

研究課題別評価

1. 研究課題名:腎臓発生の分子機構とその応用

2. 研究者氏名:西中村 隆一

3. 研究の狙い:

日本で人工透析を受ける人は23万人を超え、この10年で2倍となった。また医療経済からみた社会的負担も大きい。にもかかわらず、一旦悪化した腎機能を改善させる画期的な治療法はいまだ存在しない。腎臓再生が直ちには難しいとしても、腎臓の発生を探ることによって臓器を再生する手だてが考えられないだろうか。私はカエルとマウスを使って核内因子 Sall1 を単離し、これが腎臓形成に必須であることを示した。これを手がかりに腎臓発生の分子生物学的機構を解明することを主な狙いとした。またその情報から腎臓前駆細胞のアッセイ系を開発し、腎臓再生への可能性を検討することもさらなる課題とした。

4. 研究結果:

1) Sall ファミリー遺伝子の生体内での機能解析

ヒト SALL1 の変異は Townes Brocks 症候群という指、耳、肛門、腎臓、心臓の異常を呈するが、マウス Sall1 の欠失マウスには腎臓以外の症状はない。そこで Sall2 のノックアウトマウスを作成し、Sall1 との二重欠失マウスも解析したが、Sall1 欠失による腎臓欠損のみで、その他の異常は出現しなかった(Mol. Cell Biol. 2003)。これに対して、Sall1/Sall3 二重欠失マウスは、腎臓欠損の他に指の異常を呈し、胎生致死であった。さらに新規遺伝子として Sall4 を見出し、欠失マウスを作成したところ、予想外に胎生 5.5 日という極めて初期に死亡し、かつ胚性幹細胞(ES 細胞)において Sall4 が必須であることが明らかになった(投稿中)。ヘテロも肛門の異常、外脳症を呈し、さらに Sall1/Sall4 の二重ヘテロは、外脳症の頻度が顕著に上昇し、腎臓欠損を伴うものも出現した。これらから、Sall ファミリーが重複した機能をもちながら、各臓器の発生に関与していることが明らかになった。

2) Sall の分子機構の解明

Sall1, Sall4、及び一部の Sall3 はヘテロクロマチンに局在するが、Sall2 は局在しない。変異体作成によって、Sall1 も Sall4 も C 端の Zinc finger 領域がヘテロクロマチン局在に寄与しており、N 端が二量体形成に関わることを明らかにした。実際、内在性の Sall1 と Sall4 が結合することも免疫沈降によって証明した(投稿中)。ヒト SALL1 の変異でみられる N 端の truncated form はヘテロクロマチンに局在しないが、二量体形成能は保たれる。これが dominant negative に働いて Sall ファミリーすべての機能を抑制する機構が示唆され、ヒトの SALL1 変異とマウスの Sall ファミリー複合ノックアウトの症状が似通っていることを説明できた。

3) 腎臓間葉細胞の単離と新たな遺伝子の同定

Sall1 が腎臓前駆細胞集団である後腎間葉に発現することを利用し、Sall1 の遺伝子座に GFP をノックインしたマウスを作成した(Mech. Dev. 2004)。その胎生期腎臓から FACS を用いて GFP 陽性細胞集団を単離した。この RNA を用いてマイクロアレイで網羅的検索を行い、さらに発現パターンを解析した。その結果 Sall1 や GDNF、Pax8、FoxD1 など腎臓発生に必須な既知の遺伝子の他に、未知の遺伝子も新たに同定することができた。ゆえにマイクロアレイと Sall1-GFP ノックインマウスの組み合わせによって、胎生期腎臓における間葉系遺伝子の効率的な同定が可能であることが示された。未知遺伝子のいくつかについてはノックアウトマウスが完成し、中には胎生致死となるものもあり、現在解析中である。ただこれらが腎臓発生以前に致死となる可能性もあり、腎臓特異的なノックアウトの系を作成する必要がある。この目的のために Sall1-Cre マウスをノックイン

の手法で作成した。しかし腎臓発生以前にも作動が認められたため、Sall1-CreER マウスを作成し直し、現在作動を確認中である。

4) 腎臓前駆細胞アッセイ系の確立

Sall1-GFP ノックインマウスから、GFP を発現する後腎間葉細胞を単離し、Wnt4 を発現するフィーダー上で培養すると、一つの細胞からコロニーが形成され、糸球体や尿細管など多系統の分化マーカーを発現することを見いだした(Development 2006)。さらに GFP 発現細胞を再凝集させると 3 次元立体構造を再構築できることも示した。よってこのシステムは腎臓細胞の運命決定の解析に役立つとともに、腎臓前駆細胞を誘導する際の検定系となることが期待される。

5. 自己評価:

Sall ファミリーの機能を *in vivo* で明らかにすることができた。しかしこれがヘテロクロマチンに局在することによって、どのような蛋白複合体を形成し、下流でどんな遺伝子が働いて、臓器形成につながるのかが今後の課題である。幸い Sall4 が ES 細胞に必須であることが判明し、ES は *in vitro* で大量に増やせることから、これを使って細かい分子機構に迫り、その結果を腎臓にフィードバックしたいと考えている。腎臓間葉に発現する新たな遺伝子についてはノックアウトマウスを作成することによって、Sall 以外の新たな重要遺伝子の同定が期待できる。

ES 細胞からの腎臓誘導や腎臓細胞移植等は一部でがけたものの、はっきりした成果をあげられなかった。これは確固たる腎臓細胞のアッセイ系がなかったせいでもあるが、ようやく後腎間葉細胞を検出する系が開発できた。これがさらに早期の腎臓(中腎や中間中胚葉)にも応用可能かの検討を行い、今後 ES 細胞から腎臓細胞の誘導を行いたい。

作成したマウスと切った尻尾や切片は相当な数だと自負しているが、ノックアウトマウス作成を主体とするので、どうしても結果がでるのに時間がかかる。期間内に論文発表までいったものが少ないのが反省すべき点であり、また腎臓から他の分野に影響を与えられるような、もっと質の高い論文を目指したい。

6. 研究総括の見解

現在、日本では 23 万人に達する腎機能不全者が人工透析を受けており、患者の数は増しつつある。本研究は究極的には腎臓の再生医療を視野に入れた非常にチャレンジングなアプローチである。

Sall ファミリー遺伝子は腎臓の発生に深く関わる遺伝子群であるが、本研究者は、ノックアウトマウスによる Sall ファミリー遺伝子群の機能解析とマイクロアレイを利用して、腎形成に直接関与する遺伝子の分離に成功し、それらの機能解析を着実に進め、Wnt 遺伝子発現細胞をフィーダーとして活用することで、腎細胞の分化を成立させる実験系を確立した。このように、本研究は当初の目的を予定通りに達成したと評価でき、今後、腎臓形成の分子メカニズムの解明も十分期待できる。

7. 主な論文等:

1. Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., Asashima, M., and Nishinakamura, R. Zinc finger protein Sall2 is not essential for embryonic and kidney development. *Mol. Cell. Biol.* 23 (1):62-69, 2003.

2. Nishinakamura, R. Kidney development conserved over species: essential roles of Sall1. *Semin. Cell Dev. Biol.* 14, 241-247, 2003. (edited by Nishinakamura, R)

3. Sato, A., Kishida, S., Tanaka, T., Kikuchi, A., Kodama, T., Asashima, M., and Nishinakamura, R. Sall1, a causative gene for Townes-Brocks syndrome, enhances the canonical Wnt signaling by localizing to heterochromatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319: 103-113. 2004.

4. Takasato, M., Osafune, K., Matsumoto, Y., Yoshida, N., Meguro H., Aburatani, H., Asashima, M., and Nishinakamura, R. Identification of kidney mesenchymal genes by a combination of microarray analysis and Sall1- GFP knockin mice. *Mech. Dev*, 121(6): 547-557. 2004.

5. Osafune, K., Takasato, M., Kispert, A., Asashima, M., and Nishinakamura, R. Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. *Development* 133(1): 151-161. 2006.

招待講演 (5 件)

1. 腎臓発生の分子機構 第 6 回日本組織工学会、2003 年 6 月 12-13 日
2. 腎臓発生の分子機構 日本炎症再生学会、2003 年 7 月 2-3 日
3. Essential roles of Sall family in kidney development ISN (International Society of Nephrology) *Forefronts in Nephrology*、2005 年 1 月 20-22 日、軽井沢プリンスホテル
4. Essential roles of Sall family in kidney development 日本腎臓学会国際シンポジウム、2005 年 6 月 25 日、横浜パシフィコ
5. 腎臓発生の分子機構 第 8 回日本組織工学会、2005 年 9 月 1-2 日

口頭発表 6 件

和文総説 18 件