

尿細管を場とする慢性腎臓病進行の分子機構の解明 ～ES細胞からの尿細管の分化誘導～

慶應義塾大学医学部 医学教育統轄センター
講師 門川 俊明

(共同研究者)

慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科 助教 森實 隆司

はじめに

末期腎不全にいたる疾患には、様々な糸球体障害の病理像があるが、最終的には、尿細管間質障害という共通の病理像を呈し、腎機能が低下する。尿細管間質変化は腎障害進行の最も重要な要因である。近年、慢性腎臓病（CKD）進行における尿細管細胞のダイナミックな動きが注目されている。一つは尿細管細胞の再生現象であり、もう一つは、上皮間葉細胞形質転換（EMT）である。尿細管を場とする病気の進行は、再生現象とEMTのバランスで決まると考えられる。つまり、尿細管に起こった傷害が短期的で、それほど強いものでなければ、再生現象によって回復が可能であるし、持続的な傷害の場合には、EMTによって、尿細管間質障害が進行していくと考えられる。

我々は、これまでにES細胞の腎構成細胞への分化誘導方法を研究し、ES細胞においてActivinが腎臓の尿細管全般に発現しているKidney specific protein（KSP）の発現を促進する事を見出した¹⁾。しかし、実際には、KSP陽性細胞は1%強程度であり、分化誘導したES細胞からKSP陽性細胞を選別し、純化する必要がある。そこで、Flow cytometryによる純化を目的として、KSPの細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体を独自に作成した。本モノクローナル抗体を用いたflow cytometryによって、KSP陽性細胞を抽出してくる事で、より尿細管細胞にコミットした細胞を選別し、尿細管を分化誘導することを試みた。ES細胞から分化誘導した尿細管は、尿細管を場とする慢性腎臓病進行の分子機構の解明をおこなうためのツールとなると考えられる。

方 法

KSPモノクローナル抗体の作製

マウスKSPの細胞外ドメインに存在している⁽¹⁾ 382PEPEEGAENKAFELDPT398,⁽²⁾ 22QPAESLHTEVPENYGGNC38,⁽³⁾ 767NVEGQCMRKVGRMKGMPTKLS787の3つのペプチドを合成し、マウスに免疫した。76ラインのハイブリドーマを樹立し、その中から、ペプチド⁽¹⁾を

抗原とするハイブリドーマを選別し、ヌードマウスの腹腔に注射し、腹水を採取し、プロテインAカラムでモノクローナル抗体の精製をおこなった。

マウスES細胞株の培養

マウスES細胞株、CAG-GFP EB3 (理化学研究所、丹羽博士より分与) はフィーダーを必要とせず培養が可能である。未分化状態を維持するための培養では、Glasgow modification of Eagle's minimal essential medium(GMEM, Sigma)、10%(v/v) fetal calf serum(FCS)、1000U/ml leukemia inhibitory factor(LIF, Chemicon)、0.1mM 2-mercapto-ethanol (Sigma)、10mg/ml Blasticidin(Funakoshi)を用いて、ゼラチンコートプラスチック上で培養をおこなった。

ES細胞をultra low attachment culture dishes(Corning)に移し、浮遊培養を3日間続け、胚様体を形成させることにより、分化を開始させた。3日目に胚様体をゼラチンコートディッシュに移し、さらに15日間の培養を続けた。分化用培地は、Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, GIBCO)、10%(v/v)FCS、0.1mM 2-mercaptoethanolであった。誘導因子としてrecombinant human/mouse/rat Activin 10 ng/ml(R&D systems), recombinant mouse HGF 1, 10, 50 ng/ml(R&D systems), recombinant mouse IGF-1 5, 10, 100 ng/ml(R&D systems)を適宜添加した。

Wnt4を安定的に発現するNIH3T3-Wnt4細胞は、Dr. McMahon(Harvard Stem Cell Institute)より分与を受け、DMEM+10%(v/v)FCSで培養をおこなった。NIH3T3-Wnt4は 5×10^4 cells/cm²の密度まで培養した後、mitomycin C処理をおこない、MatrigelをNIH3T3-Wnt4フィーダー上に置いた。Flow cytometryで純化したKSP陽性細胞はMatrigel上に 1×10^5 cells/cm²の密度で蒔き、Renal Epithelial Cell Growth Medium BulletKit(REGM, Lonza)で培養をおこなった。

Flow cytometry

マウスES細胞は、Trypsin-EDTA処理、機械的なピッペッティングの後、rat anti-mouse CD16/CD32(Becton Dickinson)、anti-KSP antibody、streptavidin-Alexa Fluor 647(Invitrogen)、propidium iodide(Sigma)と反応させた後、MoFlo XDP(Beckman Coulter)でソーティングをおこなった。

Microarray

Flow cytometryで分離した、KSP陽性細胞と陰性細胞から、RNAを抽出し、Mouse Genome 430 2.0 Array(Affymetrix)とハイブリダイゼーションをおこない、データをGene spring(Agilent)を用いて解析した。

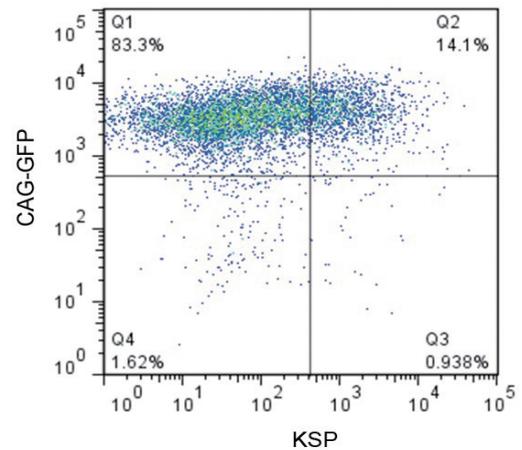
マイクロインジェクション

E13.5胎仔マウスから、腎臓を摘出した。Flow cytometryで分離したKSP陽性細胞を 1×10^8 cells/mlの濃度で、胎仔腎臓にマイクロインジェクションをおこなった。

結 果

(1) マウス ES 細胞における KSP 誘導

マウス ES 細胞を用いて、様々な誘導因子や共培養系を検討した結果、Activin が尿細管上皮細胞のマーカーである KSP の発現を促進する事を見出した¹⁾。今回、Activin と他の誘導因子の組み合わせを検討した結果、IGF と HGF が Activin と組み合わせる事で、より KSP の発現を促進する事が分かった。今後の実験では、Activin+IGF を用いることとした。この条件では、KSP 陽性細胞は 2 ~ 14 % 程度得られるようになった (右図)。

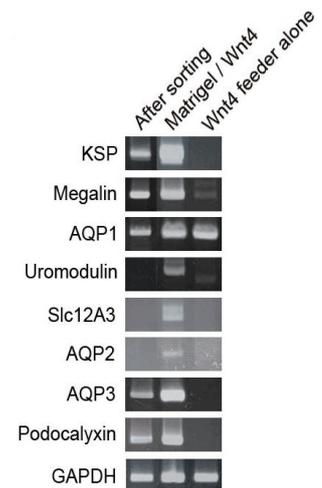
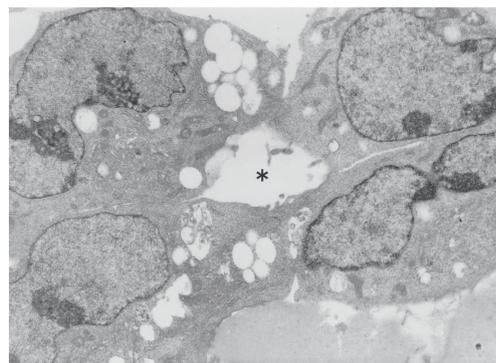


(2) 尿細管上皮前駆細胞の純化

分化誘導したマウス ES 細胞から、より腎臓に分化した細胞を純化するため、KSP に対するマウスモノクローナル抗体を作成した。マウス ES 細胞を Activin、IGF で 18 日間分化誘導後、独自に作成した抗 KSP モノクローナル抗体を用いて Flow cytometry で細胞純化を行った。KSP 陽性細胞の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイで解析し gene ontology 解析を行ったところ、KSP 陽性細胞では KSP 陰性細胞と比較して有意に腎・泌尿器系の発生に關与する遺伝子が高発現であった。この遺伝子群は、Osr1 などの後腎間葉細胞で発現が認められ、尿細管上皮細胞に上皮化した後には発現が消失する間葉系細胞の遺伝子が複数含まれており、この事から ES 細胞由来の KSP 陽性細胞は完全に分化した尿細管細胞ではなく尿細管上皮前駆細胞の特性を有していると考えられた。

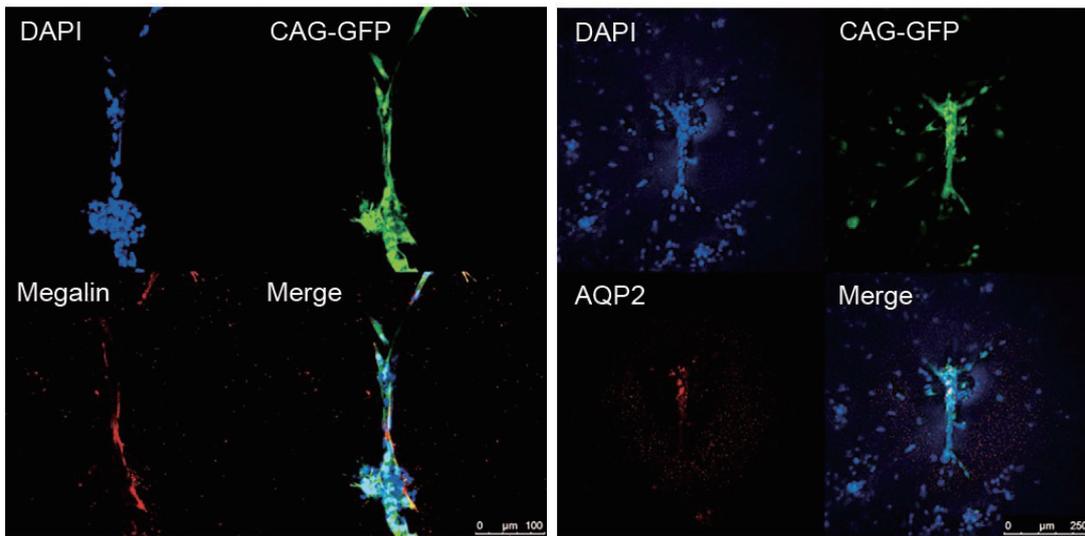
(3) in vitro での尿細管管腔構造の再現

Matrigel による 3 次元培養を行い、培養条件を検討した結果、低血清培地が尿細管管腔構造の形成に最適であることが分かった。しかし、その効率があまり良くなかったため、



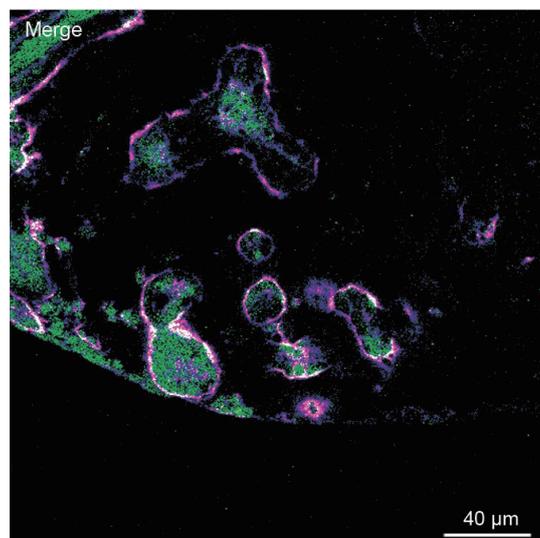
尿細管管腔構造の形成を促進すべく、腎臓の発生段階で非常に重要である Wnt-4²⁾ の効果を検討した。Wnt4 を強制発現させた NIH3T3-Wnt4 細胞株をフィーダー細胞として、その上に Matrigel を敷き KSP 陽性細胞を培養した。Wnt4 を発現しない NIH3T3 細胞をフィーダー細胞とした条件と比較して、明らかに管状構造の形成 (上図、電顕写真) が促進される結果が得

られ、in vivoの腎臓の発生と同様にマウスES細胞から尿細管細胞への分化誘導においてもWnt4が非常に重要な役割を担っている事が明らかとなった。また、同管腔構造を尿細管各セグメントのマーカ遺伝子の発現がPCRで確認できた。また、マウスES細胞から分化誘導された尿細管細胞は、免疫組織学的検討から近位尿細管のマーカであるmegalinが一部の細胞で陽性で、AQP2も一部の細胞で陽性である事が分かり、近位尿細管、集合管といった腎尿細管の各セグメントへの分化が考えられた。



(4) マウス胎仔腎臓への移植実験

KSP陽性細胞を、マウス胎仔腎臓の被膜下にマイクロインジェクションをおこない、in vivoにおいて、KSP陽性細胞が、尿細管へ分化するかを確認した。その結果、ES細胞由来のKSP陽性細胞（写真緑）がマウス胎仔腎臓の尿細管（紫でラベルされたラミニンに囲まれた領域）に認められ、KSP陽性細胞は、in vivoにおいても、尿細管細胞に分化する事を確認した。



緑：ES細胞由来
紫：ラミニン

考 察

我々は、新規作成したKSP抗体を用いたKSP陽性細胞の純化により、ES細胞から尿細管に分化誘導することに成功した。多能性幹細胞ES細胞、iPS細胞は、現在、様々な再生医学、発生研究に用いられているが、これまでに、in vitroにおいて、腎臓の細胞への分化誘導には成功したという報告はなかった。我々の研究では、KSP陽性細胞が発生段階の腎臓の細胞のキャラクターを持ち、in vitroにおいて、管腔構造を形成することを示した。さらに、Wnt4が管腔構造の形成と、分岐形成を促進することを示した。これらの研究は、KSP陽性細胞が腎臓の発生研究の重要なツールであるとともに、疾患iPS細胞を用いた研究に大きく貢献すると考えられる。

我々はマウスES細胞から、Activinの添加によりKSP陽性細胞を増やすことを見いだしたが、KSP陽性細胞の数は十分でなく、管腔構造形成には至らなかった。しかし、Activinに加え、IGF-1を添加することで、KSP陽性細胞数が1-1.5%から、2-14%にまで増えることを見いだした。

マイクロアレイの結果から考えると、KSP陽性細胞は、間葉系の形質を持っていて、PCRでも成熟した尿細管セグメントマーカーは発現していなかった。したがって、KSP細胞は尿細管上皮細胞に向けてさらなる分化が必要であると考えられた。Taubらは、マウス胎児腎臓から分離した細胞をMatrigel上で培養することで、電顕でも微絨毛を有する尿細管管腔構造の再現に成功している³⁾。したがって、我々も、KSP陽性細胞をMatrigel上で培養し、Taubらの研究と同様の微絨毛を有する管腔構造の再現に成功した。しかし、尿細管は短く、未熟であったため、さらに管腔構造形成を促進する因子として、Wnt4の効果を検討した。Wnt4は、分泌糖タンパクで、腎臓の発生において、尿細管形成に必須の因子として知られる^{2, 4)}。我々の実験では、Wnt4の強制発現細胞株であるNIH3T3-Wnt4細胞との共培養によって、KSP陽性細胞の管腔形成が著明に増加した。さらに、これらの管腔構造においては、ネフロンセグメント特異的遺伝子の発現が認められた。すなわち、近位尿細管マーカーであるMegalinとAQP1、ヘンレループマーカーであるUromodulin、遠位尿細管マーカーであるSlc12A3、集合管マーカーであるAQP2とAQP3、ボーマン嚢マーカーであるPodocalyxinである⁵⁻⁸⁾。これらの結果は、管腔構造形成とともに、KSP陽性細胞が成熟尿細管の形質を獲得していることを示している。

これらの研究成果は、初めて多能性幹細胞から尿細管細胞への分化誘導方法を示したものであり、in vitroで誘導された尿細管は、今後、尿細管を場とする慢性腎臓病の研究にも非常に有力なツールとなると考えられる。

要 約

抗KSP抗体によるKSP陽性細胞の純化を介して、ES細胞からin vitroでの尿細管細胞の分化誘導方法を確立した。ES細胞由来のKSP陽性細胞は、網羅的遺伝子解析から、発生段階の

腎臓と類似した特性を有している事が示され、3次元培養で尿細管に類似した管状構造を再現した。この尿細管構造は、Wnt4によって形成が促進され、KSP陽性細胞は管状構造を形成する事で、各セグメントの尿細管細胞に分化する事が出来た。ES細胞からの尿細管細胞の分化誘導方法の確立は、尿細管を場とする慢性腎臓病進行の分子機構の解明にとって、きわめて有用なツールになると考えられる。

文 献

1. Morizane R, Monkawa T, Itoh H. Differentiation of murine embryonic stem and induced pluripotent stem cells to renal lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 390:1334-1339, 2009.
2. Kispert A, Vainio S, McMahon AP. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* 125:4225-4234, 1998.
3. Taub M, Wang Y, Szczesny TM, et al. Epidermal growth factor or transforming growth factor alpha is required for kidney tubulogenesis in matrigel cultures in serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4002-4006, 1990.
4. Nishinakamura R, Osafune K. Essential roles of Sall family genes in kidney development. *J Physiol Sci* 56:131-136, 2006.
5. Sekine M, Monkawa T, Morizane R, et al. Selective depletion of mouse kidney proximal straight tubule cells causes acute kidney injury. *Transgenic Res* 21:51-62, 2012.
6. Schmitt R, Ellison DH, Farman N, et al. Developmental expression of sodium entry pathways in rat nephron. *Am J Physiol* 276:F367-381, 1999.
7. Echevarria M, Windhager EE, Tate SS, et al. Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10997-11001, 1994.
8. Bariety J, Mandet C, Hill GS, et al. Parietal podocytes in normal human glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 17:2770-2780, 2006.