

論文の内容の要旨

論文題目 Studies on *in vitro* generation of kidney from undifferentiated cells
 (未分化細胞を用いた腎臓形成に関する研究)

氏 名 長 船 健 二

近年、発生生物学の進歩により哺乳類の全能性未分化細胞である胚性幹 (Embryonic Stem, ES) 細胞をはじめとする幹細胞より特定臓器の前駆細胞を *in vitro* で形成した後や、臓器特異的な体性幹細胞を *in vitro* で増殖させた後に、生体内に移植することで疾患によって機能不全に陥った臓器の再生を行う治療法の開発研究が多くの臓器で行われている。腎臓は生命維持に不可欠な臓器であり、本邦においても進行性の腎疾患により透析療法を必要とする末期腎不全患者が増え続けており、患者の生活の質を低下させるのみならず、医療費の高騰を招いているにも拘らず有効な治療法がない。よって腎臓再生医療の開発は医学的のみならず社会的、経済的な面からも求められているが、幹細胞より腎臓前駆細胞を形成することも、腎臓特異的幹細胞を単離することも未だ成功した報告がない。本研究の目的は将来的に腎臓再生医療を開発するために、未分化細胞より *in vitro* で腎臓を形成することである。

(第1章) 両生類未分化細胞よりの前腎導管の形成

未分化細胞より腎臓を形成することは前述のごとく哺乳類においては未だ成功していないが、両生類においては多能性未分化細胞であるアフリカツメガエル卵動物極細胞 (アニマルキャップ) をアクチビンとレチノイン酸で処理することにより初期の腎臓である前腎のネフロンのうち腎管 (尿細管) が *in vitro* で形成されることが我々の研究室で見出された。更にこの系において前腎糸球体も形成されることが示された。そこで今回は前腎の 3 つ

のコンポーネントの内、*in vitro* で形成可能であるかどうかは唯一不明であった導管（集合管）の形成について調べた。アクチビンとレチノイン酸の共処理を行ったアニマルキャップ内には導管特異的抗体 4A6 陽性で、導管の遺伝子マーカーである *Gremlin*, *c-ret* を発現する管構造が高頻度に形成され、それらは電顕上、正常胚の導管と微細構造が同じであった。よってアニマルキャップをアクチビンとレチノイン酸で処理することにより前腎導管が高率に誘導され、両生類においては未分化細胞より *in vitro* において導管も含め前腎ネフロンのすべてのコンポーネントが形成可能であることが示された。

（第2章）哺乳類腎臓前駆細胞を単離、同定するための *in vitro* 及び *in vivo* 系の確立

後腎ネフロンのうち糸球体と尿細管に分化しうる前駆細胞の集合体であるマウス 11.5 日胚の後腎間充織を個々の細胞に解離した状態にしてから増殖あるいは分化させる *in vitro* 及び *in vivo* の系の確立を試みた。*in vitro* 増殖系としてマウス後腎の尿管芽由来の cell line である UB cell を feeder として、その上で解離した後腎間充織細胞を培養することにより上皮細胞と間質細胞のマーカー（Pax-2, Sall1）を発現する細胞集団と血管内皮及び血球細胞のマーカー（Flk-1, VE-cadherin, PECAM-1/CD31, CD45）を発現する集団を増殖させることができた。前者の細胞集団は後腎間充織細胞のうち最終的に糸球体と尿細管の上皮細胞に分化する上皮系前駆細胞と間質細胞、後者は糸球体の血管内皮とメサンギウム細胞に分化する内皮系前駆細胞と考えられる。*in vitro* 分化系として解離間充織細胞を再び塊とし古典的器官培養法を用いて胎生マウス脊髄と共培養することで糸球体と尿細管を含む腎臓様構造に分化させることができた。更に少数の GFP トランスジェニックマウスや ROSA26 マウス由来の細胞を野生型の間充織細胞に加えてこの塊を作成することにより単一細胞レベルでの分化における挙動が追跡観察できる。*in vivo* 分化系として新生マウスの腎臓に解離した後腎細胞を移植する方法を考案し、移植した細胞が少なくとも糸球体のポーマン囊上皮細胞と尿細管細胞に組み込まれていることを確認した。これらの系は解離細胞を増殖あるいは分化させられるため将来的に ES 細胞、神経幹細胞、骨髄細胞等の未分化幹細胞より細胞表面マーカーを用いたフローサイトメトリーによって選別される腎臓前駆細胞を単離、同定するための系として活用できる。

（第3章）哺乳類未分化幹細胞よりの腎臓前駆細胞の形成

ES 細胞、神経幹細胞、骨髄細胞より腎臓前駆細胞形成の可能性について調べた。まず、腎臓前駆細胞である未分化な後腎間充織に発現する Sall1 をマーカーとして利用するため *Sall1-GFP* knock-in ES 細胞を IV 型コラーゲン上で中胚葉組織に分化させた。5 日間の培養後、Flk-1+/Sall1+, Flk-1/Sall1+, Flk-1-/Sall1- の 3 つの細胞集団が出現し、この内フローサイトメトリーにて選別されて純化された Flk-1+/Sall1+ の細胞集団及びそれらを更に 4 日間分化させたものは後腎発生期の腎臓のマーカー遺伝子を発現していた。これらの結果より未分化 ES 細胞から分化して得られる Flk-1+/Sall1+ の細胞集団は腎臓前駆細胞を含む可

能性が示唆され第2章で述べた系を用いてそれらを単離、同定をすることを今後行う予定である。次に神経幹及び骨髄細胞が腎臓前駆細胞に分化する可塑性を調べるため、これらの細胞を第2章の *in vivo* 分化系を用いて新生マウスの腎臓に移植したところドナー由来の細胞がホストの尿細管に生着していることが確認された。今後、ドナーとホストの細胞が融合している可能性を否定し、機能的にホストのネフロンに統合されていることを示す予定である。