

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591209

研究課題名(和文)腎臓欠損マウスを用いた異種間腎臓再生

研究課題名(英文)Generation of kidney by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells

研究代表者

橋本 達夫 (HASHIMOTO, Tatsuo)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：20363806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はヒト腎臓再生を見据えた、新しい医療を切り開く研究である。腎臓欠損マウスを用いたラット腎臓の再生を目標として、腎臓欠損マウスを用いたマウス腎臓の再生を行った。

作製した腎臓欠損マウスの胚細胞に野生型マウスのiPS細胞またはマウスES細胞を注入し、得られたマウスの解析を行った。得られたマウスのうち、腎臓欠損マウスの胚細胞は25%得られるが、入り込んだiPS細胞またはES細胞が正常に機能する腎組織となる確率はさらに低かった。C57BL/6J背景では、得られる仔体数が少なかつたため、雑種を交配し、仔体をたくさん得ることに成功しはじめたところである。もう1年の猶予が必要である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to generate rat kidney in mouse by inter specific injection of stem cells, toward human kidney generation. At first, I injected mouse ES cells to generate mouse kidney.

First, I generated kidney deficient mouse. Second, I injected mouse ES cells into embryo. Kidney deficient embryo would be expected to exist 25% under the Mendelian ratio. Rare mouse which has fully functioned kidney from injected cells can alive. An advice from coworker helped me to mix background. Then I can get more mice than before.

This study has possibility to generate brand new medical treatment towards human organ generation.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓再生

1. 研究開始当初の背景

30万人の末期腎不全患者にとって、透析医療は生きていくために必須であるが、医療費圧迫の一因となっている。一方、腎移植療法は提供者の確保という難関をクリアしなければならない。

患者自身の細胞を用いた腎臓再生は、透析医療、腎移植に替わる第三の医療として実現が期待されている。

近年、iPS細胞の開発により、この腎臓再生が現実味を帯びてきた。さらに研究協力者である中内らは、膵臓欠損マウスの胚細胞に野生型ラットのiPS細胞を注入することによって、異種間でのドナー由来の膵臓の作製に成功しており (*Cell*, 2010)、患者自身の細胞を用いた腎臓再生へ一歩近づいたと言える。

研究代表者は、これまで遺伝子操作マウスの作製および解析を行ってきた (*J Biol Chem*, 2004) (*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006) (*Am J Pathol*, 2007)。研究代表者は、Hs2st1遺伝子をCre酵素依存的に欠損できるマウスを今回新たに作製した (*Hs2st1^{flox/flox}*) (未発表)。全身でHs2st1遺伝子を欠損したマウス (*Hs2st1^{-/-}*) は、腎臓を欠失している (*Genes Dev*, 1998)。今回研究代表者は、腎臓を欠失した *Hs2st1^{-/-}* マウス胚細胞に野生型動物のiPS細胞を注入することにより、ドナー由来の腎臓の再生を試みるという着想に至った。

腎臓再生には発生学に基づいた方法と、動物個体内の環境を利用した方法がある。発生学に基づいた方法は、ネフロン前駆細胞と尿管芽細胞とをiPS細胞あるいはES細胞から誘導し、血管、間質を伴った3次元構造の腎臓を作製することを目的としているが、実現には解決しなければならない課題が多い。一方、動物個体内環境を利用した方法は、近年いくつかのアプローチが成功している。まず、Gdnfを発現するヒト間葉系幹細胞をラットの発生期腎臓領域に注入することで、ヒトとラットのキメラ腎臓が再生されている (*Proc Natl Acad Sci USA*, 2005)。さらに近年、ラットiPS細胞を膵臓欠損マウスの胚細胞に注入することで、ラット由来の膵臓をマウス個体で再生することに、研究協力者が成功した (*Cell*, 2010)。同様の再生が、ブタにおいても成功した (*Proc Natl Acad Sci USA*, 2013)。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト腎臓再生の第一歩として、腎臓欠損マウスを用いた腎臓の再生を目的とする。研究代表者はすでに腎臓欠損マウスを作製した。本研究では、この腎臓欠損マウスの胚細胞に野生型動物のiPS細胞あるいはES細胞を注入することにより、ドナー由来

の腎臓の再生を試みる。さらに異種間あるいは大動物での腎臓再生も視野に入れている。本研究は、個体環境を用いて腎臓再生を試みるという、画期的な試みである。

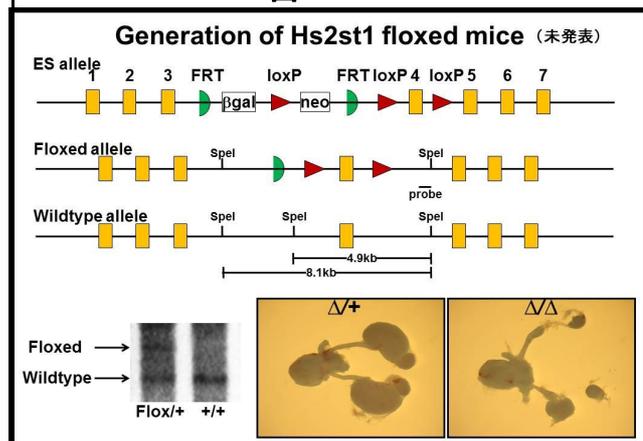
3. 研究の方法

本研究は、腎臓再生をマウス個体で行う。まず腎臓欠損マウスの作製を行った。野生型動物のiPS細胞やES細胞の培養および胚操作については、すでに膵臓で実績のある中内研究室と共同で行った。腎臓欠損マウスの作製、同種間での腎臓再生、異種間での腎臓再生、そして大動物での腎臓再生を、段階的に進めた。

4. 研究成果

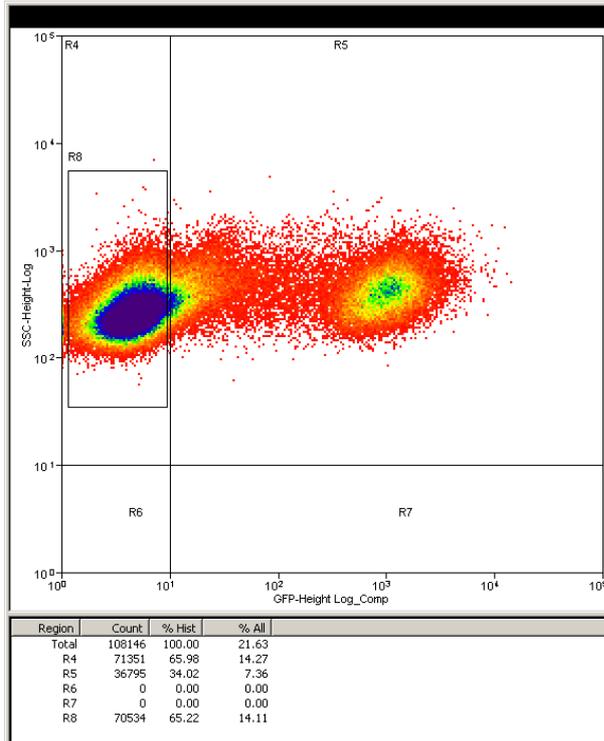
腎臓欠損マウスである *Hs2st1^{-/-}* マウスを作製した。Hs2st1遺伝子をCre酵素依存的に欠損できるマウスを作製した (*Hs2st1^{flox/flox}*) (未発表)。このマウスをアクチンプロモーター制御下で全身でCre酵素を発現するマウスと交配し、全身でHs2st1遺伝子を欠損したマウス (*Hs2st1^{-/-}*) を作製した。この *Hs2st1^{-/-}* マウスは、腎臓を欠失していることが既に報告されている (*Genes Dev*, 1998)。研究代表者の得たマウスでも同様に腎臓が欠損していた (図1)。

図1



次に、野生型マウスのiPS細胞あるいはES細胞を *Hs2st1^{-/-}* マウス胚細胞に注入し、腎臓が再生されるか否かを検討した。得られた仔体の遺伝背景の検討は以下のように行った。採取した臓器を細胞単位にばらばらにし、注入したiPS細胞あるいはES細胞(GFP陽性)と、もともとの仔体(GFP陰性)とをFACSでソートした。

図2



そして、GFP 陰性のもともとの仔体由来の細胞をジェノタイピングし、ホモで改変遺伝子を持つ仔体が目的の仔体である。

図3

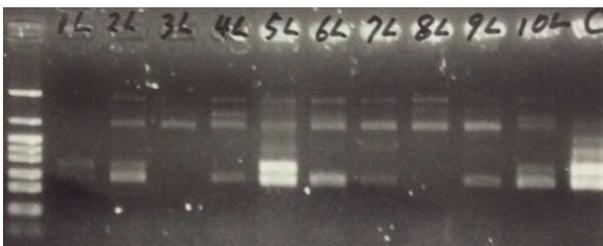


図3のように、得られた仔体はヘテロ接合体か、野生型のみである。マウス繁殖に成功してから、3回インジェクションを行い、100仔体以上のジェノタイピングを行ったが、現在のところ、目的のホモ接合体は得られていない。目的の仔体が得られたら、作製された腎臓はiPS細胞あるいはES細胞由来である。その機能や形態等を詳細に解析する。

次の段階として、同じ腎臓欠損マウスの胚細胞にラットES細胞を注入する方法を試みる。さらにその次の段階としては、ブタで同様の手法を用いる。本研究の成功は、確率論的問題であるため、頻回に行えば成功する確率はその分上昇する。

本研究は、すでに膝臓で成功しているものと同様の手法を腎臓に応用したものである。現時点では成功は約束されていないが、本研究の切り開こうとする分野は、将来のヒト腎臓再生を目指したものであり、その意義は大きい。仮に成功しなくても、本研究から得られる知見は、ヒト腎臓再生へのステップとなる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本達夫 (HASHIMOTO, Tatsuo)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：20363806

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

梅村 敏 (UMEMURA, Satoshi)

横浜市立大学・医学研究科・教授

鈴木 将太 (SUZUKI, Syota)

横浜市立大学・大学院医学研究科・大学院生

中内 啓光 (NAKAUCHI, Hiromitsu)

東京大学・医科学研究所・教授

山口 智之 (YAMAGUCHI, Tomoyuki)
東京大学・医科学研究所・特任准教授

Josef Penninger
オーストリア科学アカデミー・分子生物工学
研究所・教授

中澤 正年 (NAKAZAWA, Masatoshi)
横浜市立大学・医学部・准教授