

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462440

研究課題名(和文) 中腎管コンピテンシ維持におけるFgf9/Sox9発現機構と間葉シグナル動態

研究課題名(英文) Mechanism of Fgf9 and Sox9 expression, and mesenchymal signal dynamics in the maintenance of Wolffian duct competence

研究代表者

城倉 浩平 (Johkura, Kohei)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：30303473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、次の3点を明らかにした。1) 中腎管間葉に発現する成長因子について、BMP4が中腎管のFgf9、Sox9発現を有意に低下させ、BMP2、BMP7、WNTの影響は小さい。2) 中腎管の転写因子発現に関して、FGF9がSox9のみならずPax2、Lhx1、Hnf1b、Emx2等の発現を培養条件下で維持し、BMP4がこれに対し抑制的に作用する。3) 中腎管から尿管芽への分化に伴う線維芽細胞増殖因子の遺伝子発現変化を解析し、培養条件下で腎管系の応答性を促進するFGF1、FGF7、FGF9に注目した場合、後腎発生初期では間葉のFgf9とFgf1の発現量が逆転する。

研究成果の概要(英文)：1) Gene expression of growth factors was examined in Wolffian duct mesenchyme. Among the factors detected, BMP4 decreased the expression of Fgf9 and Sox9 in Wolffian duct. Other factors such as BMP2, BMP7, and WNT had little effect on their expression. 2) Concerning the transcription factors involved in Wolffian duct development, FGF9 maintained not only the expression of Sox9 but also that of Pax2, Lhx1, Hnf1b, and Emx2. BMP4 suppressed this effect of FGF9. 3) The expression of canonical FGF family was analyzed in nephric duct development from Wolffian duct to ureteric bud. Among FGFs that support the developmental competence of nephric duct in culture, i.e., FGF1, FGF7 and FGF9, the expression of Fgf9 was decreased, whereas that of Fgf1 was increased in the metanephric mesenchyme as compared with Wolffian duct mesenchyme in the early stage of metanephric kidney development. Expression of Fgf7 in the mesenchyme was low during this stage.

研究分野：腎臓の発生・再生

キーワード：中腎管 分化応答性 線維芽細胞増殖因子 骨形成因子 転写因子 尿管芽 中腎管間葉 後腎間葉

1. 研究開始当初の背景

我が国の慢性腎不全患者数の増加は著しく、腎臓再生医療への取り組みは急務である。傷害器官の再生には発生メカニズムを応用することが有用と考えられる。

腎臓(後腎)は二つの前駆組織、中腎管と後腎間葉の相互誘導により発生する。後腎間葉が分泌するグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)が、中腎管の受容体型チロシンキナーゼRETに結合して応答が起こり、尿管芽が形成されることで腎臓の発生が開始する。尿管芽が分枝を繰り返しながら後腎間葉をネフロンへ誘導し、両者が接続する。このように、後腎の発生には中腎管が必須である。

筆者は、腎臓の発生・再生研究を主体的に推進し、マウス発生腎移植やES細胞由来中腎管様組織の先行研究を通して、腎臓組織の再生には“前駆組織間の相互誘導を利用して腎管系を伴うネフロン新生を図る”ことが有用であるという着想に至った。

中腎管細胞の後腎間葉(GDNF)に対する応答能を維持することは、腎臓の再生・組織工学研究の細胞供給として極めて有用と考えられる。そのためには発生過程で中腎管が如何にして維持されているかを知ることが不可欠であり、中腎管とその間葉との相互作用の解明が鍵となる。

これに関して筆者は、中腎管組織に主に発現する線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリーのうち、FGF9が中腎管の分化応答性に対し促進的に働くことを見出した。FGF9は中腎管の細胞生存、増殖、Ret発現を支持し、自らの発現と共にSox9発現を促進した。このことから、精巣発生で報告されているFGF9/SOX9フィードバックループ機構(文献)が中腎管にも存在し、これによりFgf9発現が維持され、間葉との相互作用を通して応答性が維持される可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、発生組織を用いて、FGF9シグナルを基軸とする中腎管応答能維持機構の解明を目的とする。中腎管のFgf9発現における転写因子SOX9の働きと、FGF9に対する間葉応答の詳細を明らかにする。これにより腎臓の上皮系原基を支える機構を解明し、腎臓・尿管再生研究の基盤を得る。

3. 研究の方法

(1) 動物・組織： 材料としてラット胎児の中腎管組織と後腎組織を用いた。ラットではおよそ胎生12日に、中腎管から尿管芽が発芽して後腎間葉へ侵入を開始し、およそ13日では、尿管芽の最初の分枝が起こり、双葉の状態になる。

胎生12日の中腎管から中腎管とその間葉を、後腎から後腎間葉を、マイクロダイセクションにより採取した。胎生13日の中腎管から同様に中腎管と間葉を採取し、後腎は0.05%トリプシンで37℃、10分間処理して尿管芽と後腎間葉に分離した。

(2) 遺伝子発現解析： 中腎管とその間葉、尿管芽と後腎間葉から、それぞれRNAを採取し、リアルタイムPCR法で成長因子、受容体、転写因子等の遺伝子発現解析を行った。尿管芽では先端部のみの遺伝子発現を解析した。各組織に発現する主要な因子を検出し、発生過程での変化を調べた。

(3) 組織培養： 採取した組織の培養を行った。中腎管をマトリゲルに包埋し、DMEM/F12, 10% FBS, 125 ng/ml FGF9で培養した。中腎管間葉をトランスウェルフィルター上に置き、DMEM/F12, 10% FBSで18時間培養した。遺伝子発現解析で発現が確認された成長因子を培養系に添加し、遺伝子発現の変化を解析した。成長因子シグナルのアンタゴニスト、中和抗体、阻害剤等を添加してシグナルをブロックし、遺伝子発現に対する効果を調べた。

(4) 尿管芽誘導： 中腎管をフィルター上で器官培養し、GDNF(50-125 ng/ml)を添加して尿管芽形成を誘導した。免疫組織化学等で評価した。

(5) 組織再構成： 培養した中腎管と新たに採取した胎生13日後腎間葉をフィルター上で共培養し、上皮間葉相互作用による分化誘導を行った。尿管芽分化とネフロン誘導を免疫組織化学等で評価した。

4. 研究成果

(1) 間葉に発現する成長因子が中腎管のFgf9, Sox9発現に与える影響

胎生12日と13日の中腎管間葉に発現する成長因子のうち、骨形成因子(BMP)ファミリーとWNTファミリーについて遺伝子発現解析を行い、Bmp2, Bmp4, Bmp7, Wnt2b, Wnt4等の発現を確認した。

中腎管間葉の培養にFGF9を添加すると、Bmp2, Bmp4, Wnt2b, Wnt4の発現が抑制された。Bmp7発現には変化がなかった。

一方、これら成長因子を中腎管の培養に添加した結果、BMP4が中腎管のFgf9発現を低下させ、またRet, Ccnd1, Sox9等の発現を低下させた。中腎管のFgf9発現に対するBMP2, BMP7, WNT2b, WNT4の効果は、ほとんど無いか軽微であった。これらのことから、間葉のBMP4と中腎管のFGF9は、互いの遺伝子発現を抑制する関係にあることが示唆された。

中腎管培養にSmad1/5/8経路阻害剤

(Dorsomorphin) を添加して BMP シグナルをブロックすると、BMP4 による中腎管の Fgf9 発現低下は有意に回復したが、Sox9 発現低下は回復が認められなかった。これにより、BMP4 による中腎管の Fgf9 発現抑制には Smad1/5/8 経路が関与し、Sox9 発現抑制には別の経路が関与する可能性が示唆された。

(2) FGF9 および BMP4 が中腎管の転写因子発現に与える影響

FGF9 で中腎管を 10 日間培養し、転写因子発現に対する作用を検証した。培養期間を通して FGF9 は中腎管の Sox9 発現を維持した。また、主要な発生関連転写因子である Ctnnb1, Tp53, NF- κ B p65, Gata3, Pax2, Lhx1, Hoxb7, Emx2, Hnf1b 等についても発現を維持した。

BMP4 は、中腎管の GDNF に対する応答性を抑制することで、異所性の尿管芽形成を抑えることが報告されているが(文献)、その機構は十分には解明されていない。中腎管の応答性抑制における BMP4 の作用機序を明らかにするために、中腎管の転写因子群の遺伝子発現に対する BMP4 の影響を調べた。

FGF9 を用いた中腎管培養に BMP4 を添加すると、Sox9 のみならず Pax2, Lhx1, Hnf1b, Emx2 等の転写因子発現が有意に低下した。このうち Hnf1b, Emx2 発現は Dorsomorphin で有意に回復し、Smad1/5/8 経路による制御を受けることが示唆された。

GDNF 存在下での中腎の器官培養(尿管芽誘導培養)に BMP4 を添加すると、尿管芽形成は強く抑制された。逆に、BMP アンタゴニスト、中和抗体、Dorsomorphin 等を添加して中腎組織内在性 BMP4 の働きを抑制すると、尿管芽形成は促進傾向が認められた。これにより、BMP4 が中腎管の分化応答性に対し抑制的に働くことが改めて確認された。

中腎の器官培養(中腎管と間葉を温存した培養)に BMP4 を添加すると、中腎管は狭小化し、免疫組織化学解析において、上皮細胞核の HNF1b 染色は対照に比べ減弱が認められた。

間葉の BMP4 による中腎管の分化応答性抑制機構には、Ret, Fgf9, Sox9 の遺伝子発現低下のみならず、腎臓発生に必須とされ、GDNF に対する応答性を支持すると考えられる Pax2, Lhx1, Emx2, Hnf1b 等の転写因子の発現制御が含まれる可能性が示された。

中腎管の発生に与る遺伝子カスケードでは、Hnf1b が Pax2 や Lhx1 の上流に位置し、これらの発現を制御することが報告されている(文献)。また尿管芽では、Emx2 が Pax2, Lhx1, Ret 発現を制御するという報告がある(文献)。間葉の BMP4 による中腎管の Hnf1b,

Emx2 の発現抑制が、Ret, Pax2, Lhx1 等の中腎管発生関連因子の低下をもたらすと予想される。BMP4 による Sox9 の発現低下に、これら転写因子の発現低下がどのように関係するのかが明らかではなく、さらに調べる必要がある。

(3) 尿管芽への分化に伴う遺伝子発現変化

腎管系分化の中での中腎管の特徴を明確にするために、中腎管の FGF シグナル関連因子の遺伝子発現に関して、尿管芽との比較を行った。間葉についても、中腎管間葉と後腎管間葉で比較した。

胎生 12 日中腎管と 13 日尿管芽先端部の比較では、Fgf9 発現に差は認められなかったが、間葉では、12 日の中腎管間葉に比べ後腎管間葉で Fgf9 発現が低下し、13 日の後腎管間葉ではさらに低下した。また、FGF の受容体 7 種のうち、FGF9 が主に活性化する受容体 FGFR2c, FGFR3b, FGFR3c の上皮での遺伝子発現は、12 日中腎管に比べ 13 日尿管芽先端部で低下傾向が認められた。後腎発生初期において、中腎管から尿管芽への分化過程で、Fgf9 発現量は上皮では変化しないが、間葉においては低下し、上皮の受容体発現も低下することが明らかになった。

腎管系上皮の分化応答性に対し促進作用が知られている他の FGF についても同様の比較を行った。Fgf7 は間葉のみに発現していたが、中腎管間葉と後腎管間葉のいずれにおいても低値であった。Fgf1 は特に間葉で上昇が顕著であり、発現量は、12 日中腎管間葉、12 日後腎管間葉、13 日後腎管間葉の順で上昇した。後腎発生初期においては、腎管系上皮の応答性維持に働く FGF の中で、FGF9 から FGF1 への発現量の逆転が起こることが示唆された。

(4) 結語

研究期間全体としては、中腎管および間葉の FGF シグナル、BMP シグナル、WNT シグナルの遺伝子発現変化を明らかにし、これらの成長因子が中腎管の転写因子発現に与える影響を調べた。FGF9 が Sox9, Pax2, Lhx1, Hnf1b, Emx2 等の発現を培養条件下で維持し、BMP4 がこれに対し抑制的に作用することを明らかにした。尿管芽との比較と合わせて、腎管系分化における中腎管の応答性維持に関し、制御の鍵となるシグナル因子や転写因子の候補を提示した。

<引用文献>

Kim et al., Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. PLoS Biol 4, e187 (2006)

Costantini and Shakya, GDNF/Ret

signaling and the development of the kidney. *BioEssays* 28, 117-127, (2006)

Lokmane et al., vHNF1 functions in distinct regulatory circuits to control ureteric bud branching and early nephrogenesis. *Development* 137, 347-357 (2010)

Bridgewater et al., Canonical WNT/ β -catenin signaling is required for ureteric branching. *Dev Biol* 317, 83-94 (2008)

5. 主な発表論文等

[学会発表](計7件)

城倉浩平 中腎管から尿管芽への分化における線維芽細胞増殖因子発現と応答性の変化 第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会 2018年3月28-30日 武蔵野市

城倉浩平、櫻井裕之 転写因子発現変化からみた BMP4 の中腎管分化応答性制御 第58回日本組織細胞化学会・学術集会 2017年9月23-24日 東温市

城倉浩平、櫻井裕之 間葉因子による中腎管の分化応答性制御 第122回 日本解剖学会総会・全国学術集会 2017年3月28-30日 長崎市

城倉浩平、櫻井裕之 中腎管の転写因子発現に対する BMP4 の作用 日本解剖学会 第76回中部支部学術集会 2016年10月8-9日 松本市

城倉浩平、櫻井裕之 BMP4 の中腎管分化応答性抑制における転写因子発現変動 第121回 日本解剖学会総会・全国学術集会 2016年3月28-30日 郡山市

Johkura K, Sakurai H FGF9 and BMP4 regulate the competence of Wolffian duct 第120回 日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会 合同大会 2015年3月21-23日 神戸市

城倉浩平、櫻井裕之 中腎管上皮細胞に対する間葉 BMP4 の作用 第55回日本組織細胞化学会・学術集会 2014年9月27-28日 松本市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城倉 浩平 (JOHKURA, Kohei)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：30303473

(2) 連携研究者

櫻井 裕之 (SAKURAI, Hiroyuki)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：00508294