

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860640

研究課題名(和文) 腎臓ネフロン前駆細胞の維持機構解明による自己複製法の確立

研究課題名(英文) In vitro propagation of nephron progenitors from mouse embryo

研究代表者

谷川 俊祐 (Tanigawa, Shunsuke)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：10726318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体の主要臓器である腎臓は再生しないが発生期には腎臓を造り上げる前駆細胞集団が存在している。しかし、それらはネフロンを構成する細胞へと分化し生後には消失する。このことが腎臓が再生できない理由の一つと考えられる。本計画は、動物種を越えたネフロン前駆細胞の増幅培養法を確立することを目的とした。ラットのネフロン前駆細胞の維持に重要なLIFとWnt, Fgf及びBmpを低濃度で組み合わせることにより生体の期間と数の限界を超えてマウスの前駆細胞を増幅することに成功した。今後はヒトiPS由来のネフロン前駆細胞の培養法として凍結保存や移植にも応用できるよう改良し、腎臓再生医療の基盤構築を目指す。

研究成果の概要(英文)：During development, the nephron is generated through a delicate balance between propagation and differentiation of nephron progenitors; however, these progenitors cease proliferation and terminally differentiate around the time of birth (a few days after birth in mice and a few weeks before birth in humans). No new nephrons are formed in the adult kidney, which may explain the irreversible nature of chronic kidney disease. In this study, we defined culture conditions for nephron progenitor propagation including FGF9, BMP7, and a WNT-activating reagent, with the addition of leukemia inhibitory factor (LIF). Under these tightly regulated culture conditions, mouse embryonic progenitors proliferated beyond the physiological limits observed in vivo, both for cell number and lifespan (1,800 fold within 19 days), and upon administration of the differentiation cue, they readily formed three-dimensional glomeruli and renal tubules.

研究分野：腎臓発生

キーワード：腎臓発生 ネフロン ネフロン前駆細胞 Six2

1. 研究開始当初の背景

成体の腎臓は再生しない臓器であるが、胎児期の腎臓では、後腎間葉と呼ばれる組織から糸球体、近位及び遠位尿管などネフロンを構成する多系統の細胞が尿管芽からの誘導シグナルとの相互作用によって分化する。しかしこれらの細胞は出生後消失してしまう。これが成体の腎臓が再生しない一因であると考えられる。よってこのネフロンを構成する前駆細胞集団がどのように分化するのかを細胞レベルで理解することが、腎臓再生医療の基盤構築として重要である。しかし、ネフロン前駆細胞の性質や未分化状態を維持したままの培養はこれまで困難であった。

2. 研究の目的

申請者はラットのネフロン前駆細胞を未分化の状態を維持させたまま増幅する初代培養法を確立した(Tanigawa *et al.*, *Dev Biol* 2011)。この培養系を用いて核内因子 Yap がネフロン前駆細胞の分化と維持を制御する新たな機構を発見した(Das, Tanigawa *et al.*, *Nat Cell Biol*, 2013)。本研究は、この知見をラットネフロン前駆細胞初代培養法の改善に応用し、マウスのネフロン前駆細胞の培養にも適用することで種を越えた増幅培養法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

ラットネフロン前駆細胞を培養前と同等の分化能を完全に維持した状態で自己複製できる培養法に改善し、マウスのネフロン前駆細胞の培養に適用する。

Yapを標的としたラットネフロン前駆細胞培養法の改善

ラットネフロン前駆細胞の培養において Yap が核内に維持される条件を検索する。その培養条件を基に増幅した細胞が尿管

や糸球体の細胞譜系へ分化する能力及び形態形成能を実際に保持しているかどうかの機能評価を下記のコロニーアッセイ法及び期間培養法で行う。

A. コロニーアッセイ法 - Wnt4 を発現するフィーダー細胞上で多能性を持った1個の細胞が糸球体、近位尿管、遠位尿管という多系統を含むコロニーを形成する。

B. 器官培養法 - 後腎間葉を Wnt や Fgf といった腎発生に必要な因子を分泌する胚性の脊髄と共培養することにより尿管芽なしに尿管や糸球体の形態形成を誘導することができる。

マウスネフロン前駆細胞培養法の確立
ネフロン前駆細胞に発現する Six2 のプロモーター制御下に GFP を発現するトランスジェニックマウス由来の後腎間葉を用いて、培養期間中のネフロン前駆細胞と間質の細胞数の変動を FACS により定量的に把握する。この方法をマウスのネフロン前駆細胞の培養条件の検索及び維持培養法の確立に用いる。Six2 陽性のネフロン前駆細胞において GFP が光るトランスジェニックマウスは研究協力者である西中村隆一教授の協力支援によって行う。さらに上記のネフロン前駆細胞の分化能を評価する Wnt4 フィーダー細胞によるコロニーアッセイ法も西中村教授の確立した技術である。これらの技術を駆使して、ネフロン前駆細胞培養法の改善、及び品質の改善を行う。

4. 研究成果

3 次元器官形成能を持つラットネフロン前駆細胞の増幅培養法の確立

Yap がネフロン前駆細胞の分化を制御するという *in vivo* の知見をラットネフロン前駆細胞の培養条件の改善に適用した。その結果、LIF

と ROCK 阻害剤である Y27632 の組み合わせが Yap の核内移行を促進することでネフロン前駆細胞を未分化の状態を維持して長期間増幅することを発見し、増幅した細胞を用いて 3 次元の尿細管と糸球体を作ること成功した(Tanigawa *et al.*, *Stem Cell Reports* 2015)

3 次元器官形成能を持つマウスネフロン前駆細胞の増幅培養法の確立

これまでマウスのネフロン前駆細胞の培養は極めて困難であった。先行の報告では培養後のマウス及びヒト ES 由来のネフロン前駆細胞に糸球体の形成能は認められず、ネフロン前駆細胞数の定量的解析が不十分であるため他系統の細胞の混入の可能性を排除できなかった(Brown *et al.*, *Dev Cell* 2015)。

申請者はラットから得られた LIF と Y27632 の培養条件に細胞外因子 Wnt, Fgf 及び Bmp を多様な濃度で組み合わせることで、FACS により単離した Six2 陽性のマウスネフロン前駆細胞 (Six2-GFP 細胞) を 90% 以上の純度を維持した状態で 19 日間で約 1500 倍に増幅することに成功した。さらに、増幅した Six2 陽性の細胞が糸球体と尿細管の 3 次元構造を形成し、この培養法によって分化能を長期間維持できることが明らかとなった。これは生体におけるネフロン前駆細胞の生存期間を 2 倍に延長し、細胞数を 100 倍に増幅したことになる。さらに、この培養法によってマウス ES 細胞由来のネフロン前駆細胞を 7 日間で 14 倍に増幅し、ヒト iPS 細胞由来のネフロン前駆細胞では 8 日間で 4 倍に増幅した。この方法で増幅した多能性幹細胞由来のネフロン前駆細胞は糸球体と尿細管を形成する能力を一部維持していることを確認した。

この培養法はこれまで不可能であったマウスのネフロン前駆細胞を分化能を維持した状態で長期間増幅するものであり、腎臓発生

のメカニズムを解く有用なシステムとなり得る (Tanigawa *et al.*, *Cell Reports* 2016)。

今後はヒト iPS 由来のネフロン前駆細胞の培養法として凍結保存や移植にも応用できるよう改良し、腎臓再生医療の基盤構築を目指す。

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)

Tanigawa S and Nishinakamura R.
Expanding nephron progenitors in vitro: a step toward regenerative medicine in nephrology. *Kidney Int.* 90:925-927 (2016)
(Invited review) 査読無

DOI: 10.1016/j.kint.2016.08.014.

Tanigawa S, Taguchi A, Sharma N, Perantoni AO and Nishinakamura R.
Selective In Vitro Propagation of Nephron Progenitors Derived from Embryos and Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* 15:801-813 (2016) 査読有

DOI: 10.1016/j.celrep.2016.03.076.

Tanigawa S and Perantoni AO. Modeling renal progenitors - defining the niche. *Differentiation*, 91:152-158 (2016) 査読無

DOI: 10.1016/j.diff.2016.01.007.

Tanigawa S, Sharma N, Hall MD, Nishinakamura R and Perantoni AO.
Preferential Propagation of Competent SIX2+ Nephronic Progenitors by LIF/ROCKi Treatment of the Metanephric Mesenchyme. *Stem Cell Reports*, 5:435-437 (2015) 査読有

DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.07.015.

[学会発表] (計 5 件)

谷川俊祐, Sharma N, Yamaguchi T, 西中村隆一, Perantoni A 腎臓ネフロン前駆細胞の初代増幅培養法の確立及び未分化維持機構の解析 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 26 日、横浜 (ポスター発表)

Tanigawa S, Sharma N, Michael H.D, Nishinakamura R and Perantoni A.O.
Perpetuation of metanephric mesenchymal progenitors through LIF-induced Stat activation and stabilization of nuclear Six2 and Yap. 13th International Workshop on Developmental Nephrology (IWDN) July 14,

西中村 隆一 (NISHINAKAMURA, Ryuichi)

2015, Salt Lake City, Utah, USA. (poster)
谷川俊祐、Sharma N, Yamaguchi T, 西中村隆一、Perantoni A 3次元器官形成能を持つ腎臓ネフロン前駆細胞の増幅培養法 第38回日本分子生物学会年会 2015年12月4日、横浜 (口頭発表、ポスター発表)
Tanigawa S, Taguchi A, Sharma S, Perantoni AO and Nishinakamura R. *In vitro* propagation of multipotent nephron progenitors from mouse embryo and embryonic stem cells. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2016. June 24, 2016. San Francisco, USA. (poster)

谷川俊祐、太口敦博、Sharma S, Perantoni AO、西中村隆一 3次元組織形成能を持つ腎臓ネフロン前駆細胞の増幅培養法の確立 日本分子生物学会 2016年11月30日 横浜 (ポスター発表)

〔図書〕(計1件)

谷川俊祐、西中村隆一.ネフロン前駆細胞の試験管内誘導と増幅培養法の開発、医学のあゆみ 257(11):1127-1132, 2016.査読無

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称：ネフロン形成能を有するネフロン前駆細胞の増幅培養方法
発明者：西中村隆一、谷川俊祐
権利者：西中村隆一、谷川俊祐
種類：特許
番号：特願 2015-139271
出願年月日：2015年07月11日
国内外の別：国内

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei/20160415>

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/np86/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷川 俊祐 (TANIGAWA, Shunsuke)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：10726318

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者