

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670413

研究課題名(和文)ネフロン誘導能をもつ機能的尿管芽を創る

研究課題名(英文)Creating the ureteric bud with a nephron-inducing potential

## 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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前に多能性幹細胞からネフロン前駆細胞を誘導し、腎臓組織の試験管内構築に成功した。しかし腎臓形成にはネフロン前駆細胞と尿管芽の相互作用が必須である。よって本計画は、ネフロン誘導能をもつ尿管芽を未分化細胞から試験管内で分化させることを目的とした。遺伝子改変マウスを用いて尿管芽の各分化段階におけるマーカーを同定したので、これを指標にして胎生初期の中胚葉から尿管芽への誘導を試みた。さらに上記マウスから胚性幹(ES)細胞を樹立したので、これを尿管芽へ誘導することを目指している。

研究成果の概要(英文)：We previously succeeded in generating the kidney tissues in vitro by inducing nephron progenitors from pluripotent stem cells. However, the kidney is formed through the mutual interactions between the nephron progenitors and the ureteric bud. Therefore this project aims at differentiating uncommitted precursors toward the functional ureteric bud that possesses a nephron-inducing potential. We utilized genetically modified mice and identified several signature genes that represent the developmental stages during ureteric bud formation. By using these markers, we tried to induce the ureteric bud from the mesoderm in early stage embryos. In addition, we established the embryonic stem cells from the mice described above, and are trying to induce these cells toward the ureteric bud lineage.

研究分野：腎臓発生

キーワード：腎臓発生 尿管芽 ネフロン

## 1. 研究開始当初の背景

腎不全による人工透析患者数は増加する一方で 31 万人となり、その医療費は年間 1 兆円を越えている。腎移植が腎不全の唯一の根治的治療だが、ドナー不足に悩まされている。このような現状の一方で、腎臓のような 3 次元臓器を作ることは極めて困難とされてきた。腎臓を作るには腎臓がどうやって発生するかを知ることが必要である。

腎臓は後腎間葉と尿管芽という二つの胎児組織の相互作用によって形成され、前者から糸球体や尿細管というネフロン(腎臓の最小機能単位)が作られる。我々はカエル及びマウスを用いて、後腎間葉に発現する核内因子 Sall1 が腎臓発生に必須なこと(Nishinakamura et al., Development 2001)、後腎間葉中に Sall1 陽性の多能性ネフロン前駆細胞が存在することを報告してきた(Takasato et al., Mech. Dev. 2004, Osafune et al., Development 2006)。このネフロン前駆細胞は発生初期の中間中胚葉に由来するとされてきた。しかし我々は、ネフロン前駆細胞が実は胎児後端部に存在する特殊な細胞集団に由来することを見いだした。そこで、マウス胎仔からこの細胞集団を採取し試験管内で培養することによって、ネフロン前駆細胞まで分化誘導することに成功した。これをもとに、マウス ES 細胞からネフロン前駆細胞を誘導する計 5 ステップの培養法を確立した。このネフロン前駆細胞は、試験管内で多数の糸球体および尿細管を形成することができた。さらにヒト iPS 細胞からも、ほぼ同じプロトコルを用いて、3次元の糸球体および尿細管構造を高効率に誘導することに成功した(Taguchi et al., Cell Stem Cell 2014)。18 年を費やして得られたこれらの成果は、試験管内でのヒト疾患の病態再現に貢献するとともに、多能性幹細胞から腎臓そのものの構築につながることを期待される。

しかし腎臓形成はネフロン前駆細胞単独で起こるわけではなく、尿管芽との相互作用が必須である。尿管芽は自身が分岐しながら FGF9 を分泌し、ネフロン前駆細胞を未分化に維持したまま増殖させる。同じく尿管芽から分泌される Wnt9b は、ネフロン前駆細胞をネフロンへと分化させる働きをもつ。この未分化性維持と分化のバランスが、腎臓をより大きくかつ秩序正しく分化させる鍵である。

## 2. 研究の目的

上記のように、腎臓形成にはネフロン前駆細胞と尿管芽との相互作用が必須である。よって本計画は、複雑な分岐能とネフロン誘導能をもつ機能的尿管芽を未分化細胞から試験管内で分化させることを目的とした。

ES/iPS 細胞からのネフロン前駆細胞の誘導を多くの研究者が試みたが、我々が世界に先んじて成功した理由は、マウスを用いてネフロン前駆細胞の各発生段階のマーカーを同定し、かつ機能的アッセイを利用したこと、そしてネフロン前駆細胞の正しい起源を解明したことである。同様のアプローチによって尿管芽の誘導を目指す。これが成功すれば、ネフロン前駆細胞と組み合わせることによって、試験管内で腎臓を創るという目標に向けて大きく前進することが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 尿管芽発生における遺伝子発現変化の同定

尿管芽及びそれが由来するウルフ管が蛍光発色する GFP マウスから FACS によって GFP 陽性細胞を単離する。胎生期 9.5 日(中腎管形成期), 10.5 日, 11.5 日(尿管芽形成期)から採取し、PCR 及びマイクロアレイによって、各発生段階の遺伝子発現プロファイルを明らかにする。その際、GFP 陽性分画を部位別

に採取して、より細かい遺伝子発現を解析する。これらによって、尿管芽の発生に伴う主要シグナル因子の変化を見いだす。

#### (2) 尿管芽細胞を検出できる高感度コロニーアッセイの確立

GFP マウスから GFP 陽性細胞を採取し、培養系に投入して蛍光を持続するコロニーを形成させる。このコロニーが *in vivo* の尿管芽の分化を忠実に再現するかを、未分化マーカー (Ret, Wnt11 など) と分化マーカー (トランスポーターなど) の発現で確認する。また GFP 陽性細胞を部位別にこのアッセイに投入することによって、このコロニーが尿管芽及び中腎管のどの部分から由来するかを明らかにする。その上で、1 個の尿管芽細胞でも検出できるよう、培養条件の最適化を行う。

(3) 初期中胚葉から尿管芽への誘導法の開発  
まだ GFP が発現していない胎生 8.5 日から中胚葉細胞を培養した後、遺伝子発現を調べるとともに、コロニーアッセイに投入し、GFP 陽性率とコロニー形成能を指標に培養条件を検討する。基本培地はネフロン前駆細胞誘導で用いたものを使用し、(1) で同定した主要シグナル因子の変化を参考にして、培養条件を改善する。

#### (4) ES 細胞から尿管芽への誘導

GFP ES 細胞を上述のマウスの着床前の胚盤胞から樹立する。その ES 細胞から初期中胚葉を経由して、尿管芽へと誘導する。検定には、遺伝子発現とコロニーアッセイを使用する。

#### (5) ネフロン誘導能検定系の立ち上げ

機能的尿管芽誘導のためには、コロニー形成能とネフロン誘導能が良く相関するかを確認する必要がある。ポジティブコントロールとして胎生 11.5 日から採取した尿管芽細胞

を、解離後再凝集し、後腎間葉を隣接させて器官培養することによって、3 次元構造が形成され、間葉からネフロンが誘導されるかを検討する。切片を各種のネフロン分化マーカーで染色して検定する。

#### (6) 誘導した尿管芽のネフロン誘導能検定及び 3 次元構造構築

上記のアッセイ系に初期中胚葉あるいは ES 細胞から誘導した尿管芽を投入して、ネフロン誘導能を獲得しているかを検定する。これらによって腎臓の 3 次元構造の再構築にむけた基盤を確立する。

### 4. 研究成果

#### (1) 尿管芽発生における遺伝子発現変化の同定

GFP マウスから FACS によって GFP 陽性細胞を単離してマイクロアレイで解析し、ウルフ管から尿管芽に向けた各分化段階におけるマーカー遺伝子群及び各段階におけるシグナル分子の違いを同定した。

#### (2) 尿管芽細胞を検出できる高感度コロニーアッセイの確立

GFP マウスから GFP 陽性細胞を採取し、培養系を改善することによって、蛍光を持続したままコロニーを形成させることができた。興味深いことに、複数種のコロニーが形成され、それが尿管芽における解剖学的部位の違いと必ずしも相関がなかった。それぞれの部位がさらに不均一な集団であることを示唆しているかもしれない。1 個の尿管芽細胞でも検出できるような、培養条件の最適化はまだ達成されていない。

(3) 初期中胚葉から尿管芽への誘導法の開発  
コロニーアッセイと遺伝子発現を指標にして、各ステージの GFP 陽性細胞から尿管芽の

誘導を試みた。すべてのマーカーの発現レベルが生体と同じにする条件を見出すのが困難で、依然検討中である。

#### (4) ES 細胞から尿管芽への誘導

GFP マウスの胚盤胞から ES 細胞の樹立を試みた。最初に樹立したクローン群は、ネフロン前駆細胞への分化能が低かったため、再度単離し直した。その結果、良好な分化能をもつ ES 細胞を単離できた。

#### (5) ネフロン誘導能検定系の立ち上げ

胎生 11.5 日から採取した尿管芽細胞を、解離後再凝集させ、さらに後腎間葉を隣接させることによって、ある程度ネフロンが誘導される条件を見出した。

#### (6) 誘導した尿管芽のネフロン誘導能検定及び 3 次元構造構築

まずは初期中胚葉から尿管芽への誘導を成功させることが必須である。その後マウス ES 細胞、次いでヒト iPS 細胞からの誘導を目指す。そして既に関済済みのヒトネフロン前駆細胞誘導法を組み合わせることによって、より生体に近い腎臓を試験管内で作成したい。

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Nishinakamura R. Programming stem cells toward the kidney. 13<sup>th</sup> Workshop on Developmental Nephrology. July 15, 2015 Salt Lake City, Utah, USA.

太口敦博、西中村隆一 細胞自律的かつ相互依存的な腎臓の形態形成過程の再現と応用への課題 第 15 回日本再生医療学会総会 2016 年 3 月 19 日、大阪

〔図書〕(計 1 件)

Nishinakamura R and Taguchi A. From development to regeneration: Kidney reconstitution in vitro and in vivo. (Chapter 34) In: Kidney development, disease, repair, and regeneration (edited by Melissa H Little) Academic Press 2015: 463-472

〔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

発生医学研究所腎臓発生分野

[http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya\\_top/kidney\\_development/](http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/kidney_development/)

### 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 なし

#### (3) 連携研究者 なし