

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659446
 研究課題名（和文） 発生期腎臓細胞を用いた 3 次元構造の再構築
 研究課題名（英文） Reconstitution of three-dimensional structures from the embryonic kidney 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）：

成体の腎臓は再生しないが、発生期腎臓の後腎間葉にはネフロン前駆細胞が存在し、それが尿管芽と相互作用しながら多系統に分化していく。iPS 細胞の樹立以降、2 次元での腎臓細胞誘導を多くの研究者が試みているが、それに成功しても 3 次元構造が作れなければ腎臓再生はおぼつかない。よって本計画では、ネフロン前駆細胞を含む発生期の腎臓細胞を使って、3 次元立体構造を再構築することを試みた。

研究成果の概要（英文）：

The embryonic kidney contains nephron progenitors, which interact with the ureteric bud to differentiate into multiple lineages of the nephron. Upon establishment of the induced pluripotent cells, many researchers aim at induction of nephron progenitors. However, induction of two-dimensional progenitors alone is not sufficient to regenerate the kidney. Therefore we tried to reconstitute the three-dimensional structures from the embryonic nephron progenitors, which will give us a hint toward the kidney regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞の樹立後、個々の細胞誘導を目指す幹細胞学が主流を占め、3 次元構造解明を目指した発生的発想をもつ研究者が激減している。2 次元の細胞誘導は理論的には可能であり、流行でもあるが、それを超えていかなければ腎臓再生はおぼつかない。

Sall1 は我々が単離した核内因子であり、そのノックアウトマウスは腎臓を欠損する (Nishinakamura et al., Development 2001)。この遺伝子座に GFP を導入したマウス (Takasato et al., Mech. Dev. 2004) から Wnt4 存在下にコロニーを作らせることによ

り、Sall1 が高発現する後腎間葉中に、1 個の細胞から糸球体、近位尿細管、遠位尿細管という多系統に分化するネフロン前駆細胞が存在することを証明した (Osafune et al., Development 2006)。さらにこの Sall1 強陽性細胞を再凝集させて Wnt4 で刺激するだけでも、3 次元構造がある程度形成されることを証明している。しかしこの構造は尿管芽を欠くため不完全なものであった。よってネフロン前駆細胞を含む発生期の腎臓細胞を使って、より生体に近い 3 次元立体構造を再構築できないかと考えた。我々を含め多くの研究者が、iPS 細胞からネフロン前駆細胞の誘

導に取り組んでいるが、それに成功したとしても、所詮2次元の細胞集団であり、そこから3次元構造が作れなければ腎臓再生はおぼつかない。本計画はこれに正面から挑むものであった。(太字文献は研究代表者の関与した論文)

2. 研究の目的

成体の腎臓は再生しないが、発生期腎臓の後腎間葉にはネフロン幹細胞が存在し、それが尿管芽と相互作用しながら、糸球体ポドサイト、近位、遠位尿細管など多系統に分化していく。iPS細胞の樹立以降、2次元での腎臓細胞誘導を多くの研究者が試みているが、それに成功しても3次元構造が作れなければ腎臓再生は不可能である。よって本計画は、ネフロン前駆細胞を含む発生期の腎臓細胞を使って、3次元立体構造を再構築することを目的とした。

(1) まず腎臓を欠損する *Sal11* ノックアウトマウスの腎臓原基と正常型ネフロン前駆細胞を共培養することによって、腎臓の構造回復を検討した。

(2) さらに、単一細胞レベルに解離した間葉(ネフロン前駆細胞)と intact な尿管芽から、器官培養法で立体構造の再構築に迫った。使用するマイクロドロプレット法は、歯牙再生に有効であることが示されている。歯牙も間葉と上皮の相互作用によって生じ、それぞれを解離したあと高密度で培養することによって、完全な歯が形成されることが東京理科大学の辻教授らによって示されている(Ikeda et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009)。これを改変することによって、発生期腎臓細胞での3次元再構築法を確立できると考えた。

これらが実現すれば、ES/iPS細胞からネフロン幹細胞が誘導された際に適用することによって、試験管内で腎臓を作るという研究が現実味を帯びることを期待しての計画立案であった。

3. 研究の方法

(1) ネフロン前駆細胞による間葉欠損の回復 - *ex vivo*

Sal11 が分化した細胞にも多少発現することから、前駆細胞だけをより効率よく純化するために新たに後腎間葉中のネフロン幹細胞のみが蛍光発色する *0sr1-GFP* マウスを作成した(未発表)。このマウスから単離したネフロン幹細胞を再凝集させ、腎臓を欠損する *Sal11* ノックアウトの胎生 11.5 日腎臓原

基とともに、液層と気層の境界で器官培養して、腎臓形成が回復されるかを検討した。*Sal11* ノックアウトの間葉(ネフロン前駆細胞)は、培養数日の間にアポトーシスにより消失する。しかし尿管芽の機能は正常なため、正常なネフロン幹細胞が隣接すれば、そちらに向かって尿管芽が分岐することによって、立体構造が回復することが期待される。細胞塊の大きさ(細胞数)、培養液の組成(血清や液性因子の有無)など至適な条件を決定する。これによって細胞融合の可能性を否定しつつ、腎臓がもとに戻るかをみることができる。

(2) 成体腎臓構造の回復検討- *in vivo*

Sal11 のノックアウトの時期を遅らせることにより、成体まで生存するものの腎臓が小さく機能が低下していくマウスが得られている。この腎臓皮下にネフロン前駆細胞を注入し、腎臓構造回復の有無、移植する最適時期、必要な細胞数、移植した細胞と既存構造との接続などを検討する。正常の成体マウスではまず成功しないと予測されるが、このようにネフロン幹細胞が減少する環境での実験は皆無であり、試す価値があると考えた。

本計画はあくまでもネフロン前駆細胞を使った腎臓再生であるが、バックアップとして、*Sal11* ノックアウトの胚盤胞に正常な ES 細胞を注入することによって、3次元構造をもつ腎臓再生を目指すことも視野に入れた。

(3) マイクロドロプレット法による3次元構造再構築

歯牙再生において成功しているマイクロドロプレット法(Ikeda et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009)を腎臓に応用する。この方法を開発した東京理科大学の辻教授に技術的アドバイスをいただいた。胎生 11.5 日の間葉を単一細胞レベルに解離する。それを遠心して作成した再凝集塊をハミルトンシリンジで採取し、シリコンコートプレート上に作った 20ul のコラーゲンゲル drop 内で、intact な尿管芽と接着させて培養し、さらに液層と気層との境界で器官培養する。ある程度の3次元構造が構築された場合は大網に移植して、成長を観察する。大網は血流が豊富で、胎生期腎臓を移植するとかなり大きくなることが知られているためである。これによって *in vitro* で作られた3次元構造がどこまで成長可能かを調べることができる。その後、片側あるいは両側の腎臓を摘出することで、大網内に作られた腎臓がどの程度機能的かをみることも可能である。

4. 研究成果

(1) ネフロン前駆細胞による間葉欠損の回

復 - ex vivo

Osr1GFP マウスの胎生期腎臓から FACS によって GFP 陽性細胞つまりネフロン前駆細胞を単離し、1 日間浮遊培養すると、分化能を保ちつつ球体の塊を形成することを確認した。この塊を、胎生 11.5 日の *Sal11* ノックアウトマウスの腎臓原基に接触させて、液層と気層の境界で器官培養する計画であった。しかし *Sal11* ヘテロマウスの交配が非常に悪く、十分な数の実験をこなすことができなかった。*Sal11* ノックアウトは C57BL/6 に戻し交配が進むと不妊傾向を示すため、凍結保存された 129 と C57BL/6 の初代ハイブリッドを融解して再度系統を樹立した。しかしその間に他の計画が進んだので、こちらの計画は中断した。

(2) 成体腎臓構造の回復検討- in vivo

コンディショナル *Sal11* ノックアウトマウス (*Sal11*CreER/flox*Sal11*) は、生直後にタモキシフェンを投与すると 48 時間以内に *Sal11* を欠失し、生存はするものの小さい腎臓が形成される (Inoue et al., *Genesis*, 2010)。これに上記のネフロン前駆細胞塊を移植することによって、腎臓構造の回復を図る計画であったが、*Sal11* ノックアウトによる腎臓形成障害の変動幅が大きく、移植細胞による効果の判定が困難であった。少なくとも劇的な効果は見られないようであった。

そこでバックアップとして、*Sal11* ノックアウトの胚盤胞に正常な ES 細胞 (DsRed で赤く標識) を注入し、子宮に移植して成長させる戦略をとった。その結果、3次元構造をもつ ES 由来の腎臓が形成された (Usui et al., *Am J Pathol*, 2012)。これはノックアウトを臓器再生のニッチとして使用できることを示したものである。残念ながら *Sal11* の発現が後腎間葉に局限するため、置換できたのはその部分だけであり、尿管芽や血管等は宿主由来のままであった。また形態的には腎臓が構築できているものの、ノックアウトマウスは依然として出生直後に死亡した。これは腎臓の機能が回復していない、あるいは他臓器の異常 (特に哺乳異常) が補償していないためと考えられ、この点の改善が必要である。現在、我々が作成した他の腎臓欠損マウス (複数種) を使って、生存するノックアウト個体がとれないかを検討している。またブタ等の大動物に向けての方法論の開発を行っている。これらの研究は東京大学の中内啓光教授らとの共同研究として行った。(太字文献は研究代表者の関与した論文)

(3) マイクロドロプレット法による 3 次元構造再構築

胎生期の間葉を単一細胞レベルに解離して再作成した凝集塊を、コラーゲンゲル内で尿管芽と接着させて培養した。その結果、部分的ではあるが 3 次元構造をもつ腎臓様の構造を再現できた。次いで間葉の再凝集塊をより簡便に作る方法を開発し、それを尿管芽とともに培養したところ、尿管芽が分岐し、糸球体も不完全ながら形成された。培養液の成分を変更することによっても、腎臓の発生がある程度進んだ。解離した間葉から再構成された糸球体としては、既存の報告より分化した段階のものと考えている。しかしそれ以上の成熟は見られず、*in vitro* ではさらに条件改善が必要と考えられた。

そこで数日の培養後、成体に移植して成熟するかを検討した。血管が豊富な大網や精巣上体に移植したが、少なくとも我々の手では腎臓被膜下が最も安定した結果を示した。いずれの条件でも、移植されたものに血管が侵入し、血管を伴う糸球体が形成された。血管は腎門部からではなく、外側から毛細血管として侵入してくるため、十分な血流量は望めないが、現時点としてはこれが限界であろう。糸球体が成熟したのに対して、予想外に尿管の成熟は移植しても進まず、却って退行しているケースが多かった。これは intact な胎生期腎臓を移植した場合でも同じで、尿管の成熟にはさらにステップが必要であること、つまりある程度尿管ができればあとは自動的に成熟するわけではないことが示唆された。確かに胎生 14.5 日までの腎臓発生機構は比較的解明されてきたが、それ以降のメカニズムはあまり明らかでない。今後この後期過程の解明が必要である。

(4) 今後の展望

2次元の細胞誘導は流行でもあるが、それを超えていかなければ腎臓再生はおぼつかない。本計画はそれに正面から挑むものであったが、予想通り数々の困難に直面し、失敗も多かった。だが試行錯誤の中で、いくつかの重要な知見と課題を得た。前者は細胞解離後の凝集塊の作成法、培養液の組成、移植法などであり、後者は血管導入、尿管成熟の問題である。いずれもこの挑戦の萌芽研究に採択されなければ進まなかったものであり、腎臓再生を目指す我々にとっては非常に有意義な結果であった。採択してくれた選考委員に感謝したい。ここを切り開くことができれば、ES/iPS 細胞からネフロン前駆細胞が誘導された際に適用することによって、試験管内で腎臓を作るという研究が現実味を帯びる。今後も挑戦していきたいと考えている。最後に、論文になりにくく、かつ非常に細かい作

業を必要とされるこのプロジェクトに果敢に挑んでくれた賀来祐介君に深く感謝したい。

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1件)

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.** 80(6): 2417-2426, 2012. 査読有 doi: 10.1016/j.ajpath.2012.03.007.

[学会発表] (計1件)

西中村隆一、小林俊寛、臼井丈一、渡邊将人、長嶋比呂志、中内啓光 遺伝子改変マウスを用いた腎臓再構築の試み 器官臓器再生第12回日本再生医療学会 2013年3月22日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[その他]

熊本大学発生医学研究所腎臓発生分野ホームページ

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