pax2 ES 細胞を腎被膜下、腎実質に移植することで腎臓組織の形成の有無を確認する。

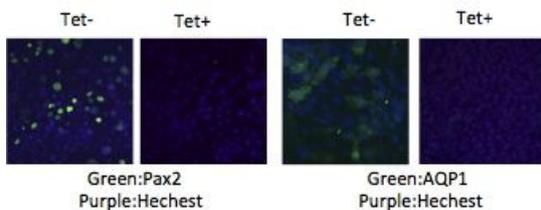
4. 研究成果

自己では再生しない腎臓の疾患から末期慢性腎不全に陥った場合、ドナー不足である腎移植治療の現状から主な治療は人工透析である。透析治療は国の財政を圧迫し、また患者の生活への負担も大きい。そこで本研究では、非常に複雑な構造と多くの細胞群により構成される腎臓を再生するために、当研究室で確立している腎・尿管発生に重要な働きをしている遺伝子である Pax2 を遺伝子導入した ES 細胞から腎構成細胞を分化させることで新しい腎臓の再生医療の技術を確認することを試みた。この ES 細胞は、導入した遺伝子発現の調節が可能であるもので、Pax2 遺伝子は electroporation 法で導入した。この ES 細胞において、胚様体(EBs)を形成させ、中胚葉分化因子であるアクチビン A(AA)とレチノイン酸(RA)を(1)非添加、(2)添加の条件別に EBs の平面培養を行った。EBs をそれぞれ回収し、腎臓発生に関連する各種遺伝子発現を RT-PCR 法により評価した。さらに、糸球体や尿管など腎構成細胞の有無について免疫染色法を用い検討した。(1)AA・RA 非添加群で Pax2 遺伝子を発現させた EBs では、integrin $\alpha 8$ 遺伝子(間葉細胞に発現する接着因子)と aquaporin-1 遺伝子(近位尿管マーカー)の発現亢進を認めた。(図 1)



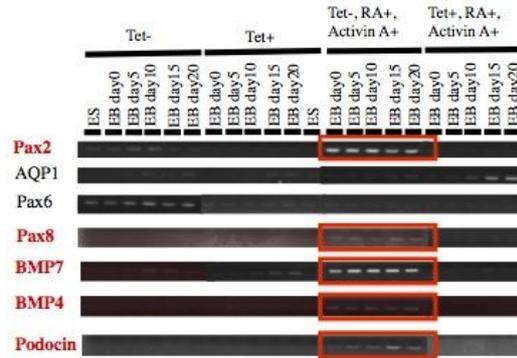
【図 1】

免疫染色では、aquaporin-1 陽性細胞数の増加を確認することができた。(図 2)



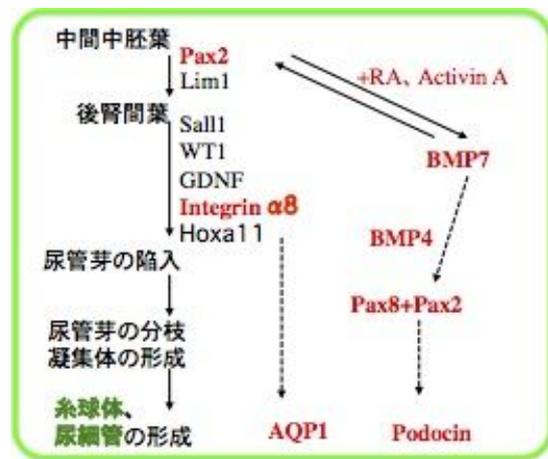
【図 2】

(2)AA・RA 添加群においては、BMP7 遺伝子(間葉細胞から尿管への分化に関連する因子)、Ret 遺伝子(GDNF と協調し尿管芽形成する因子)、Pax8 遺伝子(Pax2 遺伝子と協調し尿管芽形成する因子)、Podcin 遺伝子(糸球体の足細胞のマーカー)などの発現亢進を認めた。(図 3)



【図 3】

Pax2 遺伝子を強制発現させることで、腎構成細胞あるいは前駆細胞の構成比率が増加し、ES 細胞から腎細胞への分化が誘導されたと考えられた。さらに中胚葉分化因子との協調により、腎を構成する多様な細胞への分化が可能と考えられ、腎発生メカニズムの解明や将来の腎再生医療への応用が期待された。



【図 4】

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Nakane Akihiro, Nishinakamura Ryoichi, Mizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Maruyama Tetsuji, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Pax2 overexpression in embryoid bodies induces upregulation of genes with retinoic acid and activin a involved in kidney development. AUA 2011, 2011.5.14-19, Washington, USA
- ② 中根 明宏、神沢 英幸、黒川 覚史、佐々木 昌一、林 祐太郎、西中村 隆一、郡健二郎: 腎再生医療に向けた Pax 遺伝子導入による腎細胞への分化誘導。第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011.4.21-24、名古屋市
- ③ Nakane Akihiro, Nishinakamura Ryuichi, Mizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Maruyama Tetsuji, Hayashi Yutaro, Konri Kenjiro: PAX2 overexpression in embryoid bodies induces upregulation of Integrin $\alpha 8$ and aquaporin-1 involved in kidney development. AUA 2010 Annual Meeting, 2010.5.29-6.3, San Francisco, USA

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