

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592436

研究課題名(和文) 遺伝子導入ES細胞を分化誘導しFACSを用いた腎再生メカニズムの解明と臨床応用

研究課題名(英文) The investigation of the mechanism about the kidney generation using embryonic stem cells with inducible gene expression by assessment of FACS, and the application to kidney regeneration medicine

研究代表者

中根 明宏 (Nakane, Akihiro)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70464568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

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 8、aquaporin-1、BMP7、Ret、Pax8、Podcinの発現亢進を認めた。分化したES細胞を免疫染色で確認できたaquaporin-1とPax2で二重標識してFACSを行ったところ、標識された細胞分画の増加を確認できた。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 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 cells that expressed aquaporin-1 and Pax2 increased by analysis of the FACS cell sorting. ES cell lines with inducible Pax2 expression may be useful for dissecting genetic cascades functioning in the development of various organs, including the kidney.

研究分野：泌尿器科

キーワード：再生医療 胚性幹細胞 FACS 遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

我々が治療に携わってきた疾患にておいて、先天的尿路奇形、特に尿道下裂、停留精巣、腎盂尿管移行部狭窄症、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を感じる場面があった。そこで、私たちは 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回復させたり、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。その中で先天的尿路奇形などにおいて形成は行う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ため、腎組織自体の再生を行うことの必要性を痛感した。また、末期腎不全から血液透析を行っている患者数は、平成 21 年の推計で約 30 万人と増加し続けていた。本邦では透析患者の長期予後も良く、成功した治療といえるが、患者の日常生活への負担や、年間約 1 兆円以上の医療費が問題視されている。また根本的治療の腎移植はドナーが不足していた。よってこれら諸問題の解決策の 1 つとして腎臓の再生医療の開発が求められていると考えられた。

近年の再生治療が置かれる状況としては、網膜、皮膚、軟骨、神経、心筋など比較的構造の簡単な単一細胞が主体を占める臓器においては臨床応用され始めていた。しかし腎臓においては、発生過程や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伴う再生医療の研究が他の臓器に比べ立ち遅れていた。ノックアウトマウスで腎臓を欠損する *Sall1* 遺伝子の高発現細胞から器官培養すると糸球体や尿細管を構成することが報告されていたが、成体で、この細胞は消失してしまい、再生医療として応用できるところまでは進んでいなかった。

一方で、私たちはマウス 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した。しかし、その他の腎機能を改善させる為に必要な細胞、特に糸球体については有用な報告は未だなかった。本邦の研究者らから iPS 細胞の樹立が報告された。この細胞は ES 細胞と同等の未分化能と万能性を有する細胞で、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た。再生医療を実現できる可能性が広がったと考えられる。ES 細胞を用い、組織や臓器を再生させることができた場合、その研究成果は iPS 細胞で応用できると考えられた。

以上から、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になると考えられた。まず腎臓の発生の知識から腎再生の方法を模索することから始めた。複数の腎臓の発生

に関連する遺伝子の解析は器官培養やノックアウトマウスの解析で行われているが、腎発生初期で後腎間葉に発現する Pax2 遺伝子に注目した。この遺伝子が欠如すると腎臓発生がされず胎児死することがマウス、ニワトリなどの動物実験で確認されていた。またこの遺伝子は、その他の腎臓の発生に関係する遺伝子群の上流にあることが示されていた。そこで、この遺伝子を導入した ES 細胞を利用し、腎臓の再生医療に生かすことに取り組んできた。現在まで、Pax2 遺伝子導入 ES 細胞から尿細管に発現する AQP1 蛋白陽性の細胞が分化できることを証明し報告し、さらに培養条件により糸球体細胞のマーカーである Podcin の発現増加も確認されている。これらの知見を発展させ、今後は生体内への移植を行い腎組織の形成を試みることを考えた。

2. 研究の目的

私たちは、様々な腎尿路疾患で失われた臓器の治療法を確立するために、組織再建、細胞培養、特にすべての胚葉に分化可能な胚性幹細胞 (ES 細胞) の研究を行ってきた。その中で非常に複雑な構造と多くの細胞群により構成されるが、自己では再生しない腎臓を再生することを試みた。筋肉、軟骨、骨髄血液細胞、神経、脾臓、肝臓において ES 細胞から分化できることが証明されており、その中で腎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、本研究室以外からも 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。本研究において、腎・尿管発生に重要な働きをしている遺伝子である Pax2 に着目し、この遺伝子導入した ES 細胞を作製し、そこから腎構成細胞を分化させることを考えた。その際に問題となるのが、ES 細胞をそのまま生体に移植すると teratoma (奇形種) を形成するため、すべての胚葉の成分が混在した組織となってしまう腎臓を形成することはできない点であった。

本研究では、まず確立された Pax2 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、FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) を行うことで未分化な ES 細胞を除去することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Pax2 ES 細胞の培養

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) 細胞が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℃、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℃ 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 遺伝子を組み込んであるプラスミド 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細胞のみが生じ選択する。

(2)Pax2 ES 細胞の分化

作製した 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。EB 自体(0日目)、5日目、10日目の複数の時期で細胞塊を回収する。

(3)RT-PCR による発現遺伝子の確認

ディッシュに平面培養した ES 細胞および EB を 0.25%トリプシン EDTA 溶液にて回収し、TRISol[®]、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。回収した Pax2 ES 細胞および EB にまずは Pax2 遺伝子が発現しているかどうかを RT-PCR 法を用い確認する。Oligo dT primer、SuperScript[®] 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 反応を行い、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 SYBR[®] green による定量 PCR 法を用い確認する。

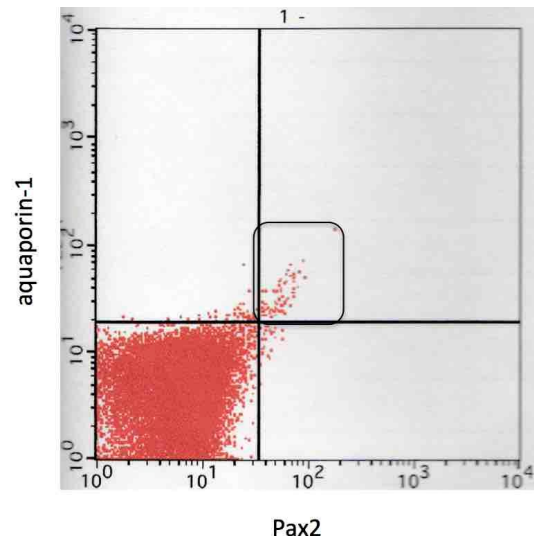
(4)腎構成細胞の抽出

Pax2 抗原で Pax2 陽性細胞を標識し、また近位尿管マーカーである aquaporin-1 の抗原を標識した、二重標識により FACS を行う。

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立することを試みた。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 PCR 法により評価した。さらに、糸球体や尿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 遺伝子を発現させた EBs では、integrin 8 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。

そこで、免疫染色で確認可能であった、aquaporin-1 を用い、アクチビン A・RA 非添加の条件下で分化させた Pax2 遺伝子を発現させた EBs を Pax2 と aquaporin-1 で二重標識し、FACS を行ったところ、両者の陽性細胞の増加を確認することができた。



これらの結果から、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できると考えられた。

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)

Tanaka SS, Nakane A, Yamaguchi YL, Terabayashi T, Abe T, Nakao K, Asashima M, Steiner KA, Tam PP, Nishinakamura Ryuichi: Dullard/Ctdnep1 modulates WNT signaling activity for the formation of primordial germ cells in the mouse embryo. PLoS One, 8(3):e57428, 2013, 査読あり, doi: 10.1371/journal.pone.0057428.

〔学会発表〕(計 2 件)

中根 明宏、水野 健太郎、丸山 哲史、林 祐太郎、郡 健二郎: Pax2 遺伝子導入 ES 細胞における腎構成細胞への分化のメカニズム解析。第 63 回日本泌尿器科学会中部総会、2013.10.28-30、愛知県産業労働センター(愛知県・名古屋市)
中根 明宏、林 祐太郎、田中 聡、西中村 隆一: 始原生殖細胞発生に必須な新規遺伝子 Dullard の機能解析 —ノックアウトマウスでの検討—。第 23 回日本小児泌尿器科学会総会、2014.7.9-11、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

丸山 哲史(MARUYAMA TETSUJI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 50305546

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

林 祐太郎(HAYASHI YUTARO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 40238134

郡 健二郎(KOHRU KENJIRO)
名古屋市立大学・その他部局等・学長
研究者番号: 30122047

(3)連携研究者 なし