

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08262

研究課題名（和文）アフリカツメガエルの強みを活かして、腎ネフロンセグメント化の仕組みを理解する

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism on nephron segmentation with *Xenopus laevis*

研究代表者

堅田 智久（Katada, Tomohisa）

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：10527229

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）：本研究では、腎ネフロンにおけるセグメント形成のしくみを明らかにするために、アフリカツメガエルを用いて、セグメント化に必要な遺伝子を同定することを目的とした。前腎誘導したアニマルキャップを用いて、受精から5時間、22.5時間、31.25時間、40時間、53.5時間経過したものを解析対象とし、発現遺伝子の比較解析をRNAシーケンスにより行った。アフリカツメガエルのデータベースであるXenbaseをもとに、19680遺伝子を対象として、転写因子および成長因子を候補因子の中心として、最終的に12種類の遺伝子を選定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎ネフロンの発生過程は、その構造的複雑さから解析が進んでいなかった。本研究では、構造が簡素なアフリカツメガエルのネフロンをモデルとして用いることで解析を容易にし、その知見がヒトをはじめとする哺乳類にも活かせることで、研究を促進する一助になったといえる。また、ネフロンの発生過程が明らかになれば、腎低形成や異形成に対する解明が進み、ネフロン発生期における疾患の原因究明にも役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The goal of this study is to identify genes involved in nephron segmentation in kidney development. *Xenopus laevis*, African clawed frog, was used as a model animal. To obtain cells on segmentation process, animal cap cells were cultured in the media including activin A and retinoic acid for 5-53.5 hours. To confirm kidney induction in animal cap cells, quantitative RT-PCR was performed on known markers of nephron segment, proximal, intermediate, distal and connecting tubule.

Using these cells, RNA sequencing was carried out to analyze gene expression in the various process of segment differentiation. Transcriptional factors and growth factors of 19,680 genes were screened based on Xenbase, *Xenopus laevis* database, to refer to expression domain of these genes. Finally, 12 genes were picked up as a candidate gene to induce segmentation of developing nephrons.

研究分野：発生生物学

キーワード：ネフロン セグメント アフリカツメガエル 腎臓

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓は体液量の調節を行う重要な臓器である。この調節は腎臓の構成単位であるネフロンが担っている。ネフロン発生の概略として、腎臓は中間中胚葉を起源とし、上皮化に続いて、近位-遠位極性が確立され、セグメント化が起こって成熟ネフロンとなる。このセグメント化により、体液成分を再吸収する輸送体タンパクが適切な位置に配置され、腎臓は機能を発揮する。

これまでの研究により、中間中胚葉の上皮化には、Wnt9b および Wnt4 が必要であること (Carroll et al., *Dev Cell*, 9: 283-292 (2005))、また近位-遠位極性の獲得には Notch シグナルが中心的な役割を持つことが明らかにされている (Cheng et al., *Development*, 134: 801-811 (2007); Surendran et al., *Dev. Biol.*, 337: 386-395 (2010))。しかしながら、セグメント化を制御する分子は未だ明らかにされていない。近年、HNF1 $\beta$  と mecom がそれぞれ近位側と遠位側のネフロン発生に必要なことが報告されたが、これらの知見はセグメント化を説明できていない (Heliot et al., *Development*, 140: 873-885 (2013); Li et al., *Dev. Biol.*, 386: 111-122 (2014))。従って、セグメント化に必要な因子を同定することはネフロン発生を理解する上で非常に重要である。

加えて、セグメント化がまだ十分に理解されていないのは、腎臓の構造の複雑さが原因として考えられる。例えば、ヒト腎臓は約 100 万個のネフロンを持つと言われており、その 1 つ 1 つの発生過程を追跡することは困難を極める。一方で、Raciti らは、ネフロンの構造と発生過程は、動物種を超えて保存されているという非常に興味深い論文を発表した (Raciti et al., *Genome Biol.*, 9: R84 (2008))。このことは、ネフロンのセグメント化を理解するためには、解析に都合が良い動物をモデルとして用いてよいことを示している。

発生学研究で多用されるアフリカツメガエル幼生の腎臓はネフロンを 1 個しか持っておらず、実体顕微鏡下でその発生の様子を観察することができる。このことは、構造が複雑なネフロンを解析対象とすると、強力な武器となる特徴である。

以上のようなことから、アフリカツメガエルの特性を活かして、ネフロンのセグメント化のしくみを解明することは意義があると考え、研究の着想と開始に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ネフロンのセグメント化に必要な分子を同定し、成熟ネフロンが確立される最後の段階のしくみを明らかにすることである。この研究により、腎発生異常に起因するさまざまな疾患の原因究明に寄与することが期待される。

## 3. 研究の方法

当初は、アフリカツメガエル胚に形成される腎臓原基をコントロールとして、尾芽胚期における前腎を構成するセグメントを外科的に直接切除し、これらの組織に発現している RNA を比較することでセグメント形成に関わる遺伝子を同定する予定であった。しかし、この方法では、余分な組織の混入が避けられず、発現遺伝子の解析結果に影響を与えることが懸念された。そこで、未分化外胚葉組織であるアニマルキャップ細胞を切除し、アクチビンとレチノイン酸を用いて、前腎組織を誘導し、これを解析サンプルとする方法を採用した。

発現遺伝子の解析には、RNA シークエンスを行った。

## 4. 研究成果

### (1) 解析サンプルの培養条件決定

アクチビンとレチノイン酸により前腎誘導したアニマルキャップは、まず近位尿細管が誘導され、その後、遠位尿細管が誘導される (Osafune et al., *Develop. Growth Differ.*, 44: 161-167 (2002))。このことから、胚発生中の前腎形成も、前腎誘導したアニマルキャップも同様な時間経過で分化すると予想した。しかし、セグメント形成に関与する遺伝子を同定するためには、尿細管を構成する各セグメントの遺伝子マーカーの発現開始時期を詳細に決定し、それを指標として、解析サンプルを決定する必要がある。

そこで、これまでの知見をもとに、尿細管の各セグメントに発現する代表的な遺伝子マーカーの選定を行った (表参照)。

これらの遺伝子マーカーについて、前腎誘導したアニマルキャップの発現時期をリアルタイム PCR により調べたところ、受精から 5 時間、22.5 時間、31.25 時間、40 時間、53.5 時間経



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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<br>Takada Masaru, Fukuhara Daisuke, Takiura Toshihiko, Nishibori Yukino, Kotani Masashi, Kiuchi Zentarō, Kudo Akihiko, Beltcheva Olga, Ito Nitta Noriko, Nitta Kazuhiro R., Kimura Toru, Suehiro Jun Ichi, Katada Tomohisa, Takematsu Hiromu, Yan Kunimasa | 4. 巻<br>37           |
| 2. 論文標題<br>Involvement of <sc>GLCC1</sc> in mouse spermatogenesis   | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>The FASEB Journal   | 6. 最初と最後の頁<br>e22680 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1096/fj.202101667RR   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Miyakawa Miho, Katada Tomohisa, Numa Yunosuke, Kinoshita Tsutomu                                  | 4. 巻<br>255                   |
| 2. 論文標題<br>Transcriptional regulatory elements of hif1 in a distal locus of islet1 in <i>Xenopus laevis</i> | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology                | 6. 最初と最後の頁<br>110598 ~ 110598 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.cbpb.2021.110598   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Tomohisa Katada and Hiroyuki Sakurai                                      | 4. 発行年<br>2021年 |
| 2. 出版社<br>Academic Press  | 5. 総ページ数<br>684 |
| 3. 書名<br>Factors Affecting Neurodevelopment Genetics, Neurology, Behavior, and Diet |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|