

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500424

研究課題名（和文） 中腎管細胞を用いた中腎管の再構築およびネフロン誘導能を有する尿管芽の作成

研究課題名（英文） Tissue formation of Wolffian duct cells, and generation of ureteric buds competent for nephron induction

研究代表者

城倉 浩平（JOHKURA KOHEI）

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：30303473

研究成果の概要（和文）：中腎管は腎臓発生に不可欠な組織であり、中腎管細胞の維持・増幅と組織化は、腎臓再生研究の鍵となる。本研究では、様々な成長因子について中腎組織での発現と中腎管培養に対する効果を検証し、腎臓組織工学への利用の可能性を調べた。これまでの成果として、特に FGF の有用性を明らかにした。中腎組織に発現する FGF9 が中腎管細胞の生存・増殖・分化応答能を支持することを突き止め、同細胞の培養維持にも効果的であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Wolffian duct is an essential tissue for kidney development, and ductal tissue formation of cultured Wolffian duct cells will be a key for kidney regeneration. In the present study, we examined gene expression of various growth factors in mesonephric tissues and their effects on Wolffian duct culture to assess their application for tissue engineering of the kidney. As a result, the potential of FGF was elucidated. FGF9 was shown to be expressed in mesonephric tissues and support the survival, proliferation and competence of Wolffian duct cells. A positive effect of FGF9 on primary culture of Wolffian duct cells was also verified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：腎臓再生医学・発生生物学

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：中腎管、FGF、レセプター、成長因子、腎臓、再生、組織工学、相互作用

1. 研究開始当初の背景

我が国の慢性腎不全患者数の増加は著しく、腎臓再生医療への取り組みは急務である。近年、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞を用いた再生医療が現実性を帯びてきており、腎臓組織再生についても世界的に研究が進められている。

腎臓（後腎）は原基を構成する二つの前駆組織、中腎管と後腎間葉との相互作用により発生し、中腎管に由来する尿管芽が分枝を繰り返しながら後腎間葉から次々とネフロンを誘導し接続する。傷害腎臓組織の再生には、“集合管系と接続するネフロン新生”を図ることが必要と考えられ、腎臓の発生メカニズ

ムを踏まえ中腎管と後腎間葉との双方向性誘導を再現することが有力な方法である。しかし、多能性幹細胞を中腎管細胞および後腎間葉細胞の供給源とする場合においても、どのようにして細胞から組織を得るか、という点は依然不透明である。従って現時点で必要なのは、胎児中腎管細胞を用いて組織（管腔構造）を構築する組織工学的な道筋を確立することであると考える。また、このようにして得られた管腔構造が元の組織同様に成長因子に反応し、尿管芽を形成しなければ意味を成さない。有用な材料細胞が得られたとき、この“細胞から組織”のハードルを越え、速やかに腎臓組織再生への応用を図るための準備を進める必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、まずラット胎児において、中腎管の維持と尿管芽形成を制御する因子（成長因子・細胞外マトリクス等）を明らかにした上で、これらを用いて培養中腎管細胞の維持・増幅を図る。さらに組織工学的手法により、培養中腎管細胞からコンピテントな中腎管組織の作出を目指す。この細胞由来中腎管の評価として、GDNF に対する応答性（尿管芽形成）、尿管芽の分枝成長、後腎間葉との相互誘導（ネフロン誘導と接続）を検討する。

3. 研究の方法

(1) 中腎管と周囲間葉における成長因子の遺伝子発現解析

胎生 12 日、13 日ラット胎児の中腎管とその周囲間葉組織を単離し、FGF を始めとする各種成長因子およびそのレセプターの遺伝子発現解析を行った。リアルタイム PCR 法を用いた。

(2) 成長因子を用いた中腎管培養

マトリゲルを用いた中腎管 3 次元培養系を作り、ここへ胎児中腎管組織の遺伝子発現解析で確認された成長因子を添加して、その作用を検証した。免疫染色による分裂細胞や GDNF レセプターの検出を行った。また、成長因子によりもたらされる細胞応答について、特に GDNF レセプター (Ret, GFR α -1)、細胞増殖関連因子 (CyclinD1)、アポトーシス関連因子 (Bax, Bcl2) の遺伝子発現変動に注目して調べた。シグナル伝達阻害剤を併用して、作用の裏付けを行った。

(3) 培養中腎管の分化応答能の検証（尿管芽誘導）

成長因子による中腎管培養系に、後腎間葉の成長因子 GDNF を添加し、尿管芽形成を観察した。また、培養中腎管を新たに単離した後腎間葉と再構成し、共培養を行って双方向性誘導による尿管芽形成とネフロン形成を評

価した。

(4) 中腎管細胞の培養

中腎管あるいは周囲間葉で発現が認められた成長因子を中腎管細胞の初代培養へ添加し、細胞増殖や培養維持効果を確認した。また、Blebbistatin (myosin II 阻害剤) を用いて、培養系への移行に伴うアポトーシスを抑制し、培養維持に対する効果を調べた。

(5) 培養中腎管細胞の組織化

中腎管細胞を温度応答性ディッシュ上で培養後、細胞結合を維持した状態で剥離し、マトリゲル中へ移行して 3 次元培養した。中腎管の維持効果を持つ成長因子を添加し、中腎管細胞の組織化を検討した。

4. 研究成果

(1) 主な成果

本研究ではまず、中腎管・周囲間葉に発現する因子の役割を解明した。特に中腎組織に発現する FGF とそのレセプターについて精査し、中腎管維持機構における役割を検証した。FGF に関しては、FGF9、FGF18、FGF22 が中腎管と間葉の双方に、FGF5 が間葉に、FGF17 が中腎管に発現することを確認した（図 1）。これらの中では FGF9 のみが培養中腎管の成長を維持することが分かった（図 2）。

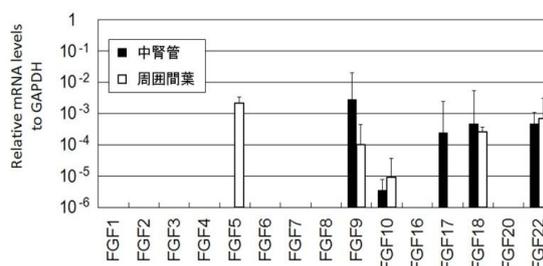


図 1 中腎組織に発現する FGF (胎生 12 日)

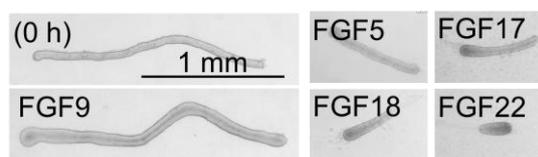


図 2 各種 FGF による単離中腎管培養 (24 時間)。FGF9 で培養すると、単離時 (0 h) に比べ明らかな成長が認められるが、他の FGF では退縮する。

また、遺伝子発現解析から、FGF9 は中腎管の生存・増殖・GDNF レセプター Ret 発現を支持することが明らかになった。培養中腎管に対する FGF9 の作用は、これまで報告されていた FGF1 と FGF7 に類似しており、特に中腎管

の長期培養を維持する点で FGF7 にほぼ匹敵する。GDNF による尿管芽誘導 (図 3)、後腎間葉との共培養による尿管芽分枝形成とネフロン誘導などからも、FGF9 培養中腎管のコンピテンスが証明された。

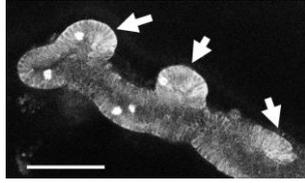


図 3 FGF9 と GDNF による単離中腎管培養 (96 時間)。矢印は誘導された尿管芽。FGF9 により中腎管の分化応答能が維持されることを示唆する。

FGF レセプターについても中腎組織における発現パターンを明らかにした (図 4)。FGF9 で活性化されるサブタイプ 2c と 3b の発現が中腎管に認められ、これらが主に FGF9 を受容している可能性が高い。レセプター阻害剤により、FGF9 の培養中腎管に対する効果は有意に減衰した。一方で、間葉細胞も FGF9 で活性化される 2c レセプターを持つことから、FGF9 は間葉細胞を介して中腎管のコンピテン스에何らかの働きを持つ可能性が考えられる。

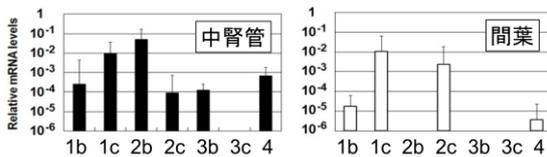


図 4 中腎組織の FGF レセプター (胎生 12 日)。2c と 3b は、FGF9 により強く活性化されることが知られている。

(以上の結果を本研究の成果の一部として論文にまとめ、投稿中)

中腎管細胞初代培養に FGF9 を添加すると、培養維持期間が延長する所見が得られた。さらに Blebbistatin の併用により、維持効果の促進を認めた。これらの使用により、中腎管細胞の培養維持期間の改善が認められ、細胞増幅のための条件基盤が得られた。現在、中腎管初代培養細胞のシート状剥離と、FGF9 を始めとする成長因子添加により、組織化実験を進めている。

(2) 得られた成果の位置付けとインパクト
腎臓発生開始に至るまでの中腎管が、どのようにして分化応答能を保持し、後腎間葉に応

答して尿管芽を形成するのか、現在までにその機構の詳細は明らかになっていない。本研究により中腎管の分化応答能維持機構の一端が明らかになったことで、発生生物学的な意義を有すると考えられる。また、腎臓組織再生の見地からも、FGF9 が中腎管の応答能を保った状態で in vitro で維持できることを見出した意義は大きい。後腎間葉との相互作用による腎臓組織誘導に向けた前進であり、継続的な研究推進により腎臓組織再生へ向けた展開が期待できる。

(3) 今後の展望

再生医学分野において、発生原基の上皮細胞と間葉細胞との相互作用を利用して器官再生を図る手法は、これからの発展が期待され、幹細胞研究と連動して推進すべき領域であると確信する。中腎管の培養細胞から、コンピテントな管腔組織を形成することにより、腎臓原基の上皮成分を提供することができる。腎臓前駆である後腎間葉細胞の組織化と併せて、腎臓再生研究において大きな意義を有する。引き続き、成長因子の効果解析を主軸として推進していく。また、この方策の基盤として、中腎管の維持機構の解明もまた極めて重要な課題であると考えられる。今後も発生生物学的な知見を蓄積し、細胞培養や組織化へ応用していく予定である。細胞数の確保が難しい点は、組織工学的な研究展開の壁となるが、腎集合管上皮細胞株である IMCD 細胞などを利用し、腎管系上皮の管腔形成・維持機構を解析することで、有用な情報が得られると考えられる。

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 3 件)

① Tee JB, Choi Y, Shah MM, Dnyanmote A, Sweeney DE, Gallegos TF, Johkura K, Ito C, Bush KT, Nigam SK. Protein kinase A regulates GDNF/Ret-dependent but not GDNF/Ret-independent ureteric bud outgrowth from the Wolffian duct. *Dev Biol* 347:337-347, 2010 (査読有り)
DOI:10.1016/j.ydbio.2010.08.029

② Rosines E, Johkura K, Zhang X, Schmidt HJ, Decambre M, Bush KT, Nigam SK. Constructing kidney-like tissues from cells based on programs for organ development: towards a method of in vitro engineering of the kidney. *Tissue Eng Part A* 16:2441-2455, 2010 (査読有り)
DOI: 10.1089/ten.tea.2009.0548

③ Shah MM, Tee JB, Meyer T, Meyer-Schwesinger C, Choi Y, Sweeney DE, Gallegos TF, Johkura K, Rosines E, Kouznetsova V, Rose DW, Bush KT, Sakurai H, Nigam SK. The instructive role of metanephric mesenchyme in ureteric bud patterning, sculpting, and maturation and its potential ability to buffer ureteric bud branching defects. *Am J Physiol Renal Physiol* 297, F1330-F1341, 2009 (査読有り)
DOI:10.1152/ajprenal.00125.2009

〔学会発表〕(計 4 件)

①城倉 浩平、櫻井 裕之．腎臓原基上皮系のコンピテンシ維持における FGF シグナル 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2012 年 3 月 27 日、甲府

②城倉浩平、櫻井裕之、Kevin Bush、Sanjay Nigam. Role of FGF signal in GDNF receptor expression and cell proliferation of Wolffian duct (中腎管の GDNF 受容体発現と細胞増殖における FGF シグナルの役割). 第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会、2011 年 3 月 28-30 日、J Physiol Sci 誌上開催 (横浜での集会は震災のため中止)

③城倉浩平、櫻井裕之、白澤佐季子、横山忠幸、Kevin Bush、Sanjay Nigam. 中腎管の細胞増殖・GDNF 応答性の維持における FGF の関与. 日本解剖学会第 70 回中部支部学術集会 2010 年 10 月 17 日、岐阜

④城倉浩平、櫻井裕之、白澤佐季子、横山忠幸、Kevin Bush、Sanjay Nigam. FGF シグナルは単離中腎管の増殖と GDNF 応答性を維持する. 第 9 回日本再生医療学会総会 2010 年 3 月 18 日、広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城倉 浩平 (JOHKURA KOHEI)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：30303473