

PAX2 遺伝子変異患者における iPS 細胞樹立と後腎ネフロン前駆細胞への分化に関する研究

酒巻裕一 金子佳賢 成田一衛

新潟大学大学院医歯学総合研究科腎・膠原病内科

key words : PAX2, iPS, 後腎ネフロン前駆細胞

要 旨

腎コロボーマ症候群 (RCS) における PAX2 遺伝子異常が、胎生期のヒト後腎ネフロン前駆細胞への分化に及ぼす影響を調べるため、RCS 患者末梢血 T リンパ球から人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) を樹立し、後腎ネフロン前駆細胞への分化の過程で発現する遺伝子群を健常者と比較した。iPS 細胞からの分化開始 11 日目、14 日目で見られる発現遺伝子には差がみられず、ヘテロの PAX2 変異では後腎ネフロン前駆細胞への分化は影響を受けないと考えられた。

1 目 的

腎コロボーマ症候群 (RCS) は常染色体優性遺伝形式を示し、コロボーマにみられる視神経形成異常と腎の低形成をその症状とする¹⁾。RCS は Weaver らにより 1988 年に、間質性腎炎を伴う末期腎不全と、視神経コロボーマを呈する 2 人の兄弟の症例報告として初めて報告された²⁾。paired-box 遺伝子 PAX2 の遺伝子変異が RCS 発症の原因遺伝子であることが Sanyanusin らによって同定され³⁾、今日では約半数の RCS 患者は PAX2 の遺伝子変異をヘテロで有すると報告されている^{4,5)}。

PAX2 は paired-box 転写因子ファミリーに属する九つの遺伝子のうちの一つであり、後腎ネフロン前駆細

胞、尿管芽、S 字体に発現し、胎生期のネフロン形成に必須の遺伝子である^{6,7)}。ヒトにおける胎生期の最初の 1 カ月、マウスでは胎生期 8~10.5 日に、後腎輸管細胞において PAX2 と PAX8 遺伝子の強い発現がみられる。その後ヒトでは 4 週後、マウスでは胎生 10.5 日に PAX2 遺伝子が造後腎組織において Wilms' tumor suppressor gene (WT) 1 を活性化させる。WT1 遺伝子を欠損したマウスでは、造後腎組織はアポトーシスに陥り、尿管芽はウォルフ管から発生できないことから、WT1 遺伝子の活性化は後腎形成に必須であると考えられている。その後尿管芽が後腎間葉に浸透し、分枝するさいに再度 PAX2 遺伝子が強く発現する⁸⁾。PAX2 遺伝子異常をヘテロで有するマウスでは、胎生 15 日目における腎サイズは正常の 6 割に減少しており、発生段階でアポトーシスが誘導されるため、ネフロン数の減少を認めることが報告されている^{9,10)}。しかし、後腎ネフロン前駆細胞への分化における PAX2 遺伝子異常の影響については明らかにされていない。

そこで我々は、PAX2 遺伝子異常をヘテロで有している場合に、ヒト後腎ネフロン前駆細胞への分化にどのような影響を及ぼしているかを明らかにするために、RCS 患者末梢血 T リンパ球から iPS 細胞を樹立し、後腎ネフロン前駆細胞への分化の過程で発現する遺伝子群を、健常者と比較した。

2 方法

本研究はヘルシンキ宣言に則り、新潟大学医歯学総合病院倫理審査委員会にて承認された（承認番号 1743）。文書によるインフォームドコンセントをすべての研究参加者から取得した。RCS 患者家系は父である Pt1, その長男 Pt2, 次男 Pt3 から構成される。PAX2 遺伝子変異は、ゲノム DNA を用いたサンガーシーケンス法にて確認され、すべての RCS 患者の PAX2 遺伝子の第 75 番目の塩基にグアニンの挿入をヘテロで認めており、その下流で停止コドンを形成している。Pt2 および Pt3 の母には PAX2 遺伝子変異は認めなかった。

末梢血 T リンパ球に初期化遺伝子を導入して iPS 細胞株を樹立するため、Okita らの報告する方法を用いた¹¹⁾。すなわち、RCS 患者 3 名および対照としての健常者 3 名から末梢血 5 ml を採取し、同量のリン酸緩衝生理食塩液で希釈した後、Ficoll-Paque 溶液に重層して 800 g で 30 分間遠心分離し、末梢血中の単核球を分離した。この単核球 3×10^6 個を電気穿孔し、発現ベクター pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL を用いて形質転換し、iPS 細胞を作成するために必要な初期化遺伝子を導入した。これら単核球は抗ヒト CD3, CD28 抗体およびヒト IL-2 (30 U/ml) の存在下で培養を開始し、培養 2 日目よりヒト塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF), Y27632 を添加した。培養 16 日から 25 日目にかけて iPS 細胞コロニーを採取し、マイトマイシン C 処理済みマウス胎仔由来線維芽細胞をフィーダーとして用いて iPS 細胞株を樹立した。

樹立した iPS 細胞の未分化能を確認するため、これら iPS 細胞を 4% パラフォルムアルデヒド含有リン酸緩衝生理食塩液にて固定し、マウス抗 SSEA4 抗体およびマウス抗 OCT3/4 抗体を用いて免疫染色を行い、

テトラメチルローダミン標識抗マウス抗体を二次抗体として用いて検出を行った。

RCS 患者および健常者由来の iPS 細胞を後腎ネフロン前駆細胞に分化させるために、Taguchi らの報告する手法を用いた⁶⁾。すなわち、上記方法にて培養継続している iPS 細胞株をコラゲナーゼ処理し、フィーダー細胞を除去した後、B27[®] サプリメント, L グルタミン, インスリン-トランスフェリン-亜セレン酸ナトリウム, 非必須アミノ酸, β メルカプトエタノール, ペニシリン・ストレプトマイシン, ヒト骨形成因子 (BMP) 4, Y27632 を含有する DMEM/F12 培養液 (レチノイン酸非含有) を用い、Aggre Well[™] 800 microwell plate にて培養を行った。24 時間後 (day 1) にヒトアクチビン A (1 ng/ml), ヒト bFGF (20 ng/ml) を含む培養液に交換し、さらに 48 時間後 (day 3) にヒト bFGF (1 ng/ml), CHIR (10 μ M) を含む培養液に交換した。その後 day 5, day 7 に培養液の半量交換を行い、day 9 にはヒトアクチビン A (10 ng/ml), ヒト BMP4 (3 ng/ml), CHIR (3 μ M), レチノイン酸 (0.1 μ M), Y27632 (10 μ M) を含む培養液に交換した。Day 11 には CHIR (1 μ M), ヒト線維芽細胞成長因子 (FGF) 9 (5 ng/ml), Y27632 (10 μ M) を含む培養液に交換した。

上記手法にて分化させた細胞を day 0, day 11, day 14 にて回収し、発現遺伝子解析に用いた。発現遺伝子解析には、上記にて回収した細胞から RNA を抽出し、タカラバイオ社の Thermal Cycler Dice Real Time System II with One Step SYBR PrimeScript Plus RT-PCR Kit を用いて RNA から cDNA への逆転写を行い、特異的塩基配列を持つプライマーを用いて PCR を行い、 β アクチン遺伝子との発現量と比較することにより、遺伝子発現の比較定量を行った。使用したプライマーの塩基配列を表 1 に示す。

統計量は平均値 \pm 標準偏差で表示した。Day 0, day

表 1 定量的リアルタイム RT-PCR に使用したプライマー一覧

遺伝子	Sense (5'-3')	Antisense (3'-5')
β actin	AGAGCCTCGCCTTTGCCGAT	GTTGGTGACGATGCCGTGCT
PAX2	CGGCTGTGTCAGCAAAATCC	CAGGCGAACATAGTCGGGTT
WT1	GAGCGATAACCACACAACGC	ACACGTCGCACATCCTGAAT
HOXA10	CTACGACTCGGCGGACAAAT	GAGAAAGGCGGAAGTAGCCA
HOXA11	TTTGATGAGCGTGGTCCCTG	AGTATGTCATTGGGCGCGAA
SIX2	AAGGCACACTACATCGAGGC	CGCTGCGACTCTTTTCCTTG
OSR1	TCCCTGGTTCCTCATGTCA	CGGATCTTCTTGCGTTGCTG

11, day 14 各々での RCS 患者群と対照群との比較は、対応のない *t* 検定を使用し、 $p < 0.05$ を有意とした。

3 結果

RCS 患者 Pt1, Pt2, Pt3 の 3 名、および対照として

の健常者 C1, C2, C3 の 3 名の末梢血 T リンパ球を抽出し、*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *LIN28*, *EBNA1* 遺伝子および *TP53* の shRNA を導入し、iPS 細胞を樹立した。これら iPS 細胞株の未分化能につき、SSEA4 ならびに *OCT3/4* の発現を確認した (図 1)。

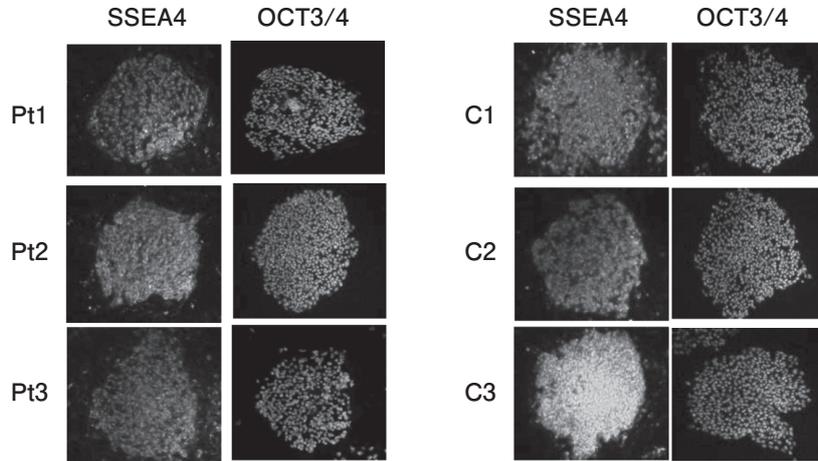


図 1

RCS 患者 (Pt1, Pt2, Pt3) および健常者由来の iPS 細胞 (C1, C2, C3) をそれぞれ抗 SSEA4 抗体、抗 *OCT3/4* 抗体を用いて免疫染色を行い、SSEA4 陽性、*OCT3/4* 陽性であることから、未分化能を確認した。

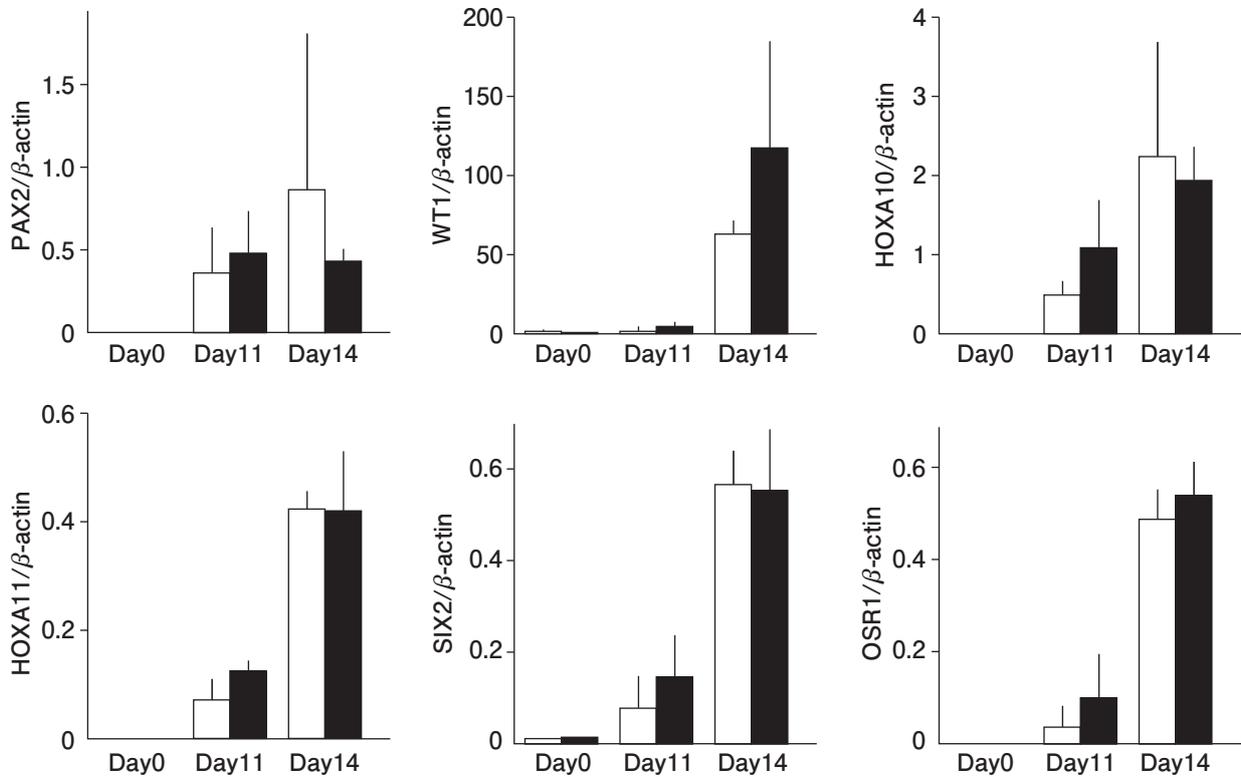


図 2

RCS 患者および健常者由来の iPS 細胞をそれぞれ後腎ネフロン前駆細胞へ分化させ、day 0, day 11, day 14 にて RNA を採取し、定量的リアルタイム PCR 法にて β アクチンに対する *PAX2*, *WT1*, *HOXA10*, *HOXA11*, *SIX2*, *OSR1* の発現量を比較定量した。白、RCS 患者由来; 黒、健常者由来。

これらの RCS 患者由来 iPS 細胞および健常者由来対照 iPS 細胞を、それぞれ BMP, アクチビン, FGF と反応させ、原外胚葉へと分化させた。ついで、BMP および高濃度の Wnt アゴニストと反応させることで後初期中胚葉へと分化させ、さらにレチノイン酸, アクチビンと反応させて day 11 に後中間中胚葉へと分化を誘導した。最後に FGF9 と少量の Wnt アゴニストを反応させ、day 14 に後腎ネフロン前駆細胞へと分化させた。

我々は day 0, day 11 および day 14 で細胞を回収し、ネフロン前駆細胞に特徴的な発現遺伝子である *PAX2*, *WT1*, *HOXA10*, *HOXA11*, *SIX2*, *OSR1* の発現を、定量的 RT-PCR を行い RCS 患者群と対照群とで比較したが、これら遺伝子の発現量に有意な違いはみられなかった (図 2)。

4 考察

2006 年に山中らの研究グループにより、皮膚から採取した線維芽細胞に初期化遺伝子を導入することにより、種々の細胞に分化しうる分化万能性を持つ iPS 細胞を誘導する技術が確立され、報告された¹²⁾。ただし、従来は皮膚切開を加えて皮膚組織を剥離し、増殖した皮膚由来線維芽細胞に初期化遺伝子を導入して iPS 細胞が作成されてきたが、被験者への侵襲が大きいものであった。しかし最近になり、末梢血 T リンパ球に初期化遺伝子を導入して iPS 細胞を誘導する技術が報告され、さらにウイルスベクターを使わずに遺伝子を導入することにより¹¹⁾、被験者への負担を大きく軽減させ、簡便かつ安全に iPS 細胞を誘導することが可能となった。

そこで我々は、RCS 患者および健常人から末梢血 T リンパ球を採取し、初期化遺伝子を導入して iPS 細胞を誘導し、さらに後腎ネフロン前駆体へと分化させる過程において *PAX2* 遺伝子異常がもたらす影響を明らかにするため、本研究を行った。我々が作製した iPS 細胞株は、in vivo での奇形腫形成能は確認されていないが、iPS 細胞の未分化マーカーである SSEA4, OCT3/4 が陽性であることから、多分化能を有する iPS 細胞として研究に使用した。

Taguchi らの報告では、ヒト iPS 細胞から後腎ネフロン前駆細胞への分化の過程で、day 11 には後中間中胚葉の性質を獲得し、その後 FGF9 と Wnt アゴニス

トによって day 14 には後腎間葉へと誘導される。そのさいの *PAX2*, *WT1*, *HOXA10*, *HOXA11*, *SIX2*, *OSR1* の発現は、既報の通りであり⁶⁾、RCS 患者群と対照群とで差は見られなかった (図 2)。RCS 患者群での *PAX2* 遺伝子発現が対照群と比較して差が見られないのは、一塩基挿入では RT-PCR 反応に影響を及ぼさないためと考えられる。また、*WT1* 遺伝子の活性化には *PAX2* が必須であるが、我々の研究結果からは、後腎間葉への分化には正常の *PAX2* 遺伝子がヘテロで存在するだけで充分であると推察された。むしろ、その後尿管芽が後腎間葉に浸透し、分枝するさいに再度 *PAX2* 遺伝子が強く発現する段階において、ヘテロの遺伝子異常がネフロンや腎の低形成につながる可能性が考えられ、今後の研究課題であると思われる。

5 結論

iPS 細胞から後腎ネフロン前駆細胞への分化の過程において、分化開始後 11 日目、14 日目でみられる後腎ネフロン前駆細胞特異的発現遺伝子には差がみられず、ヘテロの *PAX2* 遺伝子変異は後腎ネフロン前駆細胞への分化に影響を与えないと考えられた。

平成 26 年度日本透析医会公募研究助成により得られた成果は、原著論文として学術誌に投稿予定であるため、二重投稿となることを避け、本報告書ではその概要を総説的に記載した。

文 献

- 1) Schimmenti LA : Renal coloboma syndrome. *Eur J Hum Genet* 2011; 19 : 1207-1212.
- 2) Weaver RG, Cashwell LF, Lorentz W, et al. : Optic nerve coloboma associated with renal disease. *Am J Med Genet* 1988; 29 : 597-605.
- 3) Sanyanusin P, Schimmenti LA, McNoe LA, et al. : Mutation of the *PAX2* gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nat Genet* 1995; 9 : 358-364.
- 4) Dureau P, Attie-Bitach T, Salomon R, et al. : Renal coloboma syndrome. *Ophthalmology* 2001; 108 : 1912-1916.
- 5) Bower M, Salomon R, Allanson J, et al. : Update of *PAX2* mutations in renal coloboma syndrome and establishment of a locus-specific database. *Hum Mutat* 2011; 33 : 457-466.
- 6) Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, et al. : Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell*

- Stem Cell 2014; 14 : 53-67.
- 7) Dziarmaga A, Quinlan J, Goodyer P : Renal hypoplasia: lessons from PAX2. *Pediatr Nephrol* 2006; 21: 26-31.
 - 8) Clark P, Dziarmaga A, Eccles M, et al. : Rescue of defective branching nephrogenesis in renal-coloboma syndrome by the caspase inhibitor, Z-VAD-fmk. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 : 299-305.
 - 9) Favor J, Sandulache R, Neuhäuser-Klaus A, et al. : The mouse *PAX2*^{1Neu} mutation is identical to human *PAX2* mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in development defects of the brain, ear, eye and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93 : 13870-13875.
 - 10) Porteous S, Torban E, Cho NP, et al. : Primary renal hypoplasia in humans and mice with *PAX2* mutations : evidence of increased apoptosis in fetal kidneys of *PAX2*^{1Neu} + / - mutant mice. *Hum Mol Genet* 2000; 9 : 1-11.
 - 11) Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, et al. : An efficient non-viral method to generate integration-free human iPS cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells* 2013; 31 : 458-466.
 - 12) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 663-676.