

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09678

研究課題名(和文)腎前駆細胞の選択的抽出により機能的な構造を有する腎を再生するための基礎研究

研究課題名(英文)Basic research for regenerating kidney with functional structure by selective extraction of renal progenitor cells

研究代表者

中根 明宏(Nakane, Akihiro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授

研究者番号：70464568

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文): Pax2遺伝子導入ES細胞をアクチビンAとレチノイン酸添加の条件で分化させ、各種遺伝子発現をPCR法により評価し、BMP7、Ret、Pax8、aquaporin-1、Podocinの発現亢進を認めた。免疫染色においてもaquaporin-1の発現を確認できた。Pax2遺伝子を発現させたEBsをPax2とaquaporin-1で二重標識し、セルソーティングを行ったところ、両者の陽性細胞の増加を確認することができた。以上から、Pax2遺伝子を強制発現させることで、一部の腎構成細胞あるいは前駆細胞の構成比率が増加し、ES細胞から腎細胞への分化が誘導されたと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末期腎不全から血液透析を行う患者数は増加し、年間約1兆円以上の医療費や根本的治療の腎移植のドナー不足が問題視されている。解決策として臨床応用され始めている再生医療の開発が望まれている。発生や構造が複雑な腎臓では再生医療の研究が他の臓器に比べ遅れていたが、近年では腎構成細胞の再生が報告され始めている。そこで腎構成細胞の幹細胞をセルソーティングの技術を用い再生することはこの分野の研究の一つの方向性となると考えられた。目的となる幹細胞の選定にはさらなる研究を継続が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文): Pax2 transgenic ES cells were differentiated under the condition of addition of activin A and retinoic acid. Expression of various genes was evaluated by PCR method, and expression of BMP 7, Ret, Pax 8, aquaporin-1, and Podocin was enhanced. Expression of aquaporin-1 was also confirmed in immunostaining. EBs expressing the Pax2 gene was double-labeled with Pax2 and aquaporin-1 and cell sorting was carried out. It was possible to confirm increase of positive cells of Pax2 and aquaporin-1. From the results of this study, It was considered that the constitution ratio of some renal constituent cells or progenitor cells increased, and differentiation from ES cells to renal cells was induced by expressing the Pax2 gene.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：再生医療 腎 ES細胞

## 1. 研究開始当初の背景

末期腎不全から血液透析を行う患者数は増加し、年間約1兆円以上の医療費や根本的治療の腎移植のドナー不足が問題視されている。解決策として臨床応用され始めている再生医療の開発が注目されているが、発生や構造が複雑な腎臓では再生医療の研究が他の臓器に比べ遅れている。一方で私たちは、様々な腎尿路疾患、生殖器疾患で失われたり、先天的に傷害された臓器の治療法を確立するために、組織再建、細胞培養の技術を用いた研究を行ってきた。その中で、特にすべての胚葉に分化可能な胚性幹細胞(ES細胞)の研究を行い、腎臓を再生することを試みた。腎・尿管発生に重要な働きをしている遺伝子である Pax2 に着目し、この遺伝子の発現調整することが可能な ES 細胞を作製し、腎構成細胞へ分化させる研究を継続的に行ってきた。現在まで、Pax2 遺伝子導入 ES 細胞から尿細管に発現する AQP1 蛋白陽性の細胞が分化できることを報告した。以上から、これまでの研究成果を進展させた本研究による研究成果が新たな腎臓の再生医療発展の糸口になると考えた。しかし、これらの分化させた細胞を選択的に採取することや、腎に移植して腎機能を改善させる為に必要な細胞を集める方法については有用な報告は未だなかった。ES 細胞を用い、組織本研究において、これらの成果を進展させて、ES 細胞を腎構成細胞に分化させ、それらの細胞をセルソーティングシステムである Fluorescence Activated Cell Sorting(FACS)でより選択的に回収培養し、必要な細胞のみ生体に移植を行う新しい腎臓の再生医療の技術の確立を試みる事ができるのではと考えた。

## 2. 研究の目的

近年、本研究室以外からも ES 細胞、iPS 細胞から腎構成細胞への分化が報告されたが、尿路全体をユニットとして再生するまでには至っていないので、必要な幹細胞を複数作成し集めることを目的とした本研究は一つの解決になると考えた。本研究において、腎・尿管発生に重要な働きをしている遺伝子である Pax2 に着目し、この遺伝子導入した ES 細胞を作製し、そこから腎構成細胞を分化させることを考えた。本研究では、発生の初期に重要な遺伝子を導入し、その発現を調整することで ES 細胞を未分化のまま維持し培養することと、必要に応じて実験系で分化させることが出来る細胞を用いることが可能なメリットがあると考えた。そこで、まず確立された Pax2 遺伝子導入 ES 細胞を *in vitro* で培養、ある程度分化させた状態で、FACS を行うことで未分化な ES 細胞を除去するとともに分化した目的の細胞を選択的に回収することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) Pax2 ES 細胞の培養

マウスより確立された ES 細胞の一つである MG1.19 から得た細胞系を用いた。培養条件は 5% CO<sub>2</sub>、37°C で、培養液は DMEM もしくは Glasgow MEM に 10% FCS、10<sup>-4</sup>M 2-メルカプトエタノール、non-essential aminoacid、1mM sodium pyruvate、1000U/ml LIF(leukemia inhibitory factor; ESGRO<sup>R</sup>)を加えたものを使用した。培養した ES 細胞を 0.25%トリプシン EDTA 溶液にて回収し、1 x 10<sup>7</sup> 個の細胞に対し 20μg の Pax2 遺伝子を組み込んであるプラスミド DNA を用意し、electroporation 用キュベット(BIO-RAD Gene Pulser cuvette<sup>R</sup>)内に混ぜ入れて、960μF、250mV の条件で electroporation 法を行い、遺伝子を導入した。48 時間、前述の培養条件にて培養後、Neomycin、Puromycin などの耐性遺伝子に対応した薬剤を含む培養液に替えると遺伝子導入された(同時に耐性遺伝子を発現している)ES 細胞のみが生存し選択された。

### 2) Pax2 ES 細胞の分化

作製した Pax2 遺伝子導入 ES 細胞を LIF を除いた培養液中で hanging drop 法を用い embryoid body(胚様体:EB)を形成させ、分化させた。5 日後に EB を再度ディッシュに附着させ、分化を進めて、時間の経過とともに細胞を回収し、発現してくる遺伝子に変化がないかどうかを RT-PCR 法を用い確認した。EB 自体(0 日目)、5 日目、10 日目の複数の時期で細胞塊を回収した。

### 3) RT-PCR による発現遺伝子の確認

ディッシュに平面培養した ES 細胞および EB を 0.25%トリプシン EDTA 溶液にて回収し、TRISol<sup>R</sup>、クロロホルムにて mRNA を抽出、2-プロパノール、エタノールにて沈殿させ回収する。回収した Pax2 ES 細胞および EB にまずは Pax2 遺伝子が発現しているかどうかを RT-PCR 法を用い確認する。Oligo dT primer、SuperScript III<sup>R</sup> キット、dNTP mix にて逆転写反応を行う。得た cDNA を鋳型にして導入遺伝子のセンスおよびアンチセンスプライマーで PCR 反応を行い、増幅 DNA バンドの有無などで判断する。同様に他の腎発生の各段階で発現してくる遺伝子に変化がないかどうかを SYBR green による定量 PCR 法を用い確認した。

#### 4) 腎構成細胞の抽出

Pax2 抗原で Pax2 陽性細胞を標識し、また近位尿細管マーカーである aquaporin-1 の抗原を標識した、二重標識により FACS を行った。

#### 4 . 研究成果

近年急激に様々な医療技術の進歩が報告されているが、末期慢性腎不全に対する治療としては、ドナー不足である腎移植治療の現状から主な治療は人工透析である。透析治療は国の財政を圧迫し、また患者の生活への負担も大きい。人工透析に変わるような治療への糸口となる研究が必要とされていると考えた。そこで本研究では、非常に複雑な構造と多くの細胞群により構成される腎臓を再生するために、当研究室で確立している腎・尿管発生に重要な働きをしている遺伝子である Pax2 を遺伝子導入した ES 細胞から腎構成細胞を分化させることで新しい腎臓の再生医療の技術を確立することを試みた。

以前当研究室で行った検討では、Pax2 遺伝子導入 ES 細胞を分化させると、aquaporin-1 遺伝子(近位尿細管マーカー) の発現亢進を認めることが分かり報告した。そこで作成に成功し、確立した Pax2 遺伝子導入 ES 細胞において、胚様体(EBs)を形成させ、中胚葉分化因子であるアクチピン A とレチノイン酸(RA)を(1)非添加、(2)添加の条件別に EBs の平面培養を行った。EBs をそれぞれ回収し、腎臓発生に関連する各種遺伝子発現を PCR 法により評価した。さらに、糸球体や尿細管など腎構成細胞の有無について免疫染色法を用い検討した。(1)アクチピン A・RA 非添加群で Pax2 遺伝子を発現させた EBs では、integrin  $\alpha 8$  遺伝子(間葉細胞に発現する接着因子)と aquaporin-1 遺伝子の発現亢進を認めた。免疫染色では、aquaporin-1 陽性細胞数の増加を確認することができた。(2)アクチピン A・RA 添加群においては、BMP7 遺伝子(間葉細胞から尿細管への分化に関連する因子)、Ret 遺伝子(GDNF と協調し尿管芽形成する因子)、Pax8 遺伝子(Pax2 遺伝子と協調し尿管形成する因子)、Podocin 遺伝子(糸球体の足細胞のマーカー)などの発現亢進を認めた。ただし免疫染色では Podocin の発現は確認できなかった。以上から、Pax2 遺伝子を強制発現させることで、一部の腎構成細胞あるいは前駆細胞の構成比率が増加し、ES 細胞から腎細胞への分化が誘導されたと考えられた。そこで、免疫染色で確認可能であった、aquaporin-1 を用い、アクチピン A・RA 非添加の条件下で分化させた Pax2 遺伝子を発現させた EBs を Pax2 と aquaporin-1 で二重標識し、FACS を行ったところ、両者の陽性細胞の増加を確認することができた。この結果から、この分化条件で一定の近位尿細管の前駆細胞が得られている可能性が示唆された。この方法で得られた細胞を免疫不全マウスに移植したところ、分化した細胞塊が確認できた。免疫染色では Pax2 の発現が確認できたが、他の腎構成細胞を示すものでは染色できなかった。この結果から、細胞の分化が進みすぎていて、移植する時期が乖離していた可能性が示唆された。これらの点を改善させるためには、もう少し前段階で発現しているマーカーでの FACS が必要であると考えられた。その点を改善させることで、これらの結果から、中胚葉分化因子との協調により、腎を構成する多様な細胞への分化が可能と考えられ、腎発生メカニズムの解明や将来の腎再生医療への応用が期待できると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato Taiki, Mizuno Kentaro, Nishio Hidenori, Moritoki Yoshinobu, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Ando Ryosuke, Hayashi Yutaro, Yasui Takahiro	4. 巻 8(5)
2. 論文標題 Disorganization of claudin-11 and Dysfunction of the Blood-Testis Barrier During Puberty in a Cryptorchid Rat Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 1398-1408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/andr.12788.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Mizuno Kentaro, Nishio Hidenori, Kato Taiki, Kamisawa Hideyuki, Moritoki Yoshinobu, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro
2. 発表標題 Potential role of EEf1A1 and TPT1 genes expressed in the spermatogonial stem cells as a predictive factor of subsequent testicular growth
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nishio Hidenori, Mizuno Kentaro, Kato Taiki, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro
2. 発表標題 Kdm5a activates the protein kinase A signaling pathway in mouse spermatogonial GC-1 cells
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kato Taiki, Mizuno Kentaro, Nishio Hidenori, Moritoki Yoshinobu, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Ando Ryosuke, Hayashi Yutaro, Yasui Takahiro
2. 発表標題 Disorganization of claudin-11 and dysfunction of the blood-testis barrier during puberty in a cryptorchid rat model
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西尾 英紀  (nishio hidenori)  (10621063)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教   (23903)	
研究分担者	林 祐太郎  (hayashi yutaro)  (40238134)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	
研究分担者	安井 孝周  (yasui takahiro)  (40326153)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	
研究分担者	丸山 哲史  (maruyama tetsuji)  (50305546)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	
研究分担者	水野 健太郎  (mizuno kentaro)  (70448710)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授   (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------