

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15332

研究課題名（和文）腎臓血管の起源と発生の理解に基づく再構築法の開発

研究課題名（英文）Reconstitution of renal vasculature based on its development

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：我々は幹細胞から腎臓組織を誘導することに成功したが、腎臓が機能するには血管と接続することが必須である。そこで本計画では、マウス腎臓血管系の起源と発生様式を理解し、それを再構築することを目的とした。まず腎動静脈及び腎臓内血管の形成過程を発生段階を追って明らかにした。また大動脈血管内皮に比べて腎臓血管内皮で増加あるいは減少する遺伝子群を同定した。さらに胎生期腎臓の移植によって、ドナー由来の血管がある程度発生することを見出した。

研究成果の概要（英文）：While we previously succeeded in inducing kidney tissues from stem cells, integration of vasculature is necessary for the renal functions. The purpose of this project is to understand the origin and developmental processes of renal vasculature and apply the knowledge to the vascular reconstitution. We first described the development of extra- and intra-renal arteries/veins. We then identified the molecular profiles of renal vasculature. We also transplanted the embryonic mouse kidneys to the host animals to analyze the development of the vasculature.

研究分野：腎臓発生

キーワード：腎臓発生 血管発生 血管内皮

1. 研究開始当初の背景

腎機能を完全に回復させる内科的治療は存在せず、腎移植が唯一の根治療法であるが、ドナーは決定的に不足している。我々はマウス腎臓の発生機構を解明し、その知見をもとに、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞から糸球体と尿細管という腎臓の 3 次元構造を試験管内で誘導することに成功した (Taguchi et al. Cell Stem Cell, 2014)。誘導したポドサイトは胎児のそれと同様に血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を発現しており、移植によってホストの毛細血管を糸球体内に引き寄せることができた。しかし血流量が少なく尿を作るには至らなかった。やはり最初から血管を腎臓に組み込んでおく必要があるが、血管をどのタイミングでどう組み込むのかは謎であり、うまく組み込んだとしてもそれを培養あるいは移植できなければ正しく発生するか検証することは不可能である。現時点での胎児期腎臓の器官培養法や移植法では、ネフロンは発生するものの血管は退縮する。そもそも糸球体血管や傍尿細管血管がどこから来てどう腎臓に組み込まれるのかといった正常発生過程の解明も不十分である。我々のネフロン誘導成功はその起源と発生を解明したことによるので、血管でもその起源と発生を理解することが重要であると考えに至った。

2. 研究の目的

腎臓が機能するには血管と接続することが必須である。本計画では、マウス腎臓血管系の起源と発生様式を理解し、腎臓血管が正常に発生する器官培養法と移植法を開発することによって、腎臓血管系を再構築することを目的とした。まず各種細胞系譜がラベルできるマウスを使って腎臓血管の起源を同定する。次に血管内皮で発現する VEGF 受容体プロモーターによって緑色蛍光蛋白 (GFP) が駆動されるマウスの胎児腎臓を経時的に観察し、腎臓血管の正常発生を把握する。ついで同マウスから単離した胎児腎臓を器官培養あるいは移植して、血管が正常に発生する条件を確立する。条件が確立したら、マウス胎児腎臓と、FACS で集めた VEGF 受容体-GFP 陽性の血管内皮と再凝集させ、血管が正常に発生する方法を開発する。これが完成すれば ES/iPS 細胞から誘導した血管内皮の質を測る機能的なアッセイ系として利用できると考えた。

3. 研究の方法

1) 腎臓血管系の起源同定

ES 細胞から腎臓血管内皮を誘導するためには、胎児中の腎臓血管内皮の起源を同定してそこから誘導できる必要がある。我々のネフロン誘導成功はその起源を正しく同定したことによるので、血管でも起源を突き止めることが重要である。複数の CreER マウスとインディケーターマウスとの交配を用いた遺伝学的細胞系譜追跡によって検討する。

2) 腎臓血管の可視化による正常発生の理解

血管がどの時期に腎臓に入ってどうつながるのかを、VEGF 受容体-GFP マウスで血管内皮を可視化して追跡する。腎臓への血管侵入ルートを 3 次元的に確定し、糸球体血管や傍尿細管血管の形成過程を明らかにする。また循環系と腎臓をつなぐ腎動脈と腎静脈が腎臓内血管といつ連結してどう形成されるかも同定する。試料は透明化し立体構造を把握する。

3) 腎臓血管系の遺伝子発現

解剖学的な位置関係だけでなく、遺伝子発現も GFP 陽性細胞を FACS してマイクロアレイで解析する。血管の遺伝子発現は臓器が異なれば必ずしも同じではないことが解明されつつあるので、腎臓特異的、時期特異的な血管マーカーを単離する。

4) 腎臓血管が正常に発生する器官培養法及び移植法の開発

現時点での器官培養法ではネフロンは発生するが、血管は退縮してしまう。そこで VEGF 受容体-GFP マウスの胎生期腎臓を単離し、VEGF 投与、低酸素濃度、低酸素状態を模倣する薬剤などを検討して、生体の血管発生を再現できる器官培養系を立ち上げる。並行して、免疫不全マウスの腎臓被膜下や大網などに移植して、血管発生を検討する。加えてトリ卵の漿尿膜への移植も試みる。これは腎臓血管の発生を観察する古典的方法であるが、簡易に移植でき、かつ多くの条件を一度に試せるので有効と考える。

5) 腎臓組織と人為的に組み合わせた血管内皮の再構成

VEGF 受容体-GFP マウスの腎臓内血管内皮を FACS で単離し、正常マウスの胎児期腎臓と再凝集させたのち、上記で確立した器官培

養及び移植によって、正常な血管発生を再現する。

4. 研究成果

1) 腎臓血管系の起源同定

複数の CreER マウスを使って腎臓血管の起源を解析したところ、腎臓血管と大動脈の違いはある程度存在することが明らかになった。しかしその差ははっきりしたものではなく、腎臓血管特異的な前駆細胞集団の同定には至らなかった。

2) 腎臓血管の可視化による正常発生の理解

正常マウスの Whole mount 免疫染色や VEGF 受容体-GFP マウスを使って、腎動静脈及び腎臓内血管の形成過程を発生段階を追って解析したが、可視化に時間を要した。染色法の改善に加え、いくつかの共焦点顕微鏡を試したが、明瞭な血管像が得られなかった。試料の厚みによることが考えられたため、2光子顕微鏡顕微鏡の使用を開始した。本学には一台だけ存在するが、古い型で操作が複雑な上、本計画に必要な対物レンズが装備されていなかった。これを別予算で購入するとともに、試料の透明化の方法も複数検討した。その結果、ようやく明瞭な血管走行が検出できるようになり、マウス腎臓に主要な血管が侵入する時期が同定された。また動脈と静脈の形成パターンの違いも明らかになった。これら正常の発生過程の情報は、ES/iPS 細胞から血管内皮を誘導する際の positive control として有用である。

3) 腎臓血管系の遺伝子発現

VEGF 受容体-GFP マウスの血管内皮を FACS してマイクロアレイで解析したところ、大動脈血管内皮に比べて腎臓血管内皮で増加あるいは減少する遺伝子群を同定した。そのいくつかは in situ hybridization で発現部位を同定した。しかし腎臓特異的な血管マーカーは見い出せず、むしろ血管の類似性を印象づける結果となった。

4) 腎臓血管が正常に発生する器官培養法及び移植法の開発

VEGF 受容体-GFP マウスの胎生期腎臓を単離し、様々な条件を検討したが、生体の血管発生を再現できる器官培養系はまだ達成できていない。トリ卵の漿尿膜への移植も試みたが、糸球体への血管進入が認められなかった。既報論文では進入が報告されているため、

我々の技術的不足の可能性もあるが、トリ卵の漿尿膜への移植自体が長期的観察に適さないことも判明したため、マウスへの移植に切り換えた。この方法ではドナー由来の血管がある程度発生することを確認した。しかしその血管走行は明らかに生体のものとは異なるため、ES/iPS 細胞から誘導した血管内皮の質を測る機能的なアッセイ系としては不十分である。

一方で、別計画で進行していたヒト iPS 細胞由来の腎臓組織を、免疫不全マウスの腎臓皮下に移植することになった。移植後 20 日には、ヒト由来の糸球体にマウス由来の血管内皮が進入した。これは糸球体に向けて直接毛細血管が伸びていくもので、生体のように腎動脈を経た豊富な血流量を得られるものではなかったが、ヒト iPS 細胞由来の腎臓組織に初めて生体の血管を接続した報告となった (Sharmin et al. *J Am Soc Nephrol* 2016)。興味深いことに、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) をネフロン前駆細胞とともに移植しても、ヒト糸球体に侵入するのは必ず宿主由来のマウス血管内皮であった。移植した HUVEC の分化能が不十分、あるいは血管の伸張には血流が必要、という2つの可能性が考えられた。前者に関しては臓器による血管内皮の違いという問題に帰結するので、その解明が必要である。後者にはデバイス等による血流供給が有効である可能性がある。

5) 腎臓組織と人為的に組み合わせた血管内皮の再構成

上記計画の進行が遅れたため、胎児期腎臓と血管内皮との再凝集は今後の検討課題となった。腎動脈から髄質をへて糸球体に至る複雑な血管走行を再現することはまだできていない。移植によってネフロンの発生が正常とは異なってしまい、それに血管走行が影響されている可能性もある。血管走行を制御する分子機構を一つ一つ解明していくことが却って近道かもしれない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Sharmin S, Taguchi A, Kaku Y, Yoshimura Y, Ohmori T, Sakuma T, Mukoyama M, Yamamoto T, Kurihara H and Nishinakamura R. Human induced pluripotent stem cell-derived podocytes mature into vascularized glomeruli upon experimental transplantation. *J Am Soc Nephrol*

27: 1778-1791, 2016.

doi: 10.1681/ASN.2015010096.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学発生医学研究所腎臓発生分野

[http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/ki
dney_development/](http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/kidney_development/)

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