

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03699

研究課題名（和文）PAX2による細胞系譜境界制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Regulation of cellular lineages by PAX2 during kidney development

研究代表者

小林 明雄（Kobayashi, Akio）

熊本大学・発生医学研究所・准教授

研究者番号：90840223

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：現在、哺乳類の腎臓発生において、どのように細胞系譜境界が形成されるか不明である。これまでの研究で、マウス成体内において、転写因子PAX2の機能がネフロン前駆細胞における間質の形質を抑制することで、ネフロンと間質の間に細胞系譜境界が存在することを生体内で明らかにした。本研究によって、このPAX2機能はネフロン前駆細胞に特異的であることが明らかになった。さらに、ヒト腎臓オルガノイドにおいても、PAX2機能の一部が再現されている可能性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の腎臓発生における細胞系譜境界形成の機構は不明であるが、本研究成果であるPAX2機能を手がかりに、細胞系譜境界の形成メカニズムを解き明かせる可能性が開けた。またヒト腎臓オルガノイドを用いてヒトPAX2変異であるRenal coloboma syndrome (RCS)の疾患モデルを確立することで、より良い再生医療のための知識の基礎を築き、将来的に透析・腎移植の必要性を無くし、RCSを含む腎臓病患者やその家族の負担を軽減することに繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：It is currently unclear how cellular lineages are formed during kidney development in mammals. We previously discovered that the cellular lineage boundary between the nephron and renal interstitium is established by PAX2 function in nephron progenitor cells repressing renal interstitial cell fates in the mouse. Here, we showed that this PAX2 function regulating the nephron-interstitium lineage boundary is restricted to nephron progenitor cells and is lost upon initiation of nephron differentiation. We further found that the requirement of PAX2 function can be recapitulated in nephron organoids generated from induced pluripotent stem (iPS) cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：腎臓発生 前駆細胞 細胞系譜境界 ネフロン PAX2

1. 研究開始当初の背景

臓器発生において、細胞種が生成されると同時に細胞系譜境界が形成される。これまでの発生生物学に関する研究によって、シグナル分子等による細胞分化決定の様式は解明されつつあるが、分化後の細胞系譜境界の制御については未だに不明な点が多い。細胞系譜境界の制御に関する知見は、今後の再生医療において、効率的な分化誘導・増幅培養系の確立に有用である。

腎臓を含む多くの臓器は、主に機能単位である実質と、その実質を取り囲む間質から構成される。腎臓の実質であるネフロンの数と腎臓の機能との間には相関があることが知られている。現在の腎臓病の主な治療である透析および腎移植は、腎臓病患者および医療経済学にとって甚大な負担となっており、この腎臓病治療の問題を克服する再生医療に大きな期待がされている。申請者は、腎臓発生期の遺伝子改変マウスを用いて、ネフロン前駆細胞と間質前駆細胞を同定し (Kobayashi et al., *Cell Stem Cell*, 2008; Kobayashi et al., *Stem Cell Reports*, 2014)、ネフロン前駆細胞における *Pax2* の機能がネフロン-間質間の細胞系譜境界を形成していることを明らかにした (Naiman et al., *Developmental Cell*, 2017)。しかし、*Pax2* がネフロン-間質間の細胞系譜境界を制御するメカニズムは不明である。また、ヒトにおける *PAX2* 遺伝子変異である Renal coloboma syndrome (RCS) の疾患モデルは存在しない。そこで、我々はネフロンの発生ステージおよび腎臓の細胞種特異的な *Pax2* 遺伝子の機能を検討した。また、ヒト iPS 細胞由来の *PAX2* 欠損腎臓オルガノイドを用いて、RCS の疾患モデルの確立を検討した。本計画により得られる知見は、より良い再生医療のための知識の基礎を築き、将来的に透析・腎移植の必要性を無くし、RCS を含む腎臓病患者やその家族の負担を軽減することに繋がると期待される。

2. 研究の目的

本計画では、**腎臓細胞種特異的な *Pax2* 遺伝子改変マウス胎児を用いて *Pax2* の細胞系譜境界の制御メカニズムを明らかにすることを目的とする。**ネフロン前駆細胞における *Pax2* 遺伝子の機能が間質の表現系を抑制することによって、ネフロンの細胞系譜が維持されることを我々は示した。しかし、この間質の表現系を抑制する *Pax2* 遺伝子の機能が、ネフロン前駆細胞特異的なのか、もしくはネフロン分化開始後も間質の表現系を抑制するのか不明である。また、*Pax2* の機能が、ネフロン細胞系譜の決定に十分なのか分かっていない。

また、ヒト iPS 細胞由来の腎臓オルガノイドを用いて、試験管内での RCS 病態の再現を**目標とする。***Pax2* を欠損したマウスの生体内の腎臓ではネフロンが欠損するが、ヒトの *PAX2* 欠損 iPS 細胞由来の生体外腎臓オルガノイドではネフロンの生成が正常に観察される (Naiman et al., *Developmental Cell* 2017; Kaku et al., *Sci Rep* 2017)。本計画では、これらのマウス生体内とヒト生体外におけるネフロン生成に関する表現型の差違が、種差によるのか、もしくは生体内・外の違いによるのかを問う。

3. 研究の方法

1. マウス腎臓発生時の細胞系譜制御における *Pax2* 遺伝子の機能メカニズムの同定

ネフロン分化開始後の *Pax2* 遺伝子の機能を同定するため、我々の作製した *Pax2 flox* マウスを、同様に我々が作製したネフロン分化開始後特異的な *Wnt4-Cre* マウスと交配し、ネフ

ロン分化後特異的に *Pax2* 遺伝子機能を欠損するマウスを作製した。ネフロン分化後特異的 *Pax2* 欠損マウス胎児の腎臓を、蛍光標識抗体を用いた共焦点顕微鏡観察による細胞系譜解析を行うことで、ネフロン分化後特異的な *Pax2* 欠損が、ネフロン細胞系譜の維持に影響を与えるかどうか検討する。

また、*Pax2* 遺伝子の機能がネフロン細胞系譜の決定に十分であるかどうか検討するため、Cre-loxP システムを用いて細胞種特異的に *Pax2* を発現できるマウスを作製し、*Pax2* を間質で異所的に強制発現させる。上記と同様に蛍光標識抗体を用いた共焦点顕微鏡観察による細胞系譜解析を行い、間質細胞系譜のネフロン細胞系譜への転換が起こるかどうか調べる。*Pax2* を含む多因子が必要である可能性も検討するため、腎臓培養系における間質細胞内で *Pax2* を含むネフロン前駆細胞に重要と考えられている因子群を、レンチウイルス介して異所的に共発現させる。

2. ヒト iPS 細胞由来の腎臓オルガノイドを用いた PAX2 欠損病態モデルの確立

Pax2 欠損マウス生体内と、ヒト *PAX2* 欠損腎臓オルガノイドの表現系の違いが、生体外培養の影響による可能性を検討するため、様々な培養条件下で *PAX2* 欠損腎臓オルガノイドを作製し、マウス生体内と同様にネフロンの発生に異常が見られるか調べる。

4. 研究成果

1. マウス腎臓発生時の細胞系譜制御における Pax2 遺伝子の機能メカニズムの同定

ネフロン分化後特異的に *Pax2* 遺伝子機能を欠損したマウス胎児腎臓では、ネフロンの分化に異常が見られた。しかし、ネフロン前駆細胞特異的な *Pax2* 欠損したマウス胎児腎臓で観察されたネフロン細胞系譜の間質細胞系譜への形質転換はみられなかった。このことから、**間質の表現系を抑制することでネフロン細胞系譜を維持する Pax2 遺伝子の機能は、未分化なネフロン前駆細胞特異的であることが明らかになった。**ネフロン前駆細胞においてネフロン分化が開始すると、**ネフロン細胞系譜維持には Pax2 遺伝子機能が必要ではなくなることを示している。**

Pax2 の機能がネフロン細胞系譜の決定に十分であるかどうか調べるため、我々の作製した間質特異的 *Foxd1-Cre* マウスを用いて、*Pax2* を異所的に間質で強制発現させたが、間質の細胞系譜には変化が見られなかった。そこで、培養腎臓中で *Pax2* を含むネフロン前駆細胞に重要と考えられている因子群を強制発現させた。完全ではないものの細胞種の形質転換の可能性が示されたものの、その効率は低かった。今後、さらなるネフロン前駆細胞因子の検討により、高効率かつ安定的な実験系を確立することで、決定的な結論が得られると期待される。

2. ヒト iPS 細胞由来の腎臓オルガノイドを用いた PAX2 欠損病態モデルの確立

PAX2 を欠損したヒト iPS 細胞由来の腎臓オルガノイドを様々な培養条件下で観察することにより、*PAX2* 欠損ヒト腎臓オルガノイドの表現型が培地条件に依存することが明らかになった。特定の培養条件下の *PAX2* 欠損腎臓オルガノイドにおいて、ネフロンの発生に異常が見られた。このことは、***Pax2* 欠損マウス生体内と、ヒト *PAX2* 欠損腎臓オルガノイドの表現系の違いが、生体外培養の影響による可能性であることを示している。**今後、さらなる条件の最適化によって、ヒト iPS 細胞由来の腎臓オルガノイドを用いた **RCS 疾患モデル確立の可能性が示された。**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naganuma Hidekazu, Miike Koichiro, Ohmori Tomoko, Tanigawa Shunsuke, Ichikawa Takumi, Yamane Mariko, Eto Masatoshi, Niwa Hitoshi, Kobayashi Akio, Nishinakamura Ryuichi	4. 巻 470
2. 論文標題 Molecular detection of maturation stages in the developing kidney	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 62～73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2020.11.002	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 -
1. 著者名 Tanigawa Shunsuke, Tanaka Etsuko, Miike Koichiro, Ohmori Tomoko, Inoue Daisuke, Cai Chen-Leng, Taguchi Atsuhiko, Kobayashi Akio, Nishinakamura Ryuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Generation of the organotypic kidney structure by integrating pluripotent stem cell-derived renal stroma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 611～611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-28226-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kuraoka Shohei, Tanigawa Shunsuke, Taguchi Atsuhiko, Hotta Akitsu, Nakazato Hitoshi, Osafune Kenji, Kobayashi Akio, Nishinakamura Ryuichi	4. 巻 31
2. 論文標題 PKD1-Dependent Renal Cystogenesis in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Ureteric Bud/Collecting Duct Organoids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 2355～2371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2020030378	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 -
1. 著者名 Naganuma Hidekazu, Miike Koichiro, Ohmori Tomoko, Tanigawa Shunsuke, Ichikawa Takumi, Yamane Mariko, Eto Masatoshi, Niwa Hitoshi, Kobayashi Akio, Nishinakamura Ryuichi	4. 巻 470
2. 論文標題 Molecular detection of maturation stages in the developing kidney	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 62～73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2020.11.002	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2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akio Kobayashi
2. 発表標題 Genetic regulation of cellular lineages during kidney development"
3. 学会等名 The 15th International Symposium of The Institute Network for Biomedical Sciences (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akio Kobayashi
2. 発表標題 Genetic regulation of cellular lineages in the kidney
3. 学会等名 The 4th KAIST-KU Workshop and Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

PKD1変異を有するヒトiPS細胞由来尿管芽/集合管オルガノイドにおける腎嚢胞再現 http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/np107/ 発生期腎臓の成熟段階を反映する遺伝子群の同定 http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/np115/

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

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
---------	---------