

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 4 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592077

研究課題名(和文) 胚性幹細胞を用いた腎臓発生分化機構の解明と腎臓再生医療への応用に関する基礎的研究

研究課題名(英文) The basic research about the investigation of the mechanism about the kidney generation using embryonic stem cells, and the application to kidney regeneration medicine.

研究代表者

畦元 将隆 (AZEMOTO MASATAKA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70264736

研究成果の概要(和文):

腎発生に重要な遺伝子である Pax2 を遺伝子導入した ES 細胞において、胚様体(EBs)を形成させ、アクチビン A とレチノイン酸を添加し培養を行った。EBs を回収し、RT-PCR 法により評価した。integrin α 8、aquaporin-1、BMP7、Ret、Pax8、Podcin の発現亢進を認めた。Pax2 遺伝子を強制発現させることで、ES 細胞から腎細胞への分化が誘導が示唆された。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された。

研究成果の概要(英文):

Transcription factor Pax2 is essential for kidney development. We have generated embryonic stem (ES) cell lines that repress Pax2 expression and examined their differentiation potential by embryoid body (EB) formation. EBs were cultured with or without retinoic acid and activin A. EBs were analyzed by reverse transcription (RT)-PCR and immunocytochemical analysis. Aquaporin-1 (Aqp1) and integrin α 8 were upregulated when cells were induced to form EBs. With retinoic acid and activin A, EBs overexpressed Pax2-induced Pax8, BMP4, BMP7, and Podocin. ES cell lines with inducible Pax2 expression may be useful for dissecting genetic cascades functioning in the development of various organs, including the kidney.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード:再生医療、胚性幹細胞、遺伝子導入、分化実験、RT-PCR

1. 研究開始当初の背景

腎臓は排泄器官、内分泌器官として生命維持に不可欠な臓器であるが、哺乳類では前腎、中腎の2つの胎生期の腎臓を経て後腎を形成するという発生過程の複雑さ、20種類以上の細胞種を含む構造上の複雑さなどの理由により発生機構の解明や、それに再生医療の研究が他の臓器に立ち遅れているのが現状である。

一方進行性腎疾患から末期腎不全に至り血液透析導入となる患者数は年間3万人を超え、平成18年の推計で血液透析を受けている日本の患者総数は27万人以上となっており、この10年間で倍増していて、今後も増加し続けることが予想される。末期腎不全に対する根本的治療として腎移植が挙げられるが提供者(ドナー)が少なく需要に対して大きく不足している。本邦においては透析患者の長期予後も良く非常に成功した治療といえるが、その反面、患者に厳しい食事制限、定期的な通院治療などの生活の質の低下、長期合併症等の問題を与え、更に透析医療費は全医療費の3%以上を占め年間約1兆円であり、医療経済面からも大きな問題を生じている。よってその解決策の開発は急務であり、末期慢性腎不全などの難治腎疾患に対する再生医療の開発が求められている。

近年、再生医療が様々な分野で脚光を浴びている。皮膚や軟骨などの分野では細胞工学的技術を用いて、すでに臨床応用が進められているものもある。しかし、腎臓の再生医療の分野ではまだ未開発であると考えられる。国内外では現在、マウスES細胞から尿細管細胞を分化させることが可能であることが報告されている。しかし、その他の腎機能を改善させる為に必要な細胞、特に糸球体の構成細胞は未だに報告がない。また最近では本邦の研究者らからiPS細胞の樹立が報告されている。この細胞はES細胞と同等の未分化能と3胚葉へ分化可能な万能性を有する細胞で、受精卵の利用が必要であるES細胞に比べ、倫理面、拒絶反応の面などで実際の再生医療を行う場合に考えられていた制約が解決され、現実の治療法としての再生医療を実現できる可能性が広がったと考えられる。またES細胞の研究成果はこのiPS細胞で応用できる。以上の点から、本研究による遺伝子導入ES細胞を使用した研究成果が新たな腎臓の再生医療発展の糸口となると考えている。

当施設において、先天性の尿路奇形、特に尿道下裂、停留精巣、腎盂尿管移行部狭窄症、尿管膀胱移行部狭窄症、膀胱尿管逆流症や尿路

悪性腫瘍に対する治療において欠損した組織の再建を行う中で、どうしても患者本人の生体組織を用いるだけでは限界があることがある。そこでSIS(腸管膜間質)を用いる尿道再建、膀胱再建や荒廃した精巣組織に成長因子や遺伝子導入して組織自体を改善させたり、精子細胞を分化させる研究を行い、臨床治療に活かす研究活動を行ってきた。その中で先天性の尿路奇形などで形成は行わないものの腎機能が改善せず、慢性腎不全に至る患者も多く存在する。そこで腎臓自体の再生を行うことの必要性を痛感した。

本研究は、幹細胞を用いた再生医療の技術およびティッシュ・エンジニアリングの技術を相補的に利用し、ES細胞から分化させた腎臓の構成細胞を実際の再生医療に応用できる方法で、細胞から生体内への移植し、慢性腎不全状態から腎機能を改善することが可能であることを検討し、確立することが目標である。

2. 研究の目的

ES細胞の研究では、その未分化である特徴を解明する研究が行われ、その後3胚様すべてに分化可能である全能性に対する研究が行われている。現在、筋肉、軟骨、骨髄血液細胞、神経、膵臓、肝臓においてES細胞から分化できることが証明されてきた。その中で腎臓構成細胞への分化に対する実験は遅れている傾向にあったが、近年、ES細胞から尿細管組織への分化が報告された。

しかし、腎臓は1種類の細胞だけでその機能を発揮したり、維持できる臓器ではないため、その他の細胞、特に腎機能の最も重要な機能を司る糸球体細胞の分化が重要であると思われる。ES細胞から糸球体細胞への分化は過去の報告で示唆はされるものの十分に証明はされていない。

そこで当研究室では糸球体細胞、尿細管細胞を含めた腎臓を構成する複数の細胞をES細胞から分化させることを目標として、過去のノックアウトマウスによる遺伝子解析や器官培養などの成果で、腎臓の発生に重要な遺伝子群とその機能が解明されつつあり、この知見をもとに、実際にES細胞から腎臓構成細胞を分化させる可能性が示唆されている腎臓の発生に重要な遺伝子をES細胞に導入し、強制発現することで、腎臓構成細胞や腎臓の幹細胞へ分化させることが可能であると考え、Pax2遺伝子に注目し、その遺伝子を導入したES細胞を確立した。この細胞を分化することで近位尿細管を分化できる可能

性があるが、実際に生体内で生着し、機能するかどうかは不明である。

本研究では、まず確立された遺伝子導入 ES 細胞を *in vitro* で培養、ある程度分化させた状態で、その細胞塊を複数の方法を用いマウス成体、特に腎臓に移植することで生着や、腎組織へ分化することを確認する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子導入 ES 細胞の確立と培養

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る。細胞系により feeder (足場) 細胞の必要な場合とそうでない場合があるが、前者を使用する時点では、薬剤耐性遺伝子を持ったトランスジェニックマウスより得た mouse embryonic fibroblast(MEF)を敷いたディッシュで培養する。MEF は妊娠 10~17 日目のマウスより無菌的に胎仔マウスより回収し、その内臓を摘出、トリプシン EDTA 溶液中でバラバラにした細胞片から遊離させる。5% CO₂、37°C、10% FCS 付加 DMEM 中で初代培養し、数回までの継代をして、ストックを確保しておく。一方、ES 細胞は継代により feeder 細胞不要の系となればそれを用いる。培養条件は 5% CO₂、37°C で、培養液は DMEM もしくは Glasgow MEM に 10% FCS、10⁻⁴M 2-メルカプトエタノール、non-essential aminoacid、1mM sodium pyruvate、1000U/ml LIF (leukemia inhibitory factor: ESGRO[®])を加えたものを使用する。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 10⁷ 個の細胞に対し 20 μg の Pax2 遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を用意し、electroporation 用キュベット (BIO-RAD Gene Pulser cuvette[®]) 内に混ぜ入れて、960 μF、250mV の条件で electroporation 法を行い、遺伝子を導入する。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 細胞のみが生着し選択される。

(2) 遺伝子導入 ES 細胞の分化実験

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、分化させる。5 日後に EB を再度ディッシュに付着させ、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 法を用い確認する。また細胞の形態変化なども評価する。また培養時は 3次元培養など様々な培養法を試

みる。当研究室で行った以前の検討では、EB を再度ディッシュに付着させて 5 日目~10 日目で aquaporin-1 の上昇を認めているので、この時期を目安に EB 自体 (0 日目)、5 日目、10 日目のように複数の時期で細胞塊を回収し、次の移植実験に準備する。

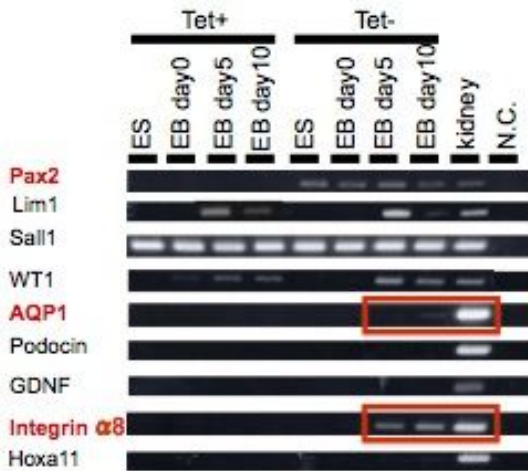
(3) Pax2 遺伝子導入 ES 細胞および EB の遺伝子発現の確認

回収した Pax2 遺伝子導入 ES 細胞、細胞塊をまず導入遺伝子自体が発現しているかどうかを RT-PCR 法を用い確認する。ディッシュに平面培養した ES 細胞を 0.25%トリプシン EDTA 溶液にて回収し、TRISol[®] およびクロロホルムにて 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。オリゴ dT プライマーおよび SuperScript II[®] 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 反応を行う。この時、遺伝子未導入 ES 細胞を対照とし、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 RT-PCR 法を用い確認する。

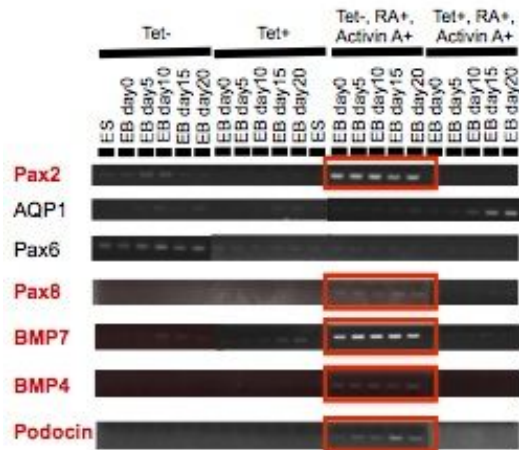
4. 研究成果

末期慢性腎不全に陥った場合、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が、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。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認することを試みた。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ビン 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 RT-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) アクチビン A・RA 非添加群で Pax2 遺伝子が発現させた EBs では、integrin α8 遺伝子 (間葉細胞に発現する接着因子) と aquaporin-1 遺伝子 (近位尿細管マーカー) 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) アクチビン 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)、Podcin 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。Pax2 遺伝子を強制発現させることで、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。さらに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された。



【図 1】



【図 2】

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 1 件)

- ① Nakane Akihiro, Kojima Yoshiyuki, Hayashi

Yutaro, Kohri Kenjiro, Masui Shinji, Nishinakamura Ryuichi: Pax2 overexpression in embryoid bodies induced upregulation of integrin α 8 and aquaporin-1. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 45:62-68, 2009

[学会発表](計 3 件)

- ① Nakane Akihiro, Nishinakamura Ryoichi, Mizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Maruyama Tetsuji, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Pax2 overexpression in embryoid bodies induces upregulation of genes with retinoic acid and activin a involved in kidney development. AUA 2011, 2011.5.14-19, Washington, USA
- ② Nakane Akihiro, Nishinakamura Ryuichi, Mizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Maruyama Tetsuji, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: PAX2 overexpression in embryoid bodies induces upregulation of Integrin α 8 and aquaporin-1 involved in kidney development. AUA 2010 Annual Meeting, 2010.5.29-6.3, San Francisco, USA
- ③ 中根 明宏、林 祐太郎、黒川 覚史、水野 健太郎、小島 祥敬、丸山 哲史、郡 健二郎: Pax2 遺伝子導入 ES 細胞からの尿細管細胞分化の基礎研究。第 59 回日本泌尿科学会中部総会、2009.10.29-31、金沢市

6. 研究組織

(1)研究代表者

畦元 将隆(AZEMOTO MASATAKA)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号:70264736

(2)研究分担者

水野 健太郎(MIZUNO KENTARO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号:70448710

中根 明宏(NAKANE AKIHORU)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号:70464568

郡 健二郎(KOHRI KENJIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号:30122047