

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1日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591037

研究課題名（和文） 胚性幹細胞を用いたエリスロポエチン産生細胞の単離

研究課題名（英文） Isolation of erythropoietin-producing cells using embryonic stem cells

研究代表者 久保 篤史 (KUBO ATSUSHI)

奈良県立医科大学 医学部 助教

研究者番号：30316062

研究成果の概要（和文）：

1. Epo-EGFP ES細胞の樹立

Epo遺伝子座に相同組み換えによりEGFPを組み込むためにtargeting vectorを作製した。Epo遺伝子のシグナル・ペプチドと開始コドンとを削除する形で、EGFP-IRES-puroR遺伝子を組み込む。このベクターをC57BL/6マウス由来のES細胞にエレクトロポレーションすることにより、相同組み換えを行い、Epo遺伝子座にEGFPを組み込んだES細胞を樹立した（Epo-EGFP ES細胞）。このES細胞を外胚葉条件、中胚葉条件、内胚葉条件などの様々な培養条件で分化させ、様々な段階でFACSでEGFPの解析を行っている。

2. EPO-EGFPマウスの樹立

また、EGFPを導入したES細胞をblastocystに注入し、Epo+/-のヘテロ・マウスを作成した。現在、腎臓内でEGFPの発現部位を検討することで、in vivoにおいてもEpo産生細胞がどのような局在を示すかについても検討している。

研究成果の概要（英文）：

1. Targeting vector was designed to integrate EGFP in erythropoietin (EPO) gene. EGFP-IRES-puroR gene was knocked-in into the start codon of EPO gene. This vector was electroporated into C57BL/6 derived ES cells and then EPO-EGFP ES cells were established. These ES cells were cultured in various condition such as ectoderm, mesoderm and endoderm and EGFP was evaluated by FACS.
2. EPO-EGFP ES cells were injected into mouse blastocyst and then EPO-EGFP +/- mouse was established. Section of kidney from EPO-EGFP +/- was analyzed by fluorescent microscopy. Isolated cells from EPO-EGFP +/- mouse were analyzed by FACS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：

ES細胞、エリスロポエチン、腎臓

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

本邦における透析患者数は増加の一途をたどり、27万人以上となっている。末期腎不全患者において腎性貧血は、その大きな合併症の一つであり、Epoの組み換えタンパク質の投与による治療が行われている。Epoは腎臓で産生され、腎不全による腎機能低下でその産生が低下し、腎性貧血を誘導する。2004年に発表された Dialysis Outcome and Practice Pattern Study (DOPPS)では、透析患者において Hb を 11g/dL 以上にすることで、死亡率を改善するということが示され、積極的に Epo を投与することが推奨されている (Am J Kidney Dis 2004;44:94-111)。さらに最近では、Epo が腎ポドサイトの apoptosis を抑制し、蛋白尿の減少などの腎保護作用も併せ持つ (Kidney Int 2007;72:455-463, Kidney Int 2007;72:489-498)、糖尿病性網膜症の血管新生の抑制 (J Clin Invest 2008;118:526-533)、心筋梗塞の病態改善する (FASEB J. 2008) など新たな作用も報告されている。これらの結果により、Epo が単に貧血を改善するのみでなく、腎保護作用を有する分泌因子という面からも新たな脚光を浴びている。

腎性貧血に至る機序としては、腎不全による尿毒性物質が腎臓での Epo 産生を抑制すると推測されている。しかしながら、腎機能が比較的温存された状態で高度な腎性貧血をおこすこともあることや、逆に透析導入されても比較的腎性貧血が軽い場合、透析療法を行っているにも関わらず、突然多血症を呈する症例などを経験することなどもある。Epo は、古くからよく知られた代表的なホルモンでありながら、こういった腎性貧血についての詳細な科学的根拠は未だ解明されていない。その理由の一つとして、Epo が腎臓で産生されているということは明らかなのものの、腎臓内での産生細胞が明確でないことにあるのではないかと考えられる。In situ hybridization による検討では、腎皮質の尿細管周囲でその mRNA の発現が指摘されているが (Kidney Int 1993; 43:815-823)、その細胞の同定までには至っていない。また、単純に Epo の免疫染色をするだけでは、持続的な分泌であるために細胞内に蓄積されず、その分泌細胞の同定、単離は困難である。

2. 研究の目的

これまでに多くの発生工学的な研究では、GFP をトレーサーとして用いることで、遺伝子発現細胞の同定がなされている。ES 細胞を用いて、目的遺伝子座に GFP を相

同組み換えで組み込むことで、GFP の発現を蛍光顕微鏡で観察することにより、その発現細胞の同定が、in vivo ならびに in vitro で行われている。これまでに我々も、中胚葉細胞を単離する目的で、中胚葉で発現する遺伝子である Brachyury に着目し、Brachyury 遺伝子座に EGFP を導入した ES 細胞を作成し、FACS により EGFP をソートすることにより中胚葉細胞を単離することに成功している (Development 2003;130:4217-4227)。これらの細胞を用いることにより、中内胚葉の同定 (Kubo A et al. Development 2004;131,1651-1662)、中胚葉からの内皮細胞の分離 (Kubo A et al. Blood 2005;105: 4590-4597) など様々な成果が得られている。さらにこの ES 細胞を用いて、ヘテロ・マウスを作成し、GFP を蛍光顕微鏡で観察することにより、in vivo での Brachyury 発現細胞を明らかにすることにも成功している (Nature 2004;432:625-30)。さらに、マウス胎児から EGFP 細胞を FACS でソートすることにより Brachyury 発現細胞を単離し、in vitro で培養することにも成功している。これらと同様の手法を用いて、Epo 産生細胞を EGFP を蛍光顕微鏡で観察することによりその産生細胞を同定し、GFP をソートすることで Epo 産生細胞の単離を行う。

3. 研究の方法

今回我々は Epo 遺伝子座に EGFP を組み込んだ ES 細胞を作製し、in vitro, in vivo において EGFP の発現から Epo 産生細胞を単離・同定したい。Epo 遺伝子座に EGFP-IRES-puroR を相同組み換えにより ES 細胞に導入する。この ES 細胞を用いれば、EGFP を FACS でソートすることにより EPO 産生細胞を単離することができる。さらに、ピューロマイシン耐性遺伝子も同時に導入されているので、ピューロマイシンによる薬剤選択も可能である。さらに我々は、Epo 遺伝子座 EGFP-IRES-puroR を組み込んだ ES 細胞を blast cyst injection を行い、ヘテロ・マウスを作製し、同様の手法でマウスでの Epo 産生細胞の単離・同定を行いたい。Epo 遺伝子ヘテロ・マウスの腎臓を蛍光顕微鏡で観察することにより in vivo で EGFP の発現を観察することができる。

4. 研究成果

A. Epo-EGFP ES 細胞の樹立

Epo 遺伝子座に相同組み換えにより EGFP を組み込むために targeting vector を作製した。Epo 遺伝子のシグナル・ペプ

チドと開始コドンを削除する形で、EGFP-IRES-puroR 遺伝子を組み込む。このベクターを C57BL/6 マウス由来の ES 細胞にエレクトロポレーションすることにより、相同組み換えを行い、Epo 遺伝子座に GFP を組み込んだ ES 細胞を樹立した (Epo-EGFP ES 細胞)。この ES 細胞を外胚葉条件、中胚葉条件、内胚葉条件などの様々な培養条件で分化させ、様々な段階で FACS で GFP の解析を行っている。これらの条件の中では、培養 6 日目では、外胚葉分化でより多くの GFP 陽性細胞の出現を認めたが、依然その割合は低かった。次に、無血清培地でさらなる長期培養を行ったところ、FACS での解析で、培養 27 日目に EGFP 陽性細胞が 35%まで上昇した。また、これらの細胞を低酸素条件で培養したところ、EPO mRNA での解析では、約 2 倍に mRNA レベルは上昇したが、FACS 解析での EGFP 陽性数、明らかな蛍光強度の上昇を認めなかった。

B. EPO-EGFP マウスの樹立

また、GFP を導入した ES 細胞を blastocyst に注入し、Epo^{+/+}のヘテロ・マウスを作成した。現在、腎臓内で GFP の発現部位を検討することで、*in vivo* においても Epo 産生細胞がどういった局在を示すかについても検討している。まず、最初にヘテロマウスの腎臓の凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡で観察した。これまでの報告のように腎皮質の間質に GFP 陽性細胞を認めた。

C. EPO-EGFP 陽性細胞の単離

次に、これらの腎皮質部分を切り取り、コラーゲン処理やトリプシン処理により、単細胞への分離を試み、FACS で GFP 陽性細胞を単離しえるかについて検討を行った。腎皮質、髄質をそれぞれ分けて単離し、コラーゲン処理したのちに、トリプシントリプシン処理を数分行うことで、単一細胞への分離に成功した。細胞分離フィルターを通すことで、FACS 解析可能な細胞を取り出し、FACS の解析で約 10%の GFP 陽性細胞を認めた。皮質、髄質で大きな差を認めなかった。FACS sorter により GFP 陽性細胞の単離を行い、RNA 抽出を試みたが、十分な細胞数の単離は困難であり、さらなる細胞分離の方法の検討が必要である。今後は、単離方法の改善を含めて、検討を行い、より多くの細胞数を FACS で単離できるようなシステム構築が必要である。

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 5 件)

1. Kubo A, Kim YH, Irion S, Kasuda S, Takeuchi M, Ohashi K, Iwano M, Dohi Y, Saito Y, Snodgrass R, Keller G.

The Homeobox Gene Hex regulates hepatocyte differentiation from embryonic stem cell-derived endoderm. *Hepatology* 51,633-641, 2010

2. Kubo A, Stull R, Takeuchi M, Bonham K, Gouon-Evans V, Sho M, Iwano M, Saito Y, Keller G, Snodgrass R. Pdx1 and Ngn3 overexpression enhances pancreatic differentiation of mouse ES cell-derived endoderm population. *PLoS One* 6 e2405, 2011

3. Honoki K, Fujii H, Kubo A, Kido A, Mori T, Tanaka Y, Tsujiuchi T.

Possible involvement of stem-like populations with elevated ALDH1 in sarcomas for chemotherapeutic drug resistance. *Oncol Rep.* 2010 Aug;24(2):501-5.

4. Yamaguchi Y, Iwano M, Suzuki D, Nakatani K, Kimura K, Harada K, Kubo A, Akai Y, Toyoda M, Kanauchi M, Neilson EG, Saito Y.

Epithelial-mesenchymal transition as a potential explanation for podocyte depletion in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 2009 Oct;54(4):653-64.

5. Takeda Y, Uemura S, Iwama H, Imagawa K, Nishida T, Onoue K, Takemoto Y, Soeda T, Okayama S, Somekawa S, Ishigami K, Takaoka M, Kawata H, Kubo A, Horii M, Nakajima T, Saito Y.

Treatment with recombinant placental growth factor (PlGF) enhances both angiogenesis and arteriogenesis and improves survival after myocardial infarction. *Circ J.* 2009 Sep;73(9):1674-82.

[学会発表] (計 3 件)

1. Kubo A, Takeuchi M, Kasuda S, Iwano M, Snodgrass R, Keiller G, Saito Y
The Homebox Gene HEX Regulates Hepatocyte Differentiation from ES cell-Derived Endoderm.
International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism (CVEM) 2010
March 31-April 1 (Nara, Japan)
2. Kimura K, Iwano M, Yamaguchi Y, Nakatani K, Kubo A, Akai Y, Saito Y
Stable expression of HIF-1 α in tubular epithelial cells promotes interstitial fibrosis.
International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism (CVEM) 2010
March 31-April 1 (Nara, Japan)
3. Yamaguchi Y, Iwano M, Suzuki D, Nakatani K, Kimura K, Harada K, Kubo A, Akai Y, Toyoda M, Kanauchi M, Neilson G E, Saito Y
Epithelial-mesenchymal transition as an explanation for podocyte depletion in diabetic nephropathy.
International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism (CVEM) 2010
March 31-April 1 (Nara, Japan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 篤史 (KUBO ATSUSHI)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：30316062

(2) 研究分担者

岩野 正之 (IWANO MASAYUKI)
奈良県立医科大学・医学部・講師
福井大学・医学部・教授
研究者番号：20275324