

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390228

研究課題名(和文) ネフロン幹細胞の維持機構解明による自己複製法の開発

研究課題名(英文) Mechanisms regulating the maintenance of nephron progenitors

研究代表者

西中村 隆一 (Nishinakamura, Ryuichi)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：70291309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：成体の腎臓は再生しない臓器であるが、胎児期の腎臓には前駆細胞が存在する。本計画は、胎児期ネフロン前駆細胞で働く分子ネットワークを解明することを目的とした。核内因子Sall1のネフロン前駆細胞特異的及び薬剤誘導性欠失マウスでは、胎生期に前駆細胞が枯渇する。これらを用いてSall1の直接の標的遺伝子群を同定した。そしてSall1が前駆細胞では正に、分化中のネフロンでは負に働いて、これらの細胞集団を未分化に維持することを解明した。この情報を元にネフロン前駆細胞の自己複製法を開発中である。通常は生後に消失するネフロン前駆細胞を未分化のまま維持できれば、腎臓再生に向けて大きな一歩となると期待される。

研究成果の概要(英文)：The adult kidney never regenerates, but the embryonic kidney contains nephron progenitors. The purpose of this project was to reveal molecular mechanisms underlying the maintenance of the embryonic nephron progenitors. We generated progenitor-specific and drug-inducible Sall1 mutant mice, and found that nephron progenitors were rapidly depleted upon Sall1 deletion. We identified the direct downstream targets of Sall1 and found that Sall1 functions as a positive regulator in the progenitors, while repressing aberrant gene expression in differentiating nascent nephrons. We are currently trying to establish a method to self-renew the progenitors, by utilizing the obtained information. If successful, it would serve as a basis toward kidney regeneration, because the nephron progenitors disappear shortly after birth in a normal condition.

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：腎臓学 腎臓発生 ネフロン前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

成体の腎臓は再生しない臓器であるが、胎児期の腎臓では、後腎間葉と呼ばれる組織から糸球体、近位及び遠位尿管などネフロンを構成する多系統の細胞が分化してくる。Sall1 は我々が単離した後腎間葉に発現する核内因子であり、そのノックアウトマウスは腎臓を欠損する (Nishinakamura et al., *Development* 2001)。この遺伝子座に GFP を導入したマウス (Takasato et al., *Mech. Dev.* 2004) から Wnt4 存在下にコロニーを作らせることにより、Sall1 が高発現した後腎間葉中に、1 個の細胞から糸球体、近位尿管、遠位尿管という多系統に分化するネフロン前駆細胞が存在することを証明した (Osafune et al., *Development* 2006)。一方 Harvard の McMahon らは、転写因子 Six2 に着目して、多分化能をもつネフロン前駆細胞の存在を *in vivo* で確認し、それが胎生期には自己複製している可能性を示した (Kobayashi et al., *Cell Stem Cell*, 2008)。しかしネフロン前駆細胞は生直後に完全に分化して消失してしまう。このネフロン前駆細胞を未分化なまま維持できれば、腎臓再生に向けた大きな基盤となると考え、本計画を立案した。

2. 研究の目的

上記の様に我々は、後腎間葉に発現する核内因子 Sall1 が腎臓発生に必須であること、間葉中の Sall1 を高発現する集団に多能性のネフロン前駆細胞が存在することを明らかにした。そこで本計画は、Sall1 の遺伝子改変マウスを用いて、胎児期ネフロン前駆細胞で働く分子ネットワークを解明することを第一の目的とした。そしてその情報を使って、通常は生後に消失するネフロン前駆細胞を未分化なまま維持する方法を開発することも目的の一つとした。

3. 研究の方法

以前に作成した Sall1 の flox マウス (Yuri et al., *Stem Cells* 2009) と Six2Cre マウスを交配することによって、ネフロン前駆細胞特異的 Sall1 欠失マウスを作成した。また Sall1CreER マウス (Inoue et al., *Genesis* 2010) と Sall1 の flox マウスを交配して、薬剤 (タモキシフェン) 誘導性 Sall1 欠失マウスも作成した。これらの表現型解析を行うとともに、胎生期腎臓を使ってマイクロアレイを行い、Sall1 の下流遺伝子候補群を同定した。さらに全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) を行い、直接の下流を同定した。加えて Sall1 の C 端に Flag タグを挿入したマウス (Sall1 Flag) を作成し、Sall1 と複合体を形成する蛋白群を免疫沈降によって同定し、ネフロン前駆細胞の維持に関わる分子ネットワークの解明を目指した。

4. 研究成果

(1) ネフロン前駆細胞特異的 Sall1 欠失マウスは、出生直後に死亡した。腎臓は小さくなり、ネフロンもほぼ消失していた。ネフロン前駆細胞の自己複製能が低下して分化してしまい、さらにその分化した初期ネフロンも細胞死を起こしてしまうためであった (図 1)。つまり Sall1 はネフロン前駆細胞の自己複製と維持に必須であった。また薬剤誘導性 Sall1 欠失マウスの胎生 12.5 日にタモキシフェンを投与すると 1 日で Sall1 が消失し、最終的に同じ症状になることを確認した。

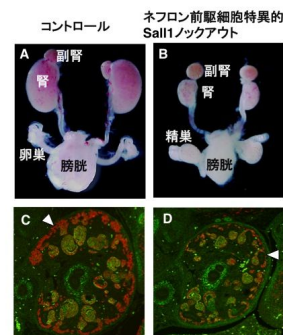


図 1

ネフロン前駆細胞特異的に Sall1 をノックアウトすると腎臓は小さくなり (B)、ネフロン前駆細胞が枯渇する (D: 矢尻の赤い細胞)。A, C は正常マウス。

(2) 上記 2 種のマウスに共通して変動する遺伝子群をマイクロアレイで探索した結果、Sall1 がネフロン前駆細胞においては下流遺伝子の転写を促進して未分化状態を維持し、分化中の初期ネフロンでは異常な転写を抑制して正常な状態を保つことを見いだした。さらに全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) を駆使することによって、ネフロン前駆細胞において Sall1 が Six2 とともに、重要な腎臓形成遺伝子群の制御領域に直接結合することを明らかにした (図 2)。一方、Six2 が存在しない初期ネフロンにおいては、Sall1 は Mi2/NuRD 複合体と結合して転写を抑制するが、この標的遺伝子は Six2 のそれとは異なり、かつ制御領域への直接結合を介さないことも判明した。これは制御領域に直接結合して Sall1 をリクルートする別の因子の存在を示唆している。

このように Sall1 はネフロン前駆細胞では活性化因子、初期ネフロンでは抑制因子として、この 2 つの未熟な細胞集団を維持していることを明らかにした (Kanda et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014)。

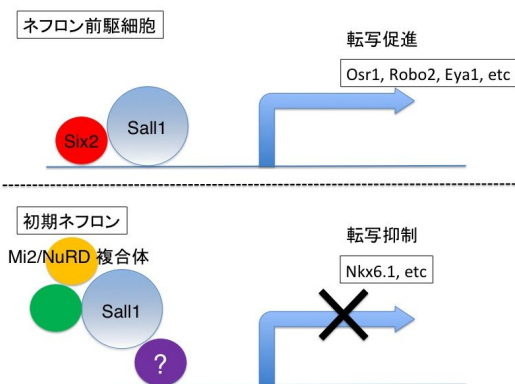


図 2

ネフロン前駆細胞において、Sall1 は Six2 とともに腎臓形成遺伝子群 (Osr1, Robo2, Eya1 等) を直接活性化する。一方、初期ネフロンにおいては Mi2/NuRD 複合体と結合して、間接的に標的遺伝子 (Nkx6.1 等) を抑制する。

(3) 本研究は、2001年に報告 (Nishinakamura et al., *Development* 2001) して以来不明であった Sall1 の分子機構を解明した集大的成果である。これらの知見、特にマイクロアレイのデータは、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞からのネフロン前駆細胞の誘導法開発 (Taguchi et al., *Cell Stem Cell* 2014) において有用な手がかりとなった。また今回の研究で得られたネフロン前駆細胞の維持機構に関する知見を用いて、ネフロン前駆細胞を人為的に増幅する技術の開発を進めている。通常は生後に消失するマウスネフロン前駆細胞を未分化のまま維持できれば、iPS 細胞から誘導したヒトネフロン前駆細胞にも応用できる可能性があり、腎臓再生に向けて大きな一歩となると期待される。

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 2 件)

Kanda S, Tanigawa S, Ohmori T, Taguchi A, Kudo K, Suzuki Y, Sato Y, Hino S, Sander M, Perantoni AO, Sugano S, Nakao M, and Nishinakamura R*. Sall1 maintains nephron progenitors and nascent nephrons by acting as both an activator and a repressor *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014 Apr 17 [Epub ahead of print] doi: 10.1681/ASN.2013080896 査読有

Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, and Nishinakamura R*. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell** 14(1): 53-67, 2014. doi: 10.1016/j.stem.2013.11.010. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

西中村 隆一 転写因子 Sall1 はネフロン前駆細胞の維持に必須である 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月5日、神戸ポートアイランド(兵庫)

西中村隆一、太口敦博 腎臓の起源同定に基づく幹細胞からの腎臓誘導法の開発 第119回日本解剖学会総会シンポジウム 2014年3月29日 自治医科大学(栃木県下野市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学発生医学研究所腎臓発生分野

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/integrative_cell_biology/

熊本大学発生医学研究所 New Press

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np70.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西中村 隆一 (NISHINAKAMURA, Ryuichi)

熊本大学発生医学研究所・教授

研究者番号：70291309

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：