APP-103 遺伝子導入 ES 細胞からの腎構成細胞の誘導

名古屋市立大学大学院大学医学研究科腎・泌尿器科学¹⁾, 熊本大学発生医学研究センター細胞識別分野²⁾

中根 明宏¹⁾, 黒川 覚史¹⁾, 水野 健太郎¹⁾, 小島 祥敬¹⁾, 丸山 哲史¹⁾, 林 祐太郎¹⁾, 郡 健二郎¹⁾, 西中村 隆一²⁾

【背景】幹細胞研究に基づいた再生医療として、多分化能を有する胚性幹 (ES) 細胞を用い様々な臓器の細胞に分化させることが試みられていて、心筋、神経血液などの分野では細胞単位の誘導が可能であることが示されている。また一方でノックアウトマウスなどの解析により腎臓の形成に重要な遺伝子が数多く報告されている。そこで私たちは、腎再生を目指し、このような遺伝子を導入した ES 細胞から腎構成細胞を分化誘導することを検討した。【方法】ES 細胞である MGZRTcH2 細胞に腎発生の初期において中間中胚葉や間葉細胞に発現する転写因子の遺伝子である Pax2, Six1, Hoxa11 をそれぞれ electroporation 法で導入する。この ES 細胞はテトラサイクリン非存在下において導入遺伝子を発現する構造を持っていて (Tet-off system), 必要時に遺伝子発現を調節することが可能である。続いて、白血球阻害因子 (LIF) を除去した状態で培養した。また、LIF を除去した ES 細胞を 5000 細胞/drop で hanging drop 法を用い、胚様体 (EB) を形成させ 5 日間培養した。更に平面培養で数日間分化させた。これらの方法を遺伝子導入 ES 細胞と非導入 ES 細胞で行い、糸球体や尿細管などの腎臓様の構造をとるかどうかが細胞塊の内部構造の所見を確認した。また、経時的に培養した細胞塊を回収し、発現された遺伝子の中で腎臓形成に関連するものが存在するのか、または増強するのかを培養経過日数ごとに RT-PCR で評価した。【結果・考察】Pax2 を導入した ES 細胞において、EB を 0.5, 10 日後に回収したところ間葉細胞に発現する integrin α 8 と近位尿細管のマーカーである aquaporin-1 の上昇が認められた。中間中胚葉からウォルフ管の形成期に発現を認める Lim-1 の上昇も認めるものの遺伝子非導入 ES 細胞と顕著な差とは言えなかった。また Six1, Hoxa11 それぞれにおいても、複数の腎臓発生に関連する遺伝子や腎構成細胞のマーカーとなる遺伝子の発現の増強が認められた。これは、腎構成細胞またはその前駆細胞の構成比率が増加した可能性があると考えられた。心筋細胞、神経細胞などの様々な臓器の細胞への分化は確認でき、管状の構造物も認めた。今後、このような構造物が尿細管などであるかどうか慎重に検討する必要があるものの、遺伝子導入した ES 細胞を用い、目的の細胞を誘導する方法が腎再生の分野でも有用である可能性が示唆された。

APP-104 腎初代培養細胞を利用した尿細管構造の再構築

筑波大学大学院人間総合科学研究科泌尿器科¹⁾, Wake Forest University, Institute for Regenerative Medicine, North Carolina, USA²⁾

常楽 晃¹⁾, Yoo James²⁾, Atala Anthony²⁾, 赤座 英之¹⁾

【目的】現在、腎移植は正常な腎機能を取り戻す唯一の手段である。しかし腎ドナーの深刻な供給不足や、免疫抑制剤の副作用があり腎移植に頼る医療には限界がある。腎機能を将来的に補うことを可能にする新手法の開発が望まれている。本研究は 1) マウス腎臓の初代培養細胞を用いた in vitro における尿細管再生の可能性、および、2) 腎実質内に移植した細胞が腎臓の再生に与える可能性を in vivo で検討した。

【方法】実験 1) 4 週齢の雄マウスから採取し、一度継代した腎臓初代培養細胞を細胞外マトリックスである collagen type I と混和し (最終細胞濃度 1×10^6 cells/cc), 1mm 厚のゲルを 24 well dish 上に作成し、これを in vitro で培養した。位相差顕微鏡下で、培養細胞の形態変化をデジタルカメラで日々記録した。実験 2) 蛍光色素 (PKH26red) でラベルした 5×10^6 個の初代培養細胞を collagen type I 溶液に混和し、12 週近交系雌マウスの両側の腎実質に全身麻酔下に注入移植した。コントロール群には collagen type I のみを注入した。24 および 6 週間後にマウスを安楽死させた後に腎臓を取り出し組織学的に評価した。腎実質内に移植されたドナー細胞の同定には次の 2 つの方法で行った。摘出直後の腎臓の断面を直接、蛍光顕微鏡で観察し、PKH26red にラベルされた細胞を観察した。また、ホルマリン固定パラフィン切片標本上で、Y 染色体プローブを用いた FISH 法により Y 染色体を有する細胞の検出を行った。

【結果】実験 1) 培養開始後 4 日までに、collagen type I のゲルを利用した in vitro の三次元培養により、管腔構造が単一細胞から再構築してゆくことが観察された。培養後一週間では管腔構造はさらに長さを増し、分岐を有する構造も観察された。実験 2) 移植を受けた腎臓の断面を蛍光顕微鏡で観察したところ、PKH26red で蛍光ラベルされたドナー細胞が、腎実質内で尿細管様構造を構成していることが観察された。細胞移植群および、コントロール群でも注入部位では、その周囲の正常腎実質構造に類似した尿細管様構造の再生が起こっていることが、HE 染色にて確認された。再生した尿細管様構造に水輸送蛋白 Aquaporin 1 が発現していることが、免疫染色で確認された。再生尿細管様構造を構成するレシビエントの細胞に混在して Y 染色体を有するドナー細胞が同居していることが確認された。

【結語】マウスの腎臓初代培養細胞は、細胞外マトリックスのひとつである collagen type I の中で三次元培養することにより、in vitro で尿細管様の構造を部分的に再構築する能力を有することが示された。腎実質に移植された腎臓初代培養細胞は、腎実質内における尿細管再生に利用されることが示された。本研究は、腎臓初代培養細胞を用いた腎組織再生の可能性を示した。