

Mini Review

マウス ES 細胞の尿細管細胞への分化における
Wnt4 の影響田中啓之^{1,2)}，寺田典生¹⁾，小林隆彦¹⁾，寺岡弘文³⁾，佐々木成¹⁾¹⁾東京医科歯科大学腎臓内科学，²⁾横須賀共済病院腎センター，³⁾東京医科歯科大学難治疾患研究所*Effect of the Wnt4 on the induction of renal tubular-like cells from mouse embryonic stem cells*

Embryonic stem(ES) cells have a potential to differentiate into various progenitor cells. In this review we investigated the capacity of mouse ES cells to differentiate into renal tubular cells. After stably transfecting Wnt4 cDNA to mouse ES cells(Wnt4-ES cells) by electroporation, the ES cells were incubated by the hanging drop culture method without leukemia inhibitory factor(LIF) to induce differentiation to embryoid bodies(EBs).

During the culture of the EBs derived from the Wnt4-ES cells, aquaporin-2(AQP2) mRNA and protein were expressed within 15-20 days after the removal of LIF. The expression of AQP2 in Wnt4-EBs was enhanced in the presence of hepatocyte growth factor(HGF) and activin A. We observed AQP2 positive tubular-like formation from Wnt4-EBs in three-dimensional culture. Our result shows that two new findings: firstly, that cultured Wnt4-EBs have an ability to differentiate into renal tubular-like cells; and secondly, that Wnt4, HGF, and activin A may promote the differentiation of ES cells to renal tubular-like cells.

Rec.12/10/2004, Acc.1/12/2005, pp442-446

Hiroyuki Tanaka^{1,2)}, Yoshio Terada¹⁾, Takahiko Kobayashi¹⁾, Hirobumi Teraoka³⁾ and Sei Sasaki¹⁾¹⁾Department of Nephrology, Tokyo Medical and Dental University²⁾Kidney Center, Yokosuka Kyosai Hospital³⁾Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University**Key words** Wnt4, ES cell, renal tubule

はじめに

近年、再生医療が非常に注目を集めているが腎臓に関しての報告は少ない。急性尿細管壊死では尿細管細胞の再生による病態の改善が得られることがある。しかし、新規の尿細管細胞がどのようなメカニズムで再生されていくのか、あるいはどの細胞を起源として尿細管細胞が再生されるのか、またどのような因子が再生を決定づけるのかという問題は未だに解明されていない。骨髄細胞から幹細胞を分離し腎細胞へ分化させる研究や成体腎臓から幹細胞を同定する研究なども活発に行われているが、われわれはマウスES細胞をソースとした腎再生を研究課題として取り組んでいる。しかしながら、腎臓は20種類以上に

も及びそれぞれが機能分化した細胞集団から構成され、また解剖学上も非常に複雑な臓器であり、現段階では腎臓そのものの再生にはとても及ばない。ES細胞からの腎臓の形成に関する報告としては、Thomson JAらによるマウスES細胞をマウス腎皮膜下に移植すると奇形腫が発生し、その構成は様々な胚葉からなるが、その中に腎系球体も散見されるという *in vivo* の実験報告¹⁾や、Schuldiner MらによるヒトES細胞から胚様体(embryoid body = EB)を形成し、そこに様々な成長因子を添加しレニンなどのマーカーを発現する細胞を誘導したという *in vitro* の実験報告²⁾があるのみである。今回、われわれは特に腎尿細管細胞の再生にターゲットを絞り、マウスES細胞をソースと

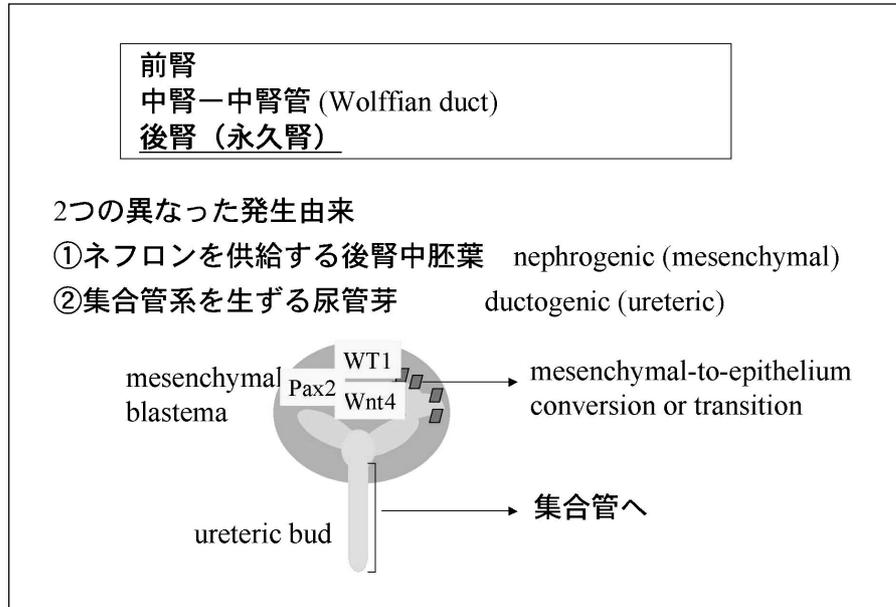


図1 腎臓の発生に関わる因子

して腎尿細管細胞への分化誘導の可能性を検討³⁾した。

腎発生とそれに関わる因子

腎臓の発生について概略を示す(図1)。哺乳類では前腎, 中腎という2つの胎性期の腎臓を経て, 後腎(永久腎)を形成する。後腎は2つの異なった発生由来を持ち, 一つはネフロンを供給する後腎中胚葉であり, もう一方は集合管系を生じる尿管芽(ureteric bud)である。大動脈の外側に nephrogenic cord の最尾側に存在する間葉 mesenchyme にウォルフ管(Wolffian duct)から伸長した尿管芽が到達することにより腎の発生がはじまる。間葉細胞(mesenchymal cell)は尿管芽分岐(ureteric bud branch)の先端に集合し細胞塊を形成する。さらに固まりとなった間葉細胞は尿管芽との相互作用により起こる mesenchymal-to-epithelial conversion により上皮細胞へと転化し, comma-shaped body, S-shaped body を経て糸球体上皮細胞, 近位尿細管から遠位尿細管となる。逆に尿管芽は間葉細胞の存在により branching morphogenesis が促進され, 集合管へと分化する。このように腎臓は中胚葉由来の尿管芽と間葉細胞の相互作用により形成される⁴⁾。

この組織構築には様々な転写因子の関与が報告され, それら転写因子遺伝子ノックアウトマウスの解析などによって腎低形成や機能不全などが認められる。Renal-coloboma 症候群は腎低形成と視神経・網膜の異常を示す症候群であるが, 転写制御因子の一つである Pax2 遺伝子の変異によりことが明らかにされている。Pax2 遺伝子のヘテロ異常マウスは腎の低形成を呈し, ホモ異常マウスは腎, 尿管,

生殖器が全く形成されず出生後すぐ死亡する⁵⁾。WT-1 は Wilms' tumor の発生に関与することが知られているが, WT-1 のノックアウトマウスでは尿管芽への出芽シグナルが発生せず後腎の形成がみられない⁶⁾。また, Wnt4 は間葉細胞由来の上皮細胞(condensation, comma-shaped body, S-shaped body)で発現しているが, Wnt4 ノックアウトマウスでは, 尿管芽の形成・腎間葉細胞への貫入など後腎発生の初期過程はみられるものの, 間葉細胞の上皮化が起こらないため機能ネフロンがみられない。

一方, われわれは急性腎不全回復期における Wnt4 の発現をラットの虚血再灌流モデルでの実験により確認し報告している⁷⁾。このように Wnt4 は腎発生過程においても, また急性腎不全回復期での尿細管においても重要な役割を担うと考えられ, とくに Wnt4 を ES 細胞へ遺伝子導入することによって, 尿細管細胞への分化誘導を試みた。

マウスES細胞の培養方法とWnt4-ES細胞の作製

マウス ES 細胞は, leukemia inhibitory factor(LIF)の存在下では未分化状態を維持するが, LIF を除き分化条件を整えると様々な分化の方向へと進む特性がある。培養方法としては懸滴培養法(hanging drop culture method)を用いた(図2)。2日間の懸滴培養にて ES 細胞より胚様体(EB body)を形成し, それをゼラチンコート皿に播種した。一方, ES 細胞に Wnt4 プラスミドをエレクトロポレーションにより導入した ES 細胞(Wnt4-ES 細胞)を作成し, それをソースとして同様に分化培養を行った。Wnt4 プラスミドにはゲ

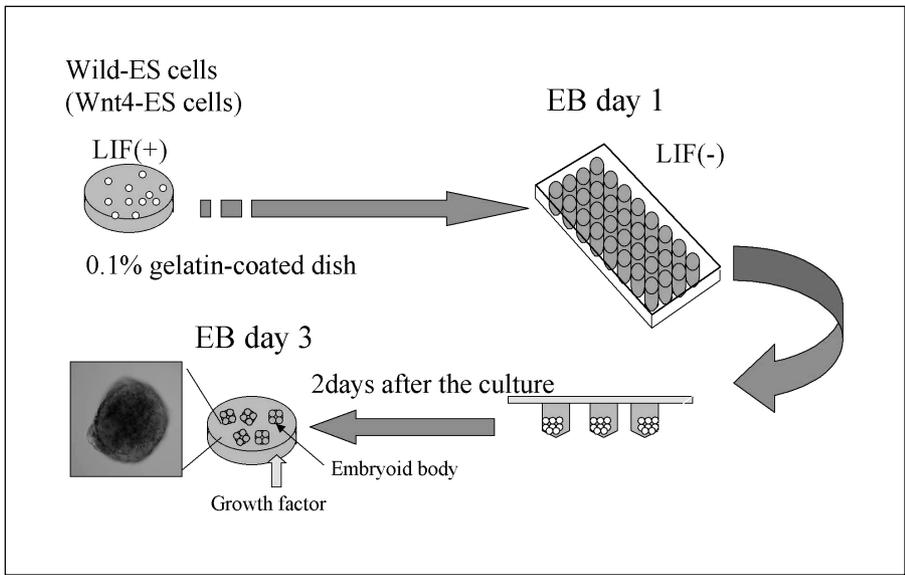


図2 懸滴細胞培養法

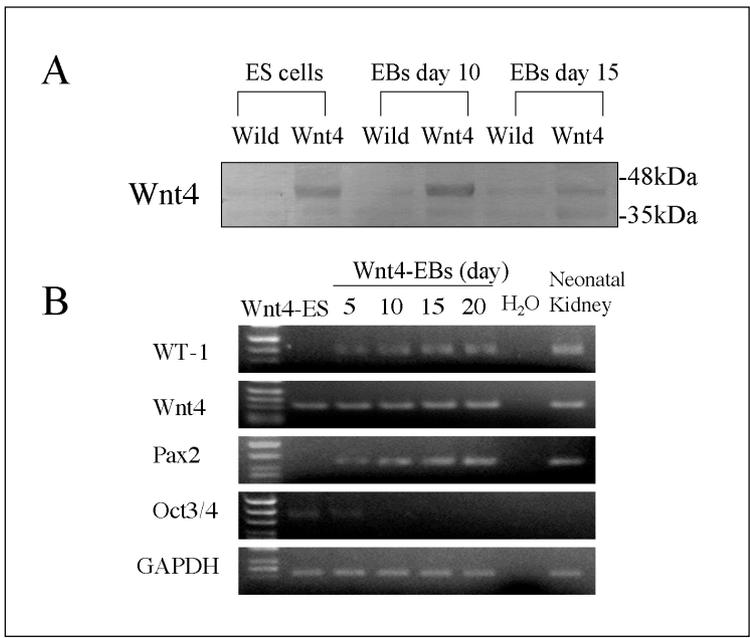


図3 Wnt4-ES細胞の作製と腎発生に関する遺伝子発現
 A: Wnt4 の蛋白発現
 B: Wnt4-ES細胞における腎発生マーカーの発現

ネチシン耐性遺伝子が組み込まれている .ピックアップしたコロニーを培養し ,Wnt4蛋白発現をWestern blotにより確認した . Wild-type-ES 細胞は ,蛋白レベルではWnt4の発現を確認できないが ,われわれが作成した Wnt4-ES 細胞ならびにWnt4-EBではともにWnt4の発現を確認できた (図3) .

マウスES細胞から腎に關与する因子の発現誘導

ES細胞 ,EB細胞から一定の間隔でRNAを抽出し ,RT-

PCRにて腎臓発生に關与する Wnt4 , WT1 , Pax2 などの mRNA 発現を検討した . Wnt4 , WT-1 , Pax2 はともに Wild-type-ES 細胞では発現していないが , Wild-type -EB 細胞 day 5-20 において発現が認められた (図3) . さらに , 尿細管細胞のマーカーである AQP2 , Tamm-Horsfall glycoprotein , kidney-specific androgen binding protein (KAP) などについても同様に検討したが , それらは Wild-type-ES 細胞や Wild-type -EB細胞においても全く発現を認めなかった . そこで , 尿細管再生に關与すると考えられる数々の成長因子を培地中に添加することを試みた . HGF と Activin A によ

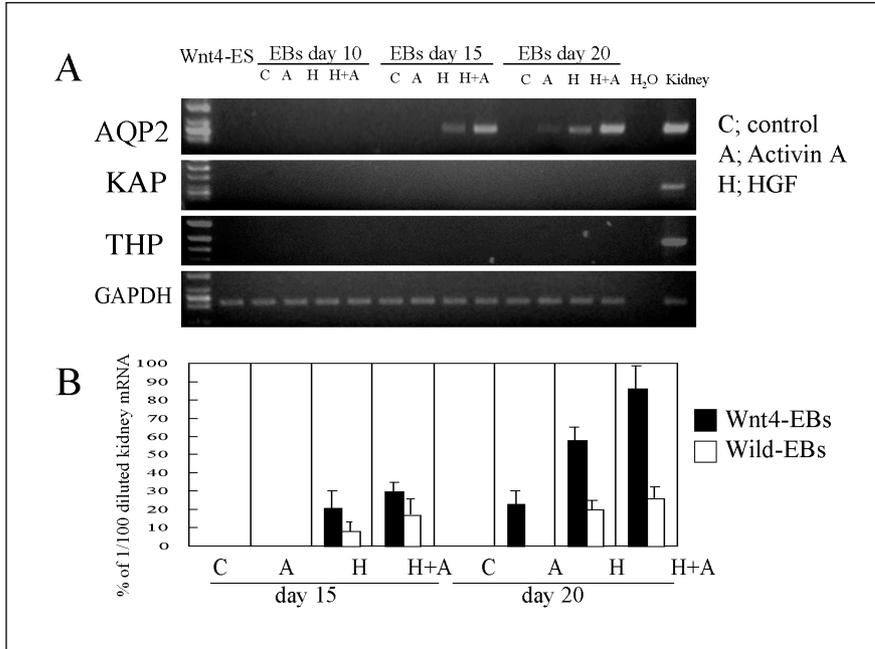


図4 Wnt4-ES細胞によるAQP2発現の検討

A: HGF, Activin A添加 Wnt4-EB細胞におけるAQP2の発現
B: real-time PCRによるAQP2発現の定量

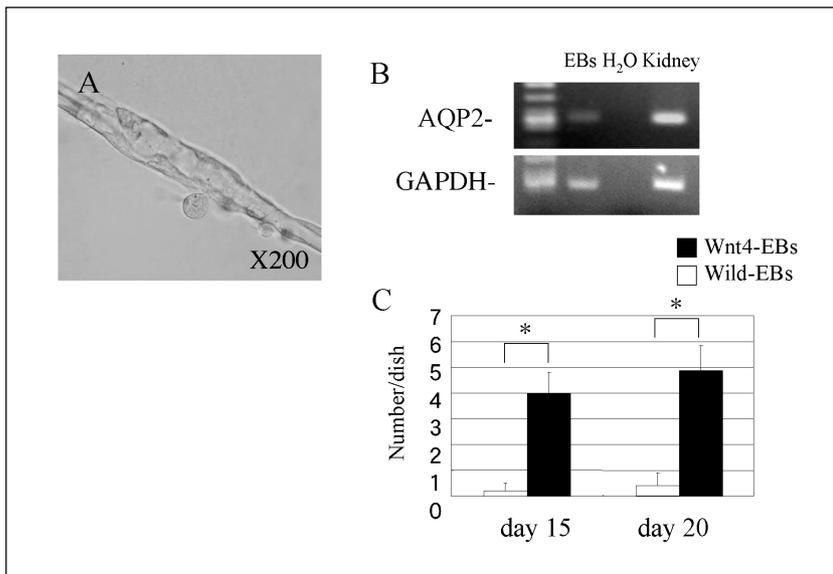


図5 MatrigelによるWnt4-EB細胞の3次元培養

A: 3次元培養におけるWnt4-EB細胞由来の管腔構造
B: 管腔構造のAQP2のmRNAレベルでの発現
C: Wnt4-ES細胞とWild-type-ES細胞における管腔構造数

りAQP2の高い発現が認められた。HGF単独添加でもわずかにAQP2の発現は認められたが、Activin Aを加えた方がより強い誘導が認められた。しかし、他の尿細管マーカーについては、われわれが検討した組み合わせでは全く発現誘導ができなかった。次に、Wnt4-ESを使用し同様な検討を行ったところ、mRNAレベルではWnt4発現は上昇していたが、Pax2, WT-1にはWild-type-ES細胞と比べ明らかな差が認められなかった。しかし、尿細管細胞のマーカー発現は成長因子添加なしでは認められなかったが、AQP2に関してはHGFとActivin Aにより、Wild-type-ES細胞

に比べ顕著な発現が認められた。Real-time PCRによる検討では、HGFとActivin Aの添加によってWnt4-EBにおけるAQP2のmRNA発現量がWild-type-EBに比べてday 15で1.7倍、day 20で3.3倍に増加していることが確認された(図4)。

3次元培養

2次元平面上での培養では、形態学的違いははっきりしないため、3次元培養を試みた。われわれが用いたMatrigelは4にて液体状になり、37ではゲル化する特性を持

つ．そこに EB day 5 をトリプシン処理し単離した細胞を播種し培養した．すると，図 5A に示すような管腔構造が一定の割合で認められ，かつその管腔構造は RT-PCR において mRNA レベルで AQP2 を発現していることが確認された．管腔構造を示すものは，Wnt4-ES を使用した系のほうが，Wild-type-ES 細胞を使用した系に比べて優位に多数認められた．

まとめ

マウス ES 細胞を LIF を除いた分化培地にて EB 形成後，接着培養することによって腎臓発生に関与する遺伝子群の発現がみられるようになった．しかし，尿細管細胞に特異的な遺伝子発現には Wnt4 遺伝子の導入に加え，さらに HGF, Activin A などの成長因子が分化促進因子として必要であった．Wnt4 自体は集合管の原器となる尿管芽には発現しておらず，なぜ Wnt4 遺伝子導入 ES 細胞に HGF, Activin A などの成長因子を添加することで AQP2 の発現が促されたかという問題は未解明である．われわれは，Wnt4 は分泌蛋白であり，Wnt4 遺伝子発現が直接 ES 細胞に変化を与えたというより，隣接する細胞から分泌された Wnt4 蛋白の影響を受け尿細管細胞分化へと誘導されたのではないかと推察している．形態的には，3次元培養により Wnt4-EB 細胞が管腔構造を呈することから足場の重要性が示唆された．特定の細胞への分化には，それぞれに適した遺伝子導入，成長因子添加，足場確保が必要であると考えられた．

われわれが用いた実験系では，他の尿細管マーカーである Tamm-Horsfall glycoprotein や KAP は全く陽性とならず，これは実験系がそれらの誘導に不適であるためと推

定される．さらに目的とする細胞に効率良く分化させるには，今後のより一層の検討が必要である．

文献

- 1) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147, 1998.
- 2) Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N: Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 11307-11312, 2000.
- 3) Kobayashi T, Tanaka H, Kuwana H, Inoshita S, Teraoka H, Sasaki S, Terada Y: Wnt4-transformed mouse embryonic stem cells differentiate into renal tubular cells. *Biochem Biophys Res Commun*, (in press), 2005.
- 4) 長田道夫: ネフロン形成の分子制御 .腎と透析, 51(5): 569-577, 2001.
- 5) Torres M, Gomez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P: Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development*, 121: 4057-4065, 1995.
- 6) Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R: WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 74: 679-691, 1993.
- 7) Terada Y, Tanaka H, Okado T, Shimamura H, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S: Expression and function of the developmental gene Wnt-4 during experimental acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol*, 14: 1223-1233, 2003.