

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790861

研究課題名(和文)自殺誘導マウスを用いたエリスロポエチン産生組織誘導法の開発

研究課題名(英文) Xenotransplanted embryonic kidney provides a niche for endogenous stem cell differentiation into erythropoietin-producing tissue.

研究代表者

松本 啓 (Matsumoto, Kei)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：30439799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：発達過程にある胎仔の後腎を移植するラット・マウス小動物モデルを用いて、異種動物間移植を行った後腎でもエリスロポエチン(EPO)産生能を維持しており、そのEPO産生細胞の起源はレシピエント動物種が起源である事を示した。血管内皮にEGFPを発現するマウスを作成し、その骨髄を移植したマウスをレシピエントとして正常マウスの後腎を移植、発達継続させてEPO産生細胞が骨髄を起源としている事を示した。自殺誘導遺伝子搭載マウスの後腎を足場として用いることにより、EPO産生細胞が発達継続する過程において不必要となる異種部分を排除し、目的とする動物種のEPO産生組織を発生させる事が可能であることを報告した。

研究成果の概要(英文)：We established xenotransplantation models that control endogenous mesenchymal stem cell differentiation into mature erythropoietin (EPO)-producing tissue in a niche provided by a developing xenometanephros. Transplantation of rat metanephroi into mouse omentum, and similarly pig metanephroi into cat omentum, led to the recruitment of host cells and EPO production. EPO-expressing cells were not differentiated from integrating vessels because they did not co-express endothelial markers. Instead, EPO-expressing cells were shown to be derived from circulating host cells, as shown by EGFP expression in the grown transplants of chimeric mice bearing bone marrow from a transgenic(tg) mouse expressing EGFP under the control of the EPO promoter. These results suggest that bone marrow cells recruitment and differentiation in a xenotransplanted developing organ. Using metanephroi from tg suicide-inducible mice, the xeno-tissue component could be eliminated, leaving autologous EPO-producing tissue.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎性貧血 慢性腎不全 エリスロポエチン 再生医療 腎臓再生

1. 研究開始当初の背景

現在のヒト臨床において腎性貧血に対する治療ではエリスロポエチン (EPO) 製剤を定期的に投与する必要があるが、EPO 製剤はとても高価な薬剤であり、たとえば維持透析患者に投与する EPO 製剤の投与コストは患者 1 人当たり一年間で最大 80 万円近くにもなるため、EPO 産生組織を再生することが可能となれば、これらの医療コストを大幅に削減することも実現可能と考えられる。また、近年、発生段階の腎臓である後腎 (こうじん) を異種宿主動物内に移植することにより、機能的腎臓の発生継続が可能であるという報告がなされており、深刻な臓器不足に陥っている腎臓移植医療に対する打開策として、無限の臓器供給源として注目されており、動物実験において後腎移植を行う事によって、ホストの腎機能や生命予後を改善させるという報告も散見される。

2. 研究の目的

我々は動物実験において胎仔内で腎の発生段階にある後腎を成獣宿主大網部に移植し、発生させた新規発生移植腎臓がホストの状態に応じてレニン及び EPO の調節能を持つ事を報告した (K Matsumoto et.al, J Nephrol 2011)。このように、後腎移植により発生させた腎臓は内分泌臓器としての役割を果たす可能性が明らかとなった。一般的に腎臓の機能としては尿産生や排泄、ビタミン D 活性化、EPO 産生、レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系による血圧調節など種々の働きがあるが、我々はその中でも EPO 産生能に着目し、EPO 産生組織を新規発生させることを目的として本研究を開始した。将来的にはヒト臨床応用可能な自己細胞由来 EPO 産生組織の再生を目指しているが、本申請研究ではその基盤研究として、マウスおよびラットを用いた小動物の EPO 産生組織を新規発生させる事を目的とした。

3. 研究の方法

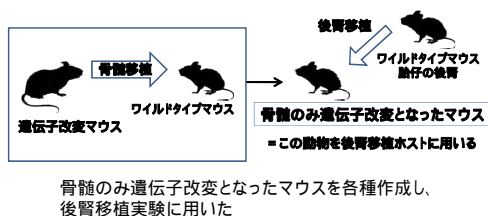
本研究の基本ストラテジーはキメラ腎臓の異種部分を排除し、自家細胞由来の腎組織を再生するというものである。我々はヒト間葉系幹細胞 (MSCs) から腎臓を再生させることに挑戦しているが、現在までのところ、異種後腎を用いることにより、ヒトと宿主動物両方の細胞からなるキメラ腎臓の作成に成功しており (T.Yokoo et.al, Proc Natl Acad USA 2005, JASN 2006 and Transplantation 2008)、その新規腎臓が尿およびエリスロポエチンを産生する事まで確認している。腎臓の再生医療研究の多くは発生メカニズムを一つひとつ解明していく手法が主であるが、我々の「異種胎仔の後腎を足場にして間葉系幹細胞を分化させる」手法 (= 胎生臓器ニッチ法) は他の研究グループにはない独創性に富み、実際にヒトとラットのキメラ状態ではあるものの、ヒト細胞由来の腎臓の新規発生に成功している。

次のステップとして、予期せぬ免疫反応を惹起せぬよう、この異種部分を排除することが望まれる。そこで我々は画期的なシステムとして、E2F1 転写因子に着目した。E2F1 とは細胞分裂を調節する転写因子であり、その異所性発現は分裂細胞においてアポトーシスを誘導する事が知られている。そして、この E2F1 の上流に ER (エストロゲンレセプター) 遺伝子を接続した融合蛋白 ER-E2F1 をユビキタスに発現するマウスを作成することにより、エストロゲン拮抗薬であるタモキシフェンを投与することにより、アポトーシスを誘導することが可能となる。この ER-E2F1 トランスジェニックマウスを用いることによって、目的とする細胞のみを発達継続させることが理論上可能となり、臨床応用へ一歩近づく事が可能となる。本研究では、EPO 産生組織を発生させる Scaffold (骨組み) として、この ER-E2F1 遺伝子改変マウスの後腎を用いる事とした。

(1) EPO 産生細胞の起源の同定

異種後腎移植を行った場合、後腎移植を受けた宿主動物 (= レシピエント) 由来の細胞から EPO が発現する事を種特異的プライマーを用いた PCR を行う事により確認した。この場合、EPO 産生細胞は 骨髄から後腎内に流入する、もしくは 後腎内の血管内皮より分化すると想定される。その上で EPO 産生細胞の起源は骨髄細胞由来なのか血管内皮細胞由来なのか、ホストの何処から由来するのかを同定すべく、以下の骨髄移植実験を行った。

まず EPO プロモーターにより EPO 存在下で GFP を発現する EPO-GFP マウス、Tie2-Cre マウスと LoxP-EGFP マウスを掛け合わせた Tie2-EGFP マウスや VEcad-Cre マウスと LoxP-EGFP マウスを掛け合わせた VEcad-EGFP マウスなど、2 種類の血管内皮マーカーに EGFP を発現するマウスを作成し、それらマウスの骨髄を Wild B6 マウスに骨髄移植した (図 1)。



(図 1) 骨髄移植ホストに対する後腎移植

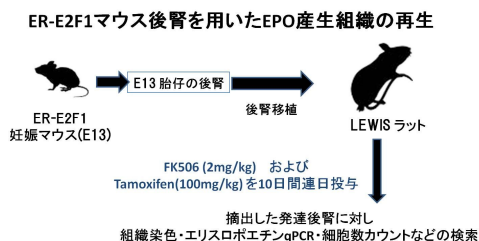
この “骨髄のみトランスジェニック” の移植後マウスを宿主動物とし、Wild B6 マウスの胎仔後腎を宿主動物大網部に移植、発達継続させて収穫し、各種プライマーや組織学的検討にて EPO 産生細胞ホストの骨髄由来か否か、血管内皮細胞由来か否かを確認した。

(2) ER-E2F1 自殺誘導遺伝子搭載 Tg マウスを用いて EPO 産生組織を再生する

前述のように異種動物間で後腎移植を行

った場合、EPO は移植した後腎ではなく、移植された宿主動物種の EPO が発現する事は確認済みであるため、この特徴を考慮し、ER-E2F1 Tg マウスを用いて、実際に in vivo 実験モデルでの EPO 産生組織の再生を試みた。

具体的には、ER-E2F1 Tg マウス胎仔の後腎を単離し、成獣ラットに移植する(この場合、EPO 産生細胞は宿主動物から由来することが確認できているため幹細胞を新たに打ち込む必要はない)。LEW ラットに移植した後、免疫抑制剤として tacrolimus (2mg/kg/Day) を、また ER-E2F1 遺伝子の作動目的に tamoxifen (100mg/kg/Day) を投与し、10 日間後腎を発達継続させ、最終的に摘出した後腎に対して種特異的 EPO プライマーを用いた qPCR による EPO 発現量の検討、各種組織染色、細胞数カウントなどを行い、EPO 発現や自殺誘導システムの効率を検討した(図 2)。



(図 2) ER-E2F1 マウス後腎を用いた EPO 産生組織の再生プロトコール

(3) 再生 EPO 産生組織の内分泌機能の確認

最後に、こうして発生した EPO 産生組織が生理的分泌調整能を有しているかどうかを検討するために、EPO 産生組織を再生させた後、宿主動物の両腎を摘出し、瀉血誘導による貧血を惹起し、EPO 産生組織の生理的 EPO 分泌能を血清 EPO 濃度および摘出した組織内の EPO qPCR にて評価した。

4. 研究成果

(1) EPO 産生細胞の起源

まず最初に EPO 存在下で緑色蛍光蛋白質 (GFP: Green Fluorescent Protein) が発現する EPO-GFP マウスを用いて骨髄移植実験を

行った。マウス後腎を別の成獣ホストマウスの大網部に移植する上で、あらかじめこのホストマウスに EPO-GFP マウスの骨髄を移植しておくのである(図 1)。つまりこの実験系では遺伝子改変しているのはホストマウスの骨髄のみとなる。その結果、移植したワイルドタイプマウスの後腎を発生継続させると、EPO 存在部に GFP が発現した。これは EPO 産生細胞がホストの骨髄由来であるという事を示唆する。続いて、血管内皮細胞に特異的に GFP を発現する前述の Tie2-EGFP マウス、VEcad-EGFP マウスなどのトランスジェニックマウスを作成し、これらマウスの骨髄を移植したマウスをホスト動物として、上記実験と同様にワイルドタイプマウスの胎仔後腎をホスト動物大網部に移植した。この後腎を発育させ、組織学的に検索したところ、EPO 染色部位は GFP 発現部位と一致する事はなかった。つまりこれらの結果により、EPO 産生細胞はホストの血管内皮細胞由来ではなく、ホストの骨髄由来であるという事の証明となった。

EPO 産生細胞がホストの骨髄細胞由来である事は確認できたが、次にその細胞が何であるかを検索するために、次の実験を行った。マウス胎仔後腎をラットに移植し、マウス後腎が発達継続している段階で、ヒト由来の間葉系幹細胞 (MSC: mesenchymal stem cell) と血管内皮前駆細胞 (EPC: endothelial progenitor cell) を尾静脈から静脈注射し、発達継続したマウス後腎を摘出後、ヒト EPO プライマーを用いて検索したところ、MSC を静脈注射した場合のみヒト EPO がマウス後腎に発現する事が確認された。

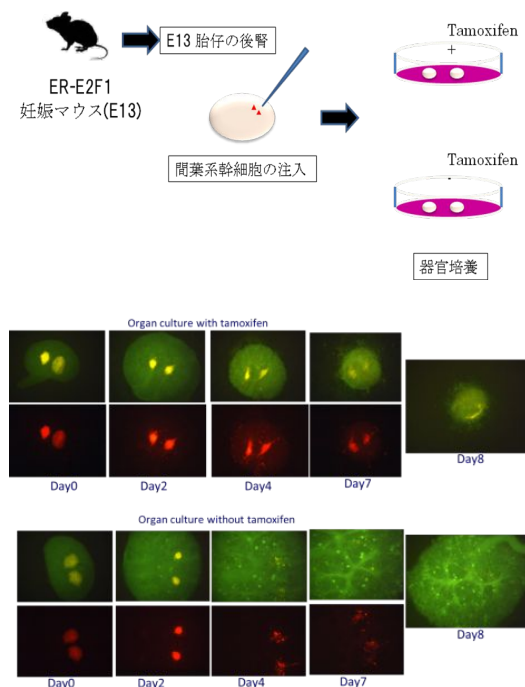
これらの結果をまとめると、EPO 産生細胞はホストの骨髄由来であり、さらにその細胞は骨髄中の MSC 由来である事が証明された。これらの事象は、発生初期の異種後腎組織を移植する事により、骨髄より MSC が動員され、移植した後腎の内部で腎臓発生プログラム

に則り EPO 産生細胞に分化する事を示している。

(2) ER-E2F1 自殺誘導遺伝子搭載 Tg マウスを用いて EPO 産生組織を再生する

ER-E2F1 マウスの後腎 (E2F1 群) および C57BL/6 マウスの後腎 (対照群) を実体顕微鏡下に摘出し、間葉系幹細胞と共に臓器培養を行った。この際、タモキシフェンあり/なし両群に分けて 10 日間培養し、蛍光顕微鏡下において連日観察を行った。

この結果、E2F1 群において、タモキシフェンを投与することにより間葉系幹細胞は残存したままマウス部分を除外することに成功した(図 3)。



(図 3) ER-E2F1 を用いた in vitro 実験のシエーマ。タモキシフェン添加群 (上段) コントロール群 (下段)

発達継続した後腎はそれぞれ E2F1 群で 32% であったのに対して、対照群では 56% であった ($p=0.045$)。最終臓器重量は E2F1 群で $2.4 \pm 0.784\text{mg}$ であったのに対して対 $8.7 \pm 1.34\text{mg}$ であり、E2F1 群で有意に臓器重量が少なかった ($p=0.0005$; Fig.2)。つまり、

この実験により、ER-E2F1 Tg マウスを用いることにより、目的とした細胞群を残存させたまま、異種部分を排除することが可能と考えられた。

最終的にこの ER-E2F1 マウスの後腎を足場として、EPO 産生組織が発達継続中に不必要となる異種部分(この場合 ER-E2F1 マウスの後腎)を排除し、目的とする動物種のみ EPO 産生組織を新たに生体内で再生させる事が可能であった。さらに EPO 産生組織樹立後に免疫抑制剤を中止しても EPO 産生は継続されるという非常に安全性の高いシステムを構築する事が示された。

(引用文献)

1) Matsumoto K, et al : Functional development of a transplanted embryonic kidney: effect of transplantation site. J Nephrol, Jan-Feb 25(1),50-55,2012 .

2) Yokoo T, et al : Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. Proc Natl Acad Sci USA, 102,3296-3300,2005.

3) Yokoo T, et al : Xenobiotic kidney organogenesis from human mesenchymal stem cells using a growing rodent embryo. J Am Soc Nephrol, 17,1026-1034,2006.

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) Matsumoto K, Yokoo T, Matsunari H, et al. Xenotransplanted embryonic kidney provides a niche for endogenous mesenchymal stem cell differentiation into erythropoietin-producing tissue.: Stem Cells. 2012 Jun;30(6):1228-1235. doi: 10.1002/stem.1101.

(2)安全・安価・高効率の腎性貧血新規治療法の開発：松本 啓 東京都医師会雑誌 第 67 巻 第 6 号 p548-551 2014 年 7 月号.

[学会発表](計 2 件)

(1) Yokoo T, Matsumoto K, Yokote S et al. Kidney regeneration using the embryonic niche for nephrogenesis. Asia-Pacific Kidney Development Workshop. September, 2012 Adelaide.

(2)胎生臓器ニッチ法による生体幹細胞誘導型臓器再生技術の開発 横尾 隆、横手伸也、松本 啓、他 第 11 回日本再生医療学会総会 2012 年 6 月 横浜

[図書](計 1 件)

(1) 松本 啓、横尾 隆
成体幹細胞由来 EPO 産生細胞による貧血再生療法の開発。全人力・科学力・透析力 透析医学 : 第 6 章腎性貧血 腎性貧血治療の進歩 2014 年 6 月 374-377 医薬ジャーナル社

[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
東京慈恵会医科大学 腎臓・高血圧内科
<http://www.jikei-kidneyht.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 啓 (MATSUMOTO, Kei)
東京慈恵会医科大学・腎臓高血圧内科・助教
研究者番号 : 30439799

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし