

発生期腎臓における angiogenesis の
解析および腎組織の再構築

2016年1月

西村 裕介

発生期腎臓における angiogenesis の解析および
腎組織の再構築

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生命産業科学専攻
博士（生物工学）学位論文

西村 裕介

目次

第1章 序論	6
1-1 腎臓	6
1-1-1 腎臓の構造と機能	6
1-1-2 腎臓の発生	9
1-2 腎臓の再生	14
1-3 血管	15
1-3-1 血管の構造と機能	15
1-3-2 血管形成メカニズム	17
1-3-3 血管内皮細胞の起源	17
1-3-4 胎仔期における血管形成	20
1-3-5 脊椎動物における造血の発生	20
1-3-6 成熟期における angiogenesis	20
1-3-7 腎発生期糸球体毛細血管網の形成	21
1-4 血管形成の中心的役割を担うマーカー	22
1-4-1 VEGF	22
1-4-2 VEGF 受容体	22
1-4-3 Angiopoietin と Tie システム	23
1-4-4 PECAM-1	23
1-4-5 Brachyury	23
1-4-6 EphrinB2 と EphB4	24
1-5 糸球体内皮細胞における主な血管マーカー	24
1-6 壁細胞(血管平滑筋・ペリサイト)の起源	24
1-6-血管平滑筋分化調節分子	25
第2章 発生期腎臓における angiogenesis の解明と役割	31
2-1 研究概要	31
2-2 実験動物について	31
2-3 材料と方法	31
2-4 発生腎血管の形態観察	31
2-5 血管鑄型法	32
2-5-1 胎仔の摘出	32
2-5-2 Mercocox の調合と注入	32
2-5-3 組織腐食および導電性	32
2-5-4 SEM 観察	32
2-6 墨注入法	32

2-7 墨と血管鋳型注入法	33
2-7-1 scaleA 作成	33
2-7-2 胎仔に混合した樹脂の注入	33
2-8 胎仔心臓拍動下による蛍光色素の注入	33
2-8-1 蛍光色素の準備	33
2-8-2 妊娠マウスの麻酔、蛍光色素注入	33
2-8-3 胎仔から組織を単離・蛍光観察	33
2-9 RT-PCR	33
2-10 実験結果.....	37
2-10-1 胎仔マウス発生腎の明視野観察	37
2-10-2 マウス発生腎における血管鋳型観察	37
2-10-3 胎仔マウスを用いた血管鋳型法の確立	38
2-10-4 胎仔マウスにおける腎血管鋳型	38
2-10-5 墨と血管樹脂による発生腎血管観察	38
2-10-6 胎仔心臓拍動下による蛍光色素の注入による発生腎血管観察	39
2-10-7 RT-PCR による血管細胞関連遺伝子解析	39
2-11 考察.....	40
2-12 発生腎における angiogenesis の必要性	52
2-13 材料と方法	52
2-13-1 大腿血管および背部皮下組織への発生腎移植	52
2-13-2 トマトレクチンによる移植腎臓血管のラベリング	52
2-13-3 免疫蛍光染色	53
2-14 実験結果	54
2-14-1 蛍光灌流による移植腎への angiogenesis	54
2-14-2 angiogenesis による血管形成と糸球体形成	54
2-14-3 各時期の腎臓と移植腎の免疫蛍光染色画像	54
2-14-4 各時期の腎臓と移植腎の糸球体数	55
2-15 考察.....	55
第3章 angiogenesis と vasculogenesis を利用した発生期腎臓組織の再構築	62
3-1 研究概要	62
3-2 材料と方法.....	62
3-2-1 実験動物	62
3-2-2 胎仔の摘出	62
3-2-3 発生腎培養	62
3-2-4 培養腎移植	63
3-2-5 凍結切片の作成	63

3-2-6 HE 染色	63
3-2-7 Whole-mount 発生腎免疫染色	63
3-2-8 免疫蛍光染色	64
3-2-9 共焦点顕微鏡観察	64
3-3 実験結果.....	65
3-3-1 In vitro 培養系における発生腎内部の尿管芽とネフロン前駆体の形成.....	65
3-3-2 In vitro 培養系における発生腎内部の尿管芽、糸球体と血管の形成.....	65
3-3-3 In vitro 培養によるポドサイトマーカの発現と成熟糸球体数	66
3-3-4 In vitro 培養からの移植による腎臓再生	66
3-3-5 移植腎内の免疫蛍光染色	66
3-4 考察.....	67
第 4 章 発生期腎臓細胞を用いた腎組織の再構築	77
4-1 研究概要	77
4-2 材料と方法.....	77
4-3 発生期腎臓組織の単一細胞化	78
4-4 単一細胞からスフェロイド形成と移植	78
4-5 スフェロイド融合化	78
4-6 融合したスフェロイドの同所性移植	78
4-7 凍結切片の作成	79
4-7-1 移植腎の固定・凍結	79
4-7-2 凍結切片の作成	79
4-8 HE 染色.....	79
4-9 スフェロイドの免疫染色.....	79
4-10 免疫蛍光染色	80
4-11 実験結果.....	81
4-11-1 発生腎の単一細胞化とスフェロイド形成と移植	81
4-11-2 RWV によるスフェロイドの融合	81
4-11-3 融合スフェロイドの同所性移植	82
4-11-4 移植スフェロイドの免疫蛍光観察	82
4-11-5 移植スフェロイド内にある糸球体機能	82
4-12 考察.....	82
第 5 章 総括と展望	93
付録 使用した Primer の種類および配列	97
謝辞	98
本論文に関する報告	99
投稿論文	100

参考文献101

第1章 序論

1-1 腎臓

1-1-1 腎臓の構造と機能

腎臓はそのままのような形をした握りこぶしほどの大きさの臓器で、腰部あたりに左右対称に2個存在する。腎臓内部の腎杯と腎盂、腎臓外部の尿管、膀胱、尿道からなる。腎臓内側縁には腎門と呼ばれる窪みがあり、ここから腎動脈、腎静脈、腎盂が腎臓内に侵入している。腎実質は皮質側と髄質側に分かれ、皮質は尿の生成を担う糸球体、ボーマン嚢と尿細管部分からなる。髄質は尿細管の部分と集合管からなる。この糸球体、ボーマン嚢と尿細管の複合体は腎臓機能単位（ネフロン）と呼ばれ、尿の生成と排泄の機能単位とされている。糸球体の周囲をボーマン嚢が包み、尿細管と接合している。糸球体を出入りする血管をそれぞれ輸出細動脈、輸入細動脈と呼び、輸出細動脈は尿細管を取り巻く毛細血管網に接合し、再吸収された水や電解質を血液中に取り込み、静脈へとつながっていく。糸球体は血管内皮細胞と糸球体上皮細胞（足細胞、ポドサイト）、メサンギウム細胞、そして糸球体基底膜から構成され、メサンギウム細胞により産生されるメサンギウム基質と呼ばれる特殊な ECM により支持されている。糸球体の構造はメサンギウムを中心として毛細血管が密集し、その両者の表面を糸球体基底膜が覆い、さらにその上をポドサイトが覆っている。

血漿中の水分などの成分が糸球体毛細血管からボーマン腔へと濾過され、尿細管へと流れる。腎糸球体には3種類の細胞が存在する。糸球体上皮細胞（ポドサイト）、糸球体内皮細胞、メサンギウム細胞である。

ポドサイトは高度に分化した細胞で、増殖能を持たないと考えられている。また、足突起をもつ特徴的な形態をしている。足突起は同一の場所から出現した突起同士で絡み合うことなく、隣り合う細胞の突起と絡み、基底膜の外側を覆っている。この足突起間には25から60 nmの間隙があり、基底膜から60 nm離れた部位にスリット膜と呼ばれる電子密度の高いネフリンという細胞間接着たんぱく質の一種が存在している。このネフリンはアルブミンなどの蛋白質の透過を防ぐ役割を果たしていると考えられている。

糸球体内皮細胞は糸球体毛細血管の内側を一層に覆う細胞である。この糸球体内皮細胞はメサンギウム細胞と細胞間結合なしに接し、糸球体基底膜を挟んでポドサイトと対峙している。血管緊張の調節、凝固、線溶系の制御、炎症免疫反応の制御など他の血管内皮細胞と同様の機能を持つ一方で、濾過を主体とする糸球体の機能維持にも重要な役割を果たしている。特徴は極めて薄い細胞質と多数の有窓構造が挙げられる。ラットの場合 fenestrae は直径60から80 nm（ヒトでは70から100 nm）で毛細血管表面の13%を占めている。この fenestrae の豊富さが血液ろ過を効率よくしていると考えられ

ている。また、細胞表面にある陰性荷電をした糖タンパク質による血管透過性の制御や基底膜成分のヘパラン硫酸プロテオグリカンを合成することもわかっている。

メサングウム細胞は血管平滑筋細胞と由来を同じにする細胞で機能は類似している。具体的には、細胞表面に血管作動性因子であるアンジオテンシンの受容体を発現しており、細胞骨格のアクチンも富んでいるため、弛緩と収縮をすることで血管の径の調節をして、濾過量を調節していることが考えられている。基底膜に結合しているため、糸球体の構造維持をしていることも考えられている。尿細管は糸球体に近い側から近位尿細管、ヘンレループ、遠位尿細管、集合管系に区分される。近位尿細管上皮細胞は表面が微絨毛で覆われており、細胞は細胞小器官に富んでいる。この部分で水分とイオンの約65%は再吸収される。ヘンレループは髄質中で U 字型を呈している。遠位尿細管は髄質外層から皮質に至る部分を指す。髄質部は微絨毛で覆われており、その最終部は必ず元の糸球体に接近し、輸出入細動脈近くに緻密斑を形成する。緻密斑は緻密斑細胞と糸球体外メサングウム細胞、および輸出細動脈の糸球体入り口付近に存在する顆粒細胞は傍糸球体装置と呼ばれている。原尿が尿細管を通る際、チャンネルやトランスポーターを介して尿細管上皮細胞に回収される。この回収された水と電解質は尿細管を取り巻く毛細血管網を通じて血液に戻され、副腎皮質ホルモンや脳下垂体後葉ホルモンによって厳密にコントロールされている。ヒトでは、1 min に約 120 ml という一定の速さで原尿が作られる。そのうちの約 1 ml が尿となる。

Fig. 1 に示す。

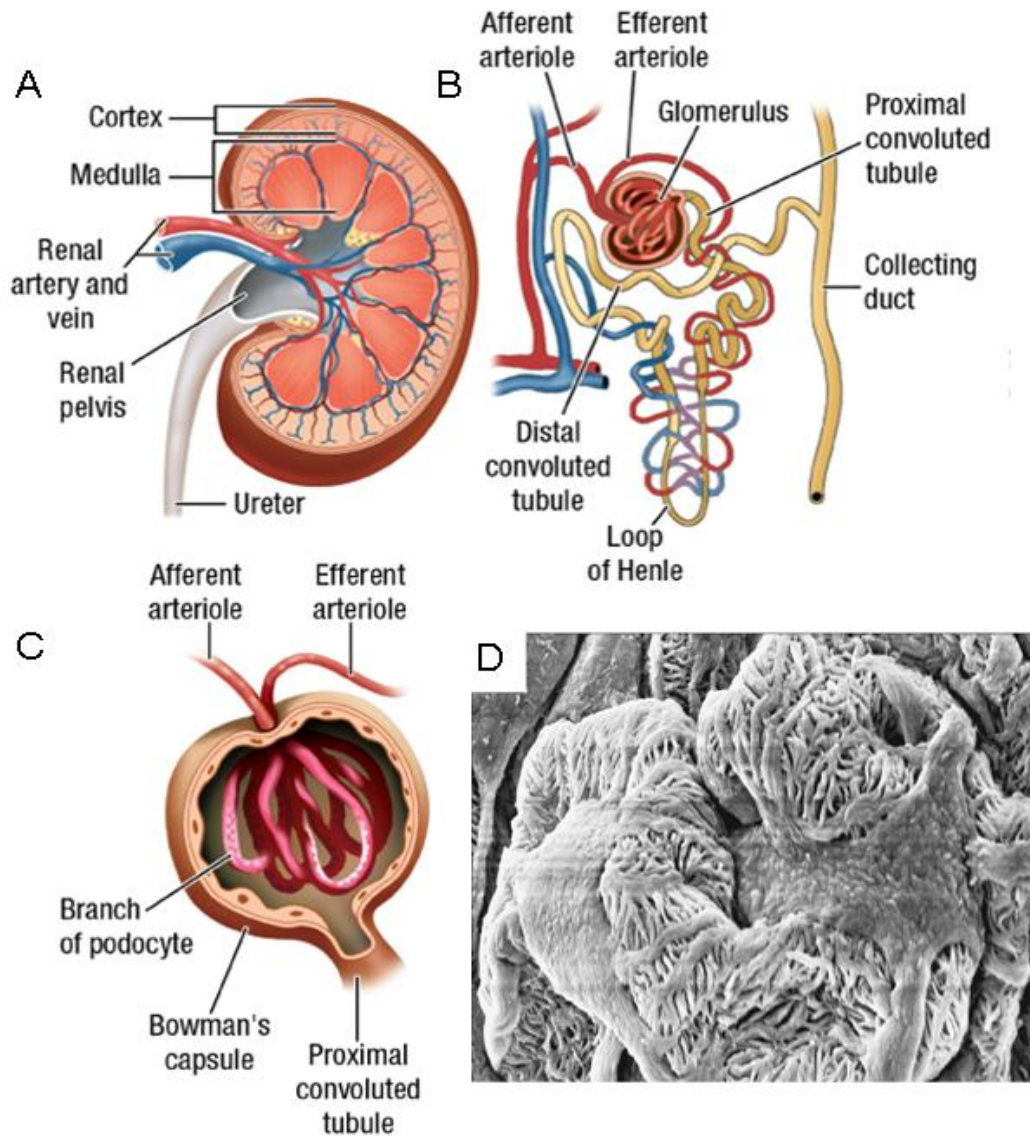


Fig. 1 腎臓の構造

(A) 腎臓, (B) ネフロン, (C) 糸球体, (D) ポドサイト
 (出典 : Longnecker DE et al, Anesthesiology, 2nd edition.
 Macconi et al, AJP, 168, 2006)

1-1-2 腎臓の発生

発生学的に、腎臓は中胚葉の腎節にその起源を持つ臓器である。本来は、脊椎の側面から体を前後に貫く構造であり、前方から前腎 (pronephros)・中腎 (mesonephros)・後腎 (metanephros) に分類することができる。これらは発生期に前者から後者へと順に形成されるが、後のものが形成されるのに応じて前のものは退化し、ヒトを含めた哺乳類においては後腎が永久腎となる。

先に述べたように、1個のネフロンからなる前腎と数十のネフロンを持つ中腎の大部分はアポトーシスにより消失する。前腎からはウォルフ管と呼ばれる管状組織が体軸に沿って尾側に伸展し、このウォルフ管が後に中腎、後腎の形成に関与することとなる。後腎においては、ウォルフ管の最も尾側に尿管芽と言われる突起が出現し、その周辺に間葉組織が集合することで形成される。すなわち、後腎はウォルフ管から分岐した上皮系の尿管芽と後腎間葉系組織の相互作用により形成される[1]。マウスにおける前腎・中腎・後腎の位置関係および模式図を Fig. 2-2 に示す。

後腎発生のステップはまず、①後腎間葉が尿管芽に誘導されることから始まる。その後、②間葉細胞が細胞間接着装置を持ち、vesicle を形成する。vesicle は tight junction を形成し、その細胞間にはラミニンなどの細胞外マトリクスが存在している。次に、③vesicle はコンマ型の凝集体 (コンマシェイプ) を形成する。この過程で間葉細胞の形質から上皮細胞の形質に変化することが知られており、糸球体上皮細胞の前駆細胞が形成される。④コンマシェイプはS字型 (Sシェイプ) に変化する。S字はさらに下部の部分が近位尿細管とヘンレループ、上部は遠位尿細管となり尿管芽と融合。尿管芽は分岐し、最終的には尿管、腎盂、集合管を形成する。S字の下部は半球状となり、この間隙に糸球体内皮細胞とメサンギウム細胞が入り込む。S字の底辺をなす二層の上皮はボーマン嚢およびポドサイト (足細胞) へと分化する。分化する際、cadherin や catenin を失い、nephrin などのスリット膜に関連する分子を発現するようになる。そして、⑤capillary loop 期を経て、成熟糸球体が形成される。後腎間葉組織の周辺部の細胞は間質を形成する。尿管芽が集合管へと分化することで髓質が形成される[2-5]。後腎発生 (糸球体形成) の模式図を Figs. 2, 3 に示す。

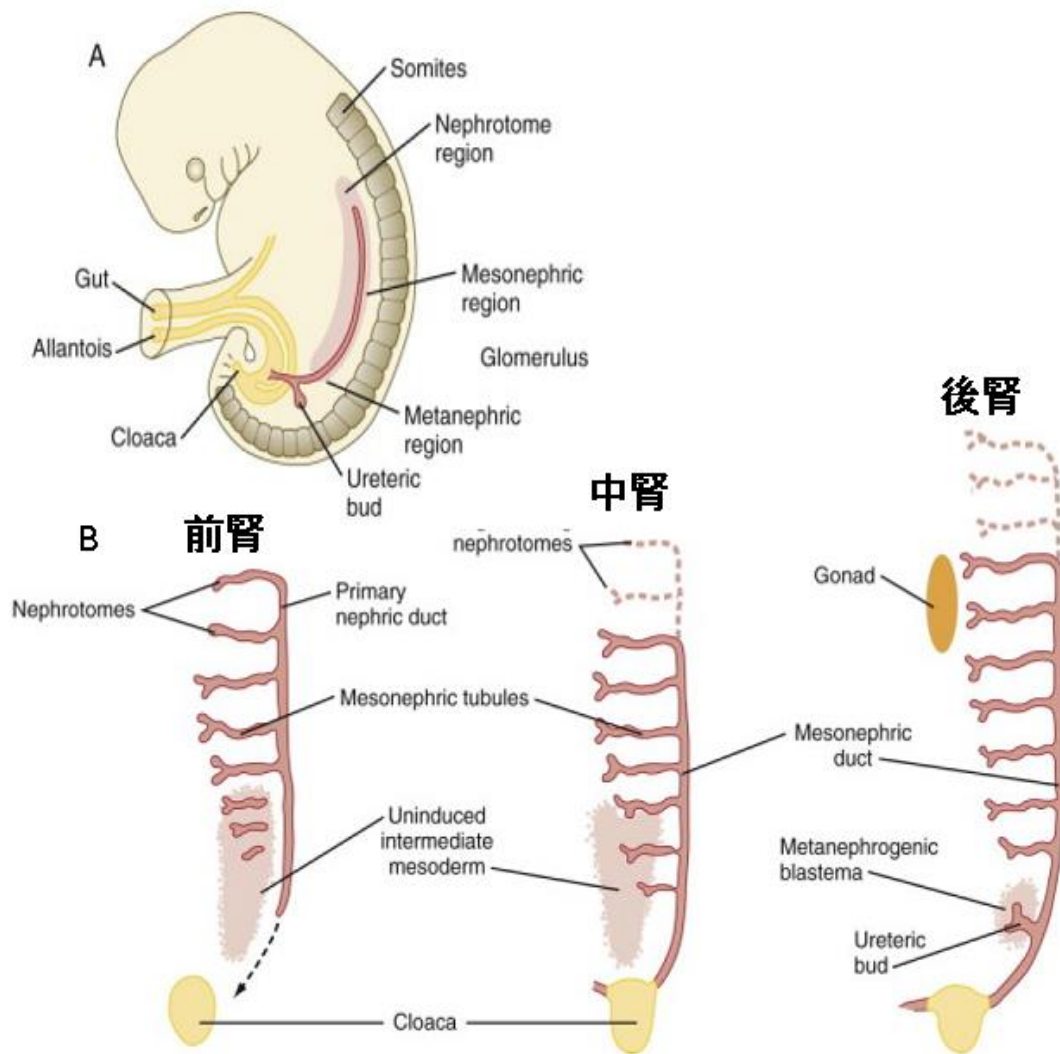


Fig. 2 発生期マウス胎仔の腎臓

(A)マウス胎仔における前腎・中腎・後腎, (B)前腎・中腎・後腎の詳細模式図
 (出典:Carlson BM, Human Embryology and Developmental Biology, 7nd edition)

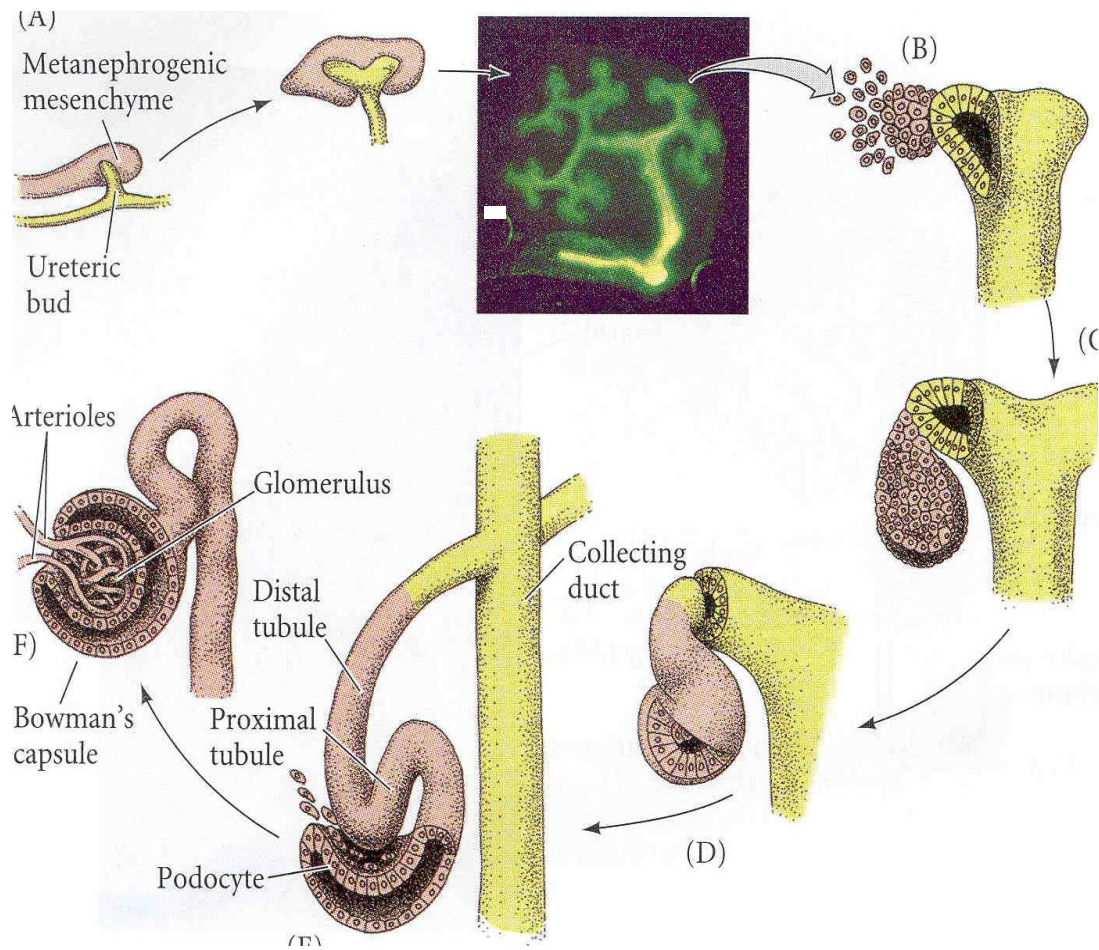


Fig. 3 後腎発生（糸球体形成）の模式図
 (出典: Gilbert SF, *Developmental Biology*, 7nd edition)

腎発生における分子的メカニズムの概要

尿管芽と後腎間葉系組織との相互作用は GDNF/Ret シグナル伝達系によって誘導される。GDNF は後腎間葉系組織に発現している。そのレセプターである Ret (receptor tyrosine kinase) とその共レセプター GRF α は初め、ウォルフ管上皮に発現しており、後に尿管芽の先端部に発現するようになる。GDNF/Ret シグナル伝達系は下流の ERK, MAPK, PI3kinase/ARK そして PLC γ 経路を活性化する。また、Wnt/ β -catenin 経路は RET の発現を制御している。Zn-finger 転写因子である Gata3 は β -catenin の下流因子として、RET の活性化を制御している。BMP4 はウォルフ管周囲の後腎間葉系組織に発現し、ウォルフ管の分枝を抑制している。Gremlin1 は BMP の活性化を抑制することで尿管芽の間葉系組織への侵入を可能にしている。Sprouty1 は ERK の活性化を抑制することにより GDNF によるシグナルの活性化を制御している。そのため、活性化分子である GDNF と抑制分子である Sprouty1 のバランスが重要になる。GDNF により活性化された尿管芽先端の Ret 発現細胞の Wnt11 を活性化する。活性化された Wnt11 は GDNF の発現を強化する [6]。これらの概要を Fig. 4 に示す。

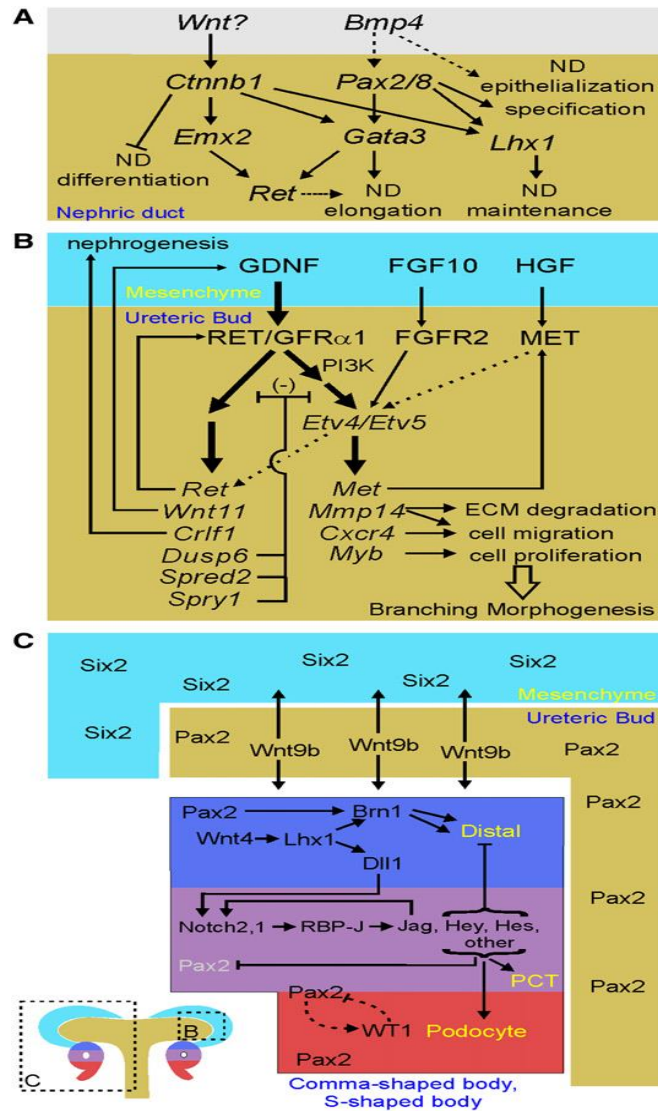


Fig. 4 後腎発生における分子的メカニズム
 (出典 : Costantini F and Kopan R. Dev Cell. 18. 2010)

1-2 腎臓の再生

近年、糖尿病などによる透析患者などは 30 万人に達し腎臓疾患患者数は年々急増している。そしてその医療費は年間 1 兆円を超えている。しかし、現在その有効な対策は人工透析か腎臓移植に限られている。これらの方法は、いずれも患者に与える経済的、肉体的負担が大きい。人工透析は、患者の医療費負担の増加や食事制限、また腎臓移植に関してはドナー不足が深刻であり、臓器売買や病気腎臓移植など社会問題化してきている。また、移植後も免疫抑制剤を服用する必要がある、QOL の低下も問題である。

これらの問題を解決するため最近では、新たな治療方法として再生医療により腎臓の機能を回復させる「腎臓の再生」が考えられ、細胞、Cytokine、ECM に着目する組織工学的手法によってその研究が進んでいる。再生医療では、自己複製可能な幹細胞の利用が想定されている。ES 細胞は、自己複製能と分化全能性をもつ幹細胞であり研究が進んできた。しかし、ヒトの ES 細胞を得るためにはヒトの胚を破壊する必要があるため、生命倫理上の課題や拒絶反応などの問題点が指摘されており、各国で法的に規制が強まってきている。そのため、新たな幹細胞技術開発が進められてきた[7]。そして体細胞から ES 様の幹細胞である iPS 細胞が樹立され、幹細胞の可能性はさらに広がりを見せている。しかし、これらの幹細胞を目的の細胞に分化誘導することは非常に困難である。そのため、様々な臓器に存在する体性幹細胞の研究も進んでいるが、多くの細胞を得ることが困難で増殖能力が限られている場合が多く、まだ幹細胞の存在が完全に証明されていない臓器も存在する。

現在、腎再生医療として、腎臓体性幹細胞を用いた細胞治療や、ハイブリット型人工腎臓、腎臓を脱細胞化する技術など様々な方法が検討されている[8]。ES 細胞によって表皮や角膜を形成することは可能となっているが、いずれの組織も血管系が存在せず、立体的な構造ではなく平面状の組織である。このように、多種の細胞で構成される腎臓を三次元的に構築し、さらに血流や神経支配を適性に構築することは、現時点の技術では不可能に近い。そのため現在、腎臓の再生における当面の目標は、次のような 3 段階再生技術の確立である。それは、第 1 段階として特定の腎臓構成細胞を分化誘導する。第 2 段階として分化誘導した細胞の損傷部位への細胞移植。第 3 段階として生体内で移植細胞の正常な組織化と機能回復という方法である。近年、ES 細胞や iPS 細胞、腎臓幹細胞から糸球体血管や尿細管などネフロン構築に成功した報告がある[9, 10]。しかし、ネフロン構築に成功したが複雑な血管網の形成には成功していない。腎臓の再生を困難にしている要因の 1 つに、腎臓の発生機構に未解明の部分が多い点にある。腎臓は高度に微細で複雑な三次元構造をとっている。しかし、その形態学的特徴の指標となる客観的、定量的データは皆無に等しい。そのため KO マウスなどによる遺伝子機能の解析において、表現型のマクロな変異はわかっても、ミクロな変異を同定することは非常に困難であり、機能を特定することができない。そのため、腎臓発生、分化誘導機構

の形態的、定量的な解析、分子生物学的解析の知見がもとめられている。

1-3 血管

1-3-1 血管の構造と機能

血管の構造は、動脈と静脈という役割の違いやその太さによって異なる。Fig. 5 に示したように、血管構造は、血管の内側を覆っている内膜、平滑筋細胞からなる中膜、そして外膜から構成されている。

血管の役割として、血液を身体の隅々まで過不足なく行き渡らせることである。この機能を心拍動と血管収縮、そして弛緩による調節のみで行っている。循環系では自律神経による支配と、局所における血管緊張の自律的調節が血流分配の重要な役割を果たしている。内皮細胞は血流の強さに応じて一酸化窒素などの血管作動因子を放出することで、バルブである血管平滑筋細胞の収縮、弛緩による局所的な調節を行っている。血管平滑筋細胞自身も血管壁の伸展、弛緩による張力変動を刺激として受容し、張力発生を自己調節している。弾性線維・膠原線維はエラスチン・ミクロフィブリルなどの線維やコラーゲンから成り、血管壁に力学的強度を与えている。

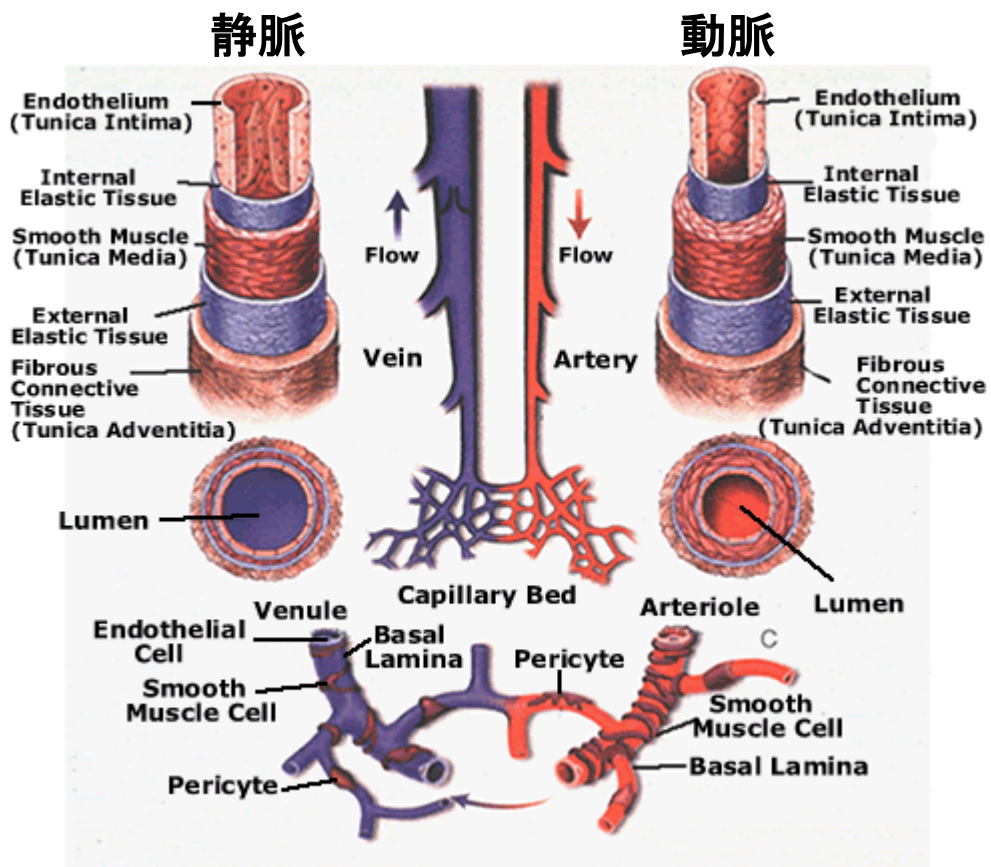


Fig. 5 生体内における血管の構造
 (出典: Cleaver O, Krieg PA. Molecular mechanisms of vascular development. Heart development. 1998)

1-3-2 血管形成メカニズム

血管形成のメカニズムは、一般に脈管形成（**vasculogenesis**）と血管新生（**angiogenesis**）という2つの系に分類される。

脈管形成（**vasculogenesis**）とは、既存の血管の進入なしに、その場で新しく分化した血管内皮細胞が集合することで、あたかも自発的に胎児内で原始的な管腔様構造やそれらの集合体である原始血管嚢を形成する過程である。この過程には、未分化な血管芽細胞（アンジオブラスト：**angioblast**）が成熟した血管内皮細胞に分化するステップも含まれる。上記の脈管形成は、以前は胎児期にのみ生じる過程であると考えられてきたが、出生後の個体内においても骨髄や抹消血中に未分化な血管芽細胞が存在し、虚血局所の新生血管の構築に参加すると報告されたことで、胎仔期に限った現象ではないということが明らかにされた。

もう1つの系である血管新生（**angiogenesis**）には、脈管形成によって形成された原始的な血管が大小の成熟した血管になった後、無血管野へと血管の芽が伸びて細かな血管網が形成されていく発芽的血管新生と、血管の乏しい領域において太い血管が数本の血管に分かれことで血管野を拡張する陥入型の血管新生の2つの過程が存在する。これらの2つの過程はいずれも血管内皮細胞における基底膜・細胞外マトリックスの消化、細胞遊走、血管構造の安定化という現象を含んでいる[10-12]。血管新生（**angiogenesis**）と脈管形成（**vasculogenesis**）の模式図を Fig. 6 に示す。

1-3-3 血管内皮細胞の起源

血管の発生は中胚葉から血球血管芽細胞（ヘマンジオブラスト：**hemangioblast**）(Fig. 7) または血管芽細胞（アンジオブラスト：**angioblast**）とよばれる前駆細胞が分化することによりはじまると考えられている。血球血管芽細胞は血管内皮細胞と血球細胞の両方に分化することができるのに対して、血管芽細胞は血管内皮細胞に分化する。

胚発生の初期、中胚葉誘導に伴い内皮細胞に分化するヘマンジオブラストが出現する。初めに胎児外の組織である卵黄嚢において、側板中胚葉（**lateral plate mesoderm**）に由来するヘマンジオブラストが血島（**blood island**）とよばれる細胞集団を形成する。中心部の細胞は血球細胞に分化し、辺縁部の細胞は血管内皮細胞に分化し、原始血管網を形成する。少し遅れて、胎児内においても内胚葉や体節中胚葉や体節内臓中胚葉（**somatic mesoderm**）などの内胚葉に接した中胚葉に由来する血管芽細胞が血管内皮細胞へと分化し、背側大動脈（**dorsal aorta**）などの血管を形成する。このような中胚葉から原始血管網が形成される過程は脈管形成（**vasculogenesis**）と呼ばれている。

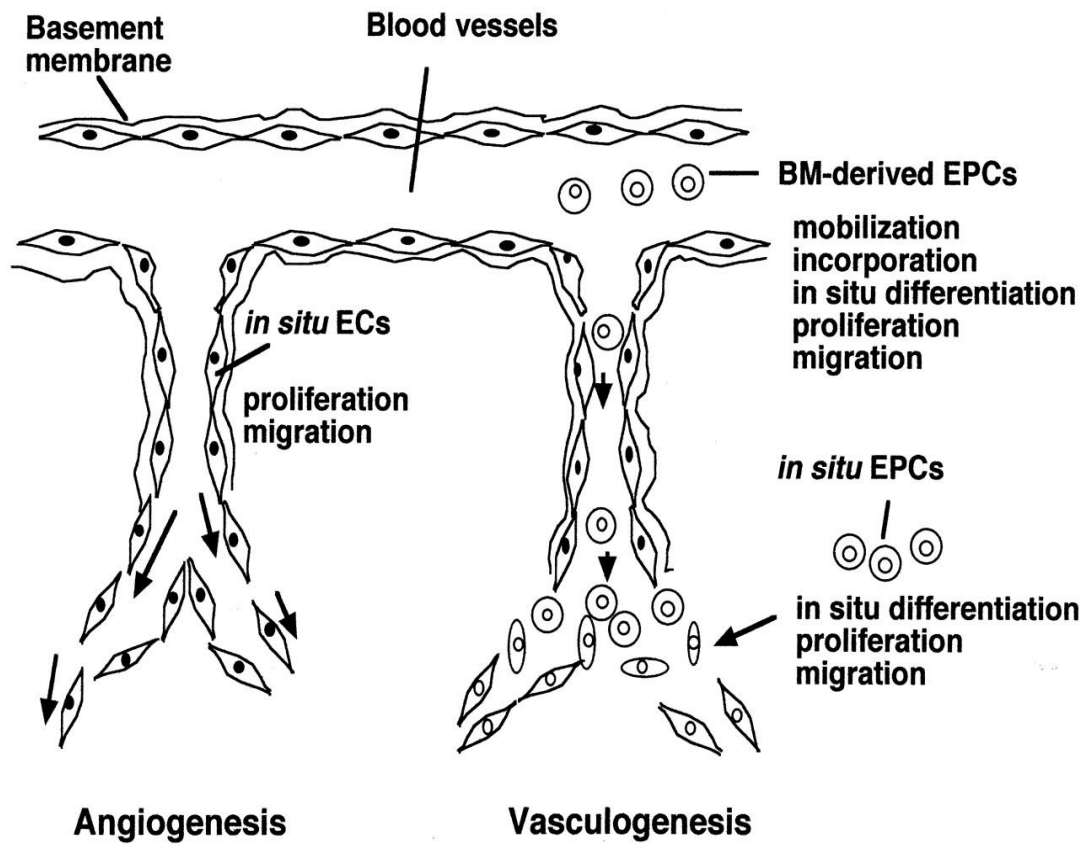


Fig. 6 血管形成の概略図

(出典: Masuda H et al. Cardiovasc Res. 58. 2003)

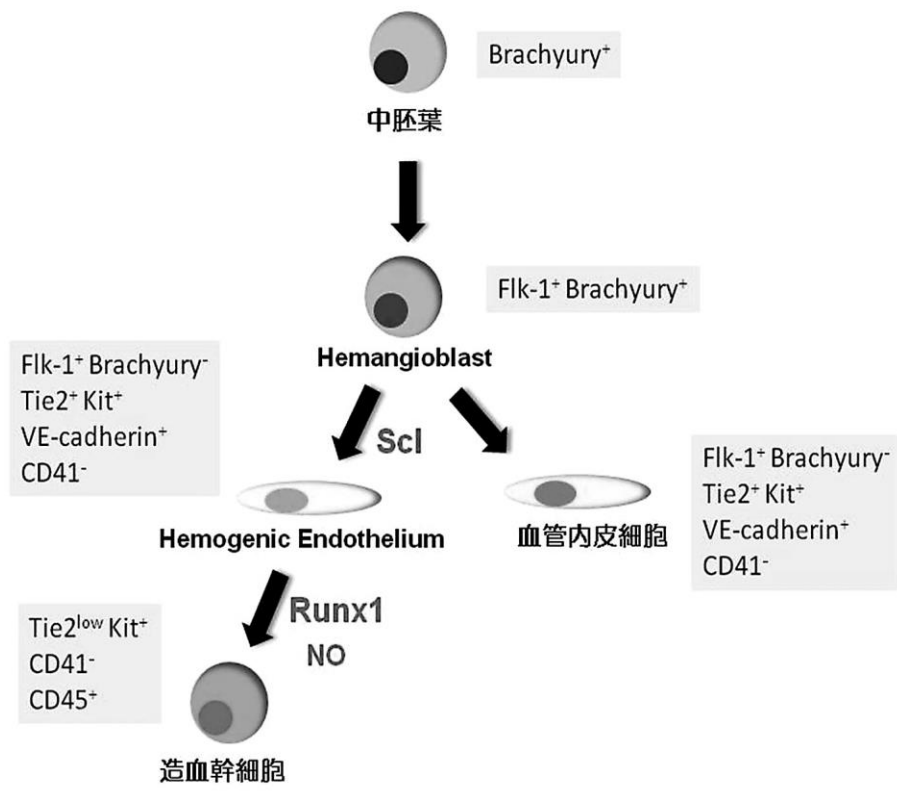


Fig. 7 Hemangioblast を介する造血幹細胞発生モデル
 (出典 : Asumi Y et al. 京府医大誌. 119. 2010)

1-3-4 胎仔期における血管形成

血管内皮細胞への分化運命決定後、血管内皮細胞は、原始血管網を形成する。この過程は“脈管形成”(vasculogenesis)とよばれ、主に VEGF によって調節される。この際、内皮細胞に特有の細胞接着因子である VE-カドヘリンによって細胞同士が接着し、管腔構造物を形成する。引き続き、均一な原始血管網から内皮細胞が血管新生刺激に対して、発芽、分枝、融合、嵌入、退縮 などの応答をして新たな管腔が形成される。この過程は“血管新生”(angiogenesis)とよばれている。この時期から管径の変化や動脈・静脈への分化がはじまり、さらに壁細胞で覆われた管状の血管内皮細胞という血管系の基本系が完成される。このような血管の退縮と新生の繰り返し過程をリモデリング(remodeling)という。さらに発生の進むなか、リモデリングを繰り返しながら全身に分布されるような階層性を持った大小血管からなる成熟した血管システムが形成される。血管内皮細胞レベルでは、リモデリング過程は細胞の解離・遊走・接着・生存・死という行動で捉えられており、さまざまなシグナルによりリモデリングが制御されている。代表的なものとして受容体型チロシンキナーゼを介するシグナル(VEGF-VEGF 受容体シグナル、アンジオポエチン-Tie-2 受容体シグナル、エフリン B2-EphB 受容体シグナル)(Fig. 8)、インテグリン系シグナル、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)による制御などがある。

1-3-5 脊椎動物における造血の発生

哺乳類の造血発生は、大きく二つのステージに分けることができる。一次造血(primitive hematopoiesis)は胚型造血ともいわれ、胎生初期に卵黄囊において一過性に起こる造血であり、引き続き AGM(aorta-gonad-mesonephros)領域で開始される二次造血(definitive hematopoiesis)に置き換わる。これは成体型造血といわれる。主な造血の場所は、胎仔肝、骨髄へと変化する。このように、造血の場所が変化すること、また、特に哺乳類の胚発生は母体内で起こるものと、成体型造血の主たる場となる骨髄も、明確な臓器としての形態を持たない上に骨組織の中に存在するため観察も困難であることから、発生過程での造血幹細胞の起源はどこにあるのかについてまだ不明な点もある。

1-3-6 成熟期における angiogenesis

成熟期における血管新生は、既存の血管から新しい血管を形成することで、成熟期に見られる生理的な減少や特定の疾患に見られる新しい血管が形成される課程である。一方、1997 年に末梢血中や骨髄中に血管内皮細胞に分化しうる内皮細胞前駆細胞(Endothelial Progenitor Cells; EPC)が存在することが明らかにされ、それまで成熟期の血管再生は既存の血管から分枝、伸張することのみと考えられてきたが、EPC が新たに血管を形成させている可能性が示された。EPC による血管新生は腫瘍組織、虚血組織、月経周期にともなった子宮内膜増殖などの血管の形成においても関与している。

培養 EPC 細胞を用いて、虚血部位での新生血管の増加、血流改善に成功している。心筋梗塞においては新生血管の増生、心筋壊死の減少が誘導され、左心室の機能改善にも成功した。このように、EPC を用いた臨床応用研究が行われている [13, 14]。

1-3-7 腎発生期糸球体毛細血管網の形成

後腎中の血管の由来に関し、外因説と内因説に意見が大きく二つに分かれている。後腎外からの血管前駆細胞の流入および血管の侵入と分岐により血管が形成されるという外部由来の説(angiogenesis 論)と後腎内部で後腎間葉系が必要に応じて血管前駆細胞に分化し、血管を形成するという内部由来の説(vasculogenesis 論)である。多くの研究では腎臓の血管は vasculogenesis か angiogenesis のどちらかで形成されるかが議論の焦点であり、決定するために色々な研究がなされてきた [15-19]。以前は、後腎の微小血管網は中腎からの angiogenetic な出芽から由来すると考えられてきた [15-17]。この考えは異種間の移植片の研究により支持されてきた。しかし、近年の研究では vasculogenesis は主に糸球体毛細血管網を作る経路であるとされてきている [18, 19]。胎児マウスの後腎のアダルト腎皮質へ移植実験では、移植部分における糸球体は後腎由来の細胞から形成されていた [17-20]。Flk-1 陽性細胞は E12 マウス後腎に存在した [19]。転写因子である SCL に着目して、間充織細胞からの血管前駆細胞の分化を報告した [17]。ラット後腎発生において糸球体内皮細胞とメサンギウム細胞の起源は後腎間葉系由来ではないかと示唆している報告もある [21]。後腎間葉系細胞は胎生幹細胞であり [18]、最近、マウス後腎間葉系細胞株を用いた系で強力に *in vitro* で成熟した血管内皮に分化するという報告もなされた [22, 23]。

両者の議論が続き、vasculogenesis と angiogenesis (Fig. 1-8) 両方で血管が形成する説も考えられてきている。

しかし、発生腎中の E13.5 では開放血管という血球細胞を間充織の流動によって行き渡らせることが起こっているのではないかと当研究室の観察で示唆している。つまり、常に血球は外部血管から発生腎内に流入し、外因性の angiogenesis が生じることが予想できる。本研究は angiogenesis と vasculogenesis はお互いに進行し、協調・融合し発生腎血管形成は進むという仮説を立てた。

開放血管系

血管は、内腔一面を血管内皮細胞が覆い、血液成分と組織にバリアーを有する閉鎖血管系と、血管内皮細胞をもたず拡散によって血液細胞を運搬する開放血管系に大別できる。ヒトを含め脊椎動物より高等動物は、一部の領域をのぞいてほとんどの血管が閉鎖血管系を有し、昆虫などの場合は開放血管系のみにより管腔が形成されている。最近、病的血管新生における研究では血液細胞の流れによって血管形成は開始する報告がある [24, 25]。

1-4 血管形成の中心的役割を担うマーカー

血管形成の全過程において内皮細胞の増殖と遊走、管腔形成などの最も中心的な役割を司るのが VEGF ファミリーとその受容体である。壁細胞の内皮細胞への動員には PDGF のアイソタイプの中でも PDGF-BB とその受容体 PDGFR β が中心として機能し、動員された壁細胞の内皮細胞の接着には Angiopoietin-1 (Ang-1) とその受容体 Tie-2 が必須である。Tie-2 の活性の持続には内皮細胞において細胞死の抑制とともに、細胞周期の静止状態を維持する機能があり、VEGF とは反対に血管構造を安定化され血管新生を抑制する機能がある。

1-4-1 VEGF

VEGF (Fig. 9) は 1989 年代に単離された因子で培養血管内皮細胞に対する増殖や血管新生作用や血管透過性亢進作用の 2 つの性質をもつ(以後は VEGF-A と略す)。VEGF-A の分子量は 34,000~46,000 の二両体構造をもったタンパク質である。関連遺伝子由来の因子としては、PDGF、VEGF-C、D は主にリンパ管内皮細胞の増殖・分化に関連する。VEGF は PDGF と近縁の構造をもつ増殖因子であるが、VEGF-A 遺伝子は(+/-)ヘテロ結合マウスでも胎生致死になるため、胎生期にはかなり厳密に調節されている増殖因子といえる。VEGF はスプライシングの違い(alternative splicing)によって通常アミノ酸数 121 個、145 個、165 個、189 個、206 個のサイズの異なるタンパク質として生産される。VEGF の遺伝子発現は特に低酸素によって誘導されることが特徴的である。

1-4-2 VEGF 受容体

VEGF 受容体(Fig. 9)には VEGFR-1 (Flt-1)、VEGFR-2 (KDR/Flk-1)、VEGFR-3 (Flt-4)の 3 種類がある。VEGF 受容体の構造は PDGF 受容体と類似しており、細胞外に 7 つの免疫グロブリン様ドメインをくり返し、細胞内にキナーゼドメインで二分されたチロシンキナーゼドメインを有している。VEGF 受容体のうちで Flt-1 と Flk-1/KDR は血管内皮細胞に発現する。また、Flt-1 には選択的スプライシングによって可溶性アイソフォームが生じることが知られており、可溶性 Flt-1 はおとりとして VEGF が細胞膜受容体に結合するのを制御すると考えられている。一方、Flt-4 はリンパ管の形成に関わる。VEGF は Flt-1 と KDR/Flk-1 に結合するが、親和性は Flt-1 の方が 10 倍強い。一方、チロシンキナーゼ活性や自己リン酸化の程度については、Flt-1 は KDR/Flk-1 に比べて 10 分の 1 程度である。このことから、主要なシグナル伝達を担うのは Flk-1 であり、Flt-1 は調節的役割を果たすことが示唆される。胎生期において、KDR/Flk-1 がまず血管芽細胞の時期に発現し、Flt-1 は少し遅れて、分化した血管内皮細胞に発現する。

1-4-3 Angiopoietin と Tie システム

Angiopoietin (Ang) とそのレセプターである Tie システム (Fig. 9) は胎生中期・後期の内皮細胞と平滑筋細胞の相互作用および血管の安定化に関与する。特に Tie-2 ノックアウトマウスで最も表現系が強く、マウスでは胎生 11.5 日 (E11.5) 頃で致死に至り、また人では遺伝子点突然変異による活性化 Tie-2 キナーゼは“静脈異形成症候群”を引き起こす。

Ang ファミリーには現在 4 種類報告されており、Ang-1 と Ang-2 がよく解析されている。Tie-2 チロシンキナーゼに対して Ang-1 は自己リン酸化を誘導するが、Ang-2 は自己リン酸化を誘導せず、Ang-1 の作用を阻害する。このことは、Ang-2 は Ang-1 の生理的拮抗物質である可能性を示す。しかし VEGF と Ang-1 同時投与実験の報告では、Ang-1 は平滑筋細胞増加を含む血管の成熟に、Ang-2 は内皮細胞の遊走やリモデリングに作用する (Fig. 9)。

1-4-4 PECAM-1

血管内皮細胞に発現している PECAM-1 (CD31) は、細胞間接着部位に集積し、細胞ガイドメインにホモフィリックな結合により内皮細胞間を繋いでいる接着分子である。この分子は内皮細胞や血小板に高い発現が認められ、単球、好中球、T 細胞でも発現が認められる。分子構造は 6 つのイムノグロブリン様ループ構造からなる細胞内ドメイン内にある二つのチロシン残基 (Y636、Y686) は特有のモチーフを有している。細胞外ドメインを持ち、1 つの膜貫通ドメイン、それに 118 のアミノ酸残基 (ヒト) からなる細胞内ドメインで構成される。PECAM-1 の細胞内ドメインには 2 つのチロシンリン酸化部位があり、内皮細胞の機械的刺激を加えるとリン酸化が起きる (Fig. 10) [26]。

1-4-5 Brachyury

Brachyury (T ; 短尾突然変異) は X 線照射によるマウス突然変異として、1927 年に発見された遺伝子座である [27]。この突然変異体のホモ個体は中胚葉が十分に形成されずに、胎仔齢 11 日程度で死んでしまう。ヘテロ個体は尾が短くなって生まれてくる (短尾という名はそこに由来する。T は尾 (Tail) の略である)。T 遺伝子座は大きく非常に複雑で、その発見以来、精力的に研究が行われている。その結果、その遺伝子のホモログが単離され、その関連遺伝子として T ボックス遺伝子が多数見つかかり、発生過程で欠かせない転写因子などをコードしていることが明らかになりつつある。1990 年にマウスで、91 年にアフリカツメガエル、92 年ゼブラフィッシュ、95 年にニワトリからそれぞれその相同遺伝子が単離された。その発現は初め陥入しはじめた全ての中胚葉で見られるが、脊索前駆細胞へと局在は限定されていく。マウスでは原状から尾芽へと移っていき、最終的には尾部でのみ発現する (Table 1)。

1-4-6 EphrinB2 と EphB4

EphrinB2 と EphB4 (Fig. 9)は内皮細胞に発現する膜タンパク質である。EphrinB2 はリガンドとして EphB4 に結合する。この結合により EphrinB2 と EphB4 の細胞内へシグナルが伝達される。

1-5 糸球体内皮細胞における主な血管マーカー

血管内皮細胞の初期マーカーとして VEGF のレセプターである Flk-1 および Flt-1 が知られている[28]。Flk-1 陽性細胞の糸球体前駆細胞は糸球体上皮細胞由来の VEGF によって誘導され、糸球体組織へと誘導するものと考えられている。Flk-1 を介した VEGF のシグナル伝達は内皮細胞の増殖、遊走を促進するとされるが、一方、Flt-1 を介した VEGF のシグナルは抗増殖作用を有すると考えられている[29]。新生マウスに VEGF の中和抗体を投与すると糸球体の形成不全とともにコンマ型糸球体、S字型糸球体までもが阻害され、ネフロン数の減少が認められたことから VEGF は糸球体内皮細胞の発生分化のみならず、ネフロン自体の形成にも関与しているものと考えられている[30]。

血管内皮特異的に発現するレセプターチロシンキナーゼ Tie-1、Tie-2 のうち、Tie-2 リガンドが近年明らかにされ、Angiopoietin (Ang)と名付けられた。これまで同定された4つのファミリーのうち、Ang-1、Ang-4 (アゴニスト)と Ang-2、Ang-3 (アンタゴニスト)は互いに拮抗的に作用する。VEGF と同様に Ang-1 は内皮細胞の遊走、生存を伝達し、血管の構築に携わっていると考えられているが、一方で VEGF の血管透過性亢進作用に拮抗し、より安定した成熟血管の構築に作用していると考えられている[31](Fig. 11)。

糸球体においては正常成体の糸球体上皮に Ang-1 の発現が[32]、一方、糸球体内皮には Tie-2 の発現が報告されており[32]、内皮細胞の遊走とともに正常糸球体内皮の透過性のバランスを保つうえでも貴重な役割を果たしているものと想定される。

また、低酸素環境下において誘導される HIF-1 (hypoxia inducible factor1)は VEGF の発現を誘導する転写因子として知られていたが[33]、最近この HIF-1 が新生マウスの糸球体上皮細胞に強く発現することが報告された[34, 35]。

1-6 壁細胞 (血管平滑筋・ペリサイト) の起源

血管壁細胞は血管部位によって起源が異なっている。多くの血管では、先行する血管網が内皮細胞自身の起源と同じ中胚葉に由来する近くのまだ未分化である間葉細胞を引き寄せ、分化を誘導すると考えられている。心臓から伸びる大動脈弓などの平滑筋は、主に外胚葉に由来する神経堤細胞 (neural crest cell)を起源ということが言われてい

る。また、平滑筋細胞に多く存在するたんぱく質は α SMA であり、血管内の平滑筋存在場所を Fig. 5 に示した。

1-6-1 血管平滑筋分化調節分子

壁細胞分化の調節因子として注目されてきた代表因子の一つとして、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor: PDGF) が挙げられる。PDGF には PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB の 3 種類の二量体によって生理活性を発揮する。PDGF-BB は成熟平滑筋に対して、増殖作用や収縮型平滑筋マーカー遺伝子の発現抑制作用を有することが知られている。一方、PDGF-B、PDGF β 受容体それぞれのノックアウトマウスでは、平滑筋細胞およびペリサイトの数がかわめて少ないこと、ES 細胞由来の Flk-1 陽性細胞が PDGF-BB 存在下で壁細胞することも報告されており [36]、血管形成の異なる段階で壁細胞の運命決定と分化・増殖に PDGF が関与していると考えられる。また、PDGF-B、PDGF β 鎖ノックアウトマウスにおいて糸球体メサンギウム細胞が存在しないことが報告された [37]。さらに PDGF β は後腎メサンギウム細胞において DNA 合成と遊走を制御する報告がなされ [38]、糸球体発生に重要な役割を担う可能性がある。

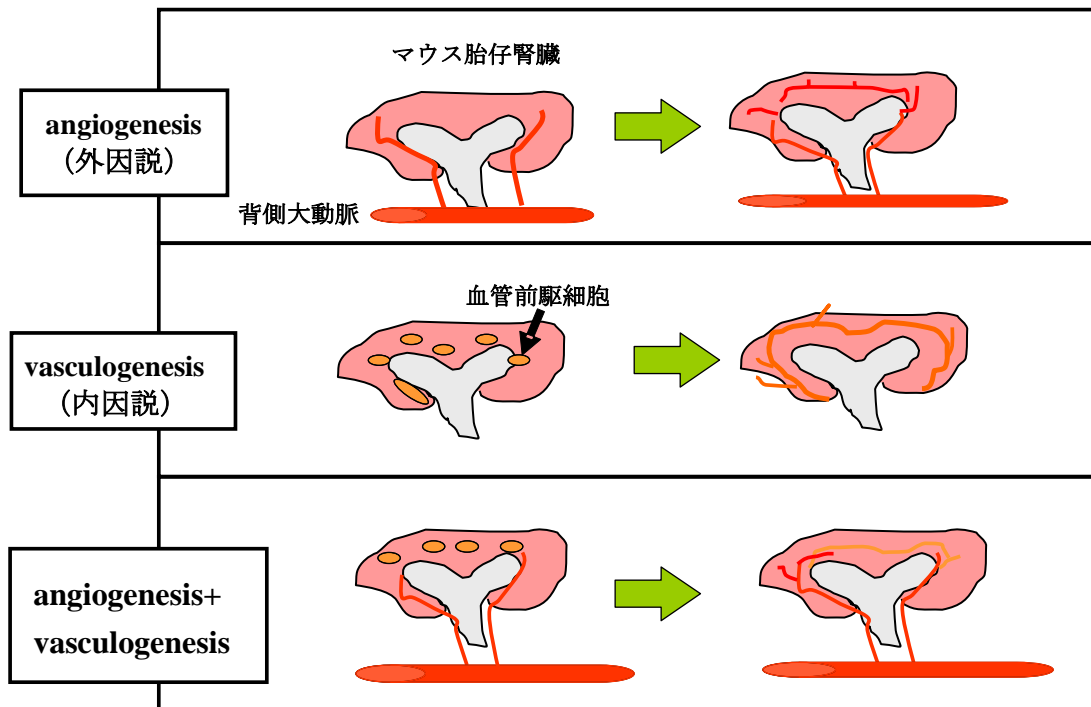


Fig. 8 腎血管形成におけるangiogenesisとvasculogenesis

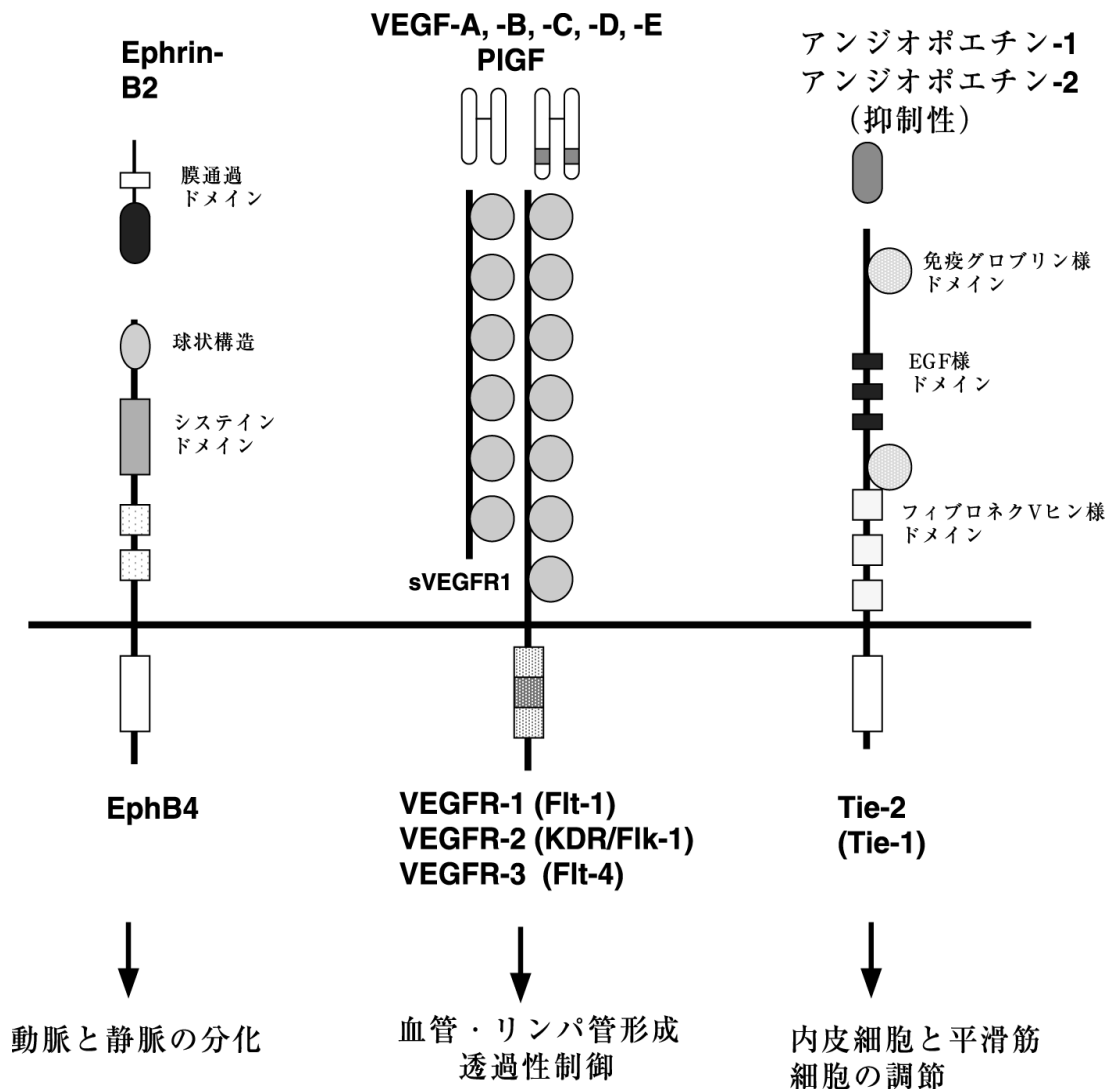


Fig. 9 VEGF・VEGFR・Angiopoetin・Tie2
 (出典 : Masabumi S et al. Inflammation and Regeneration. 24, 2004)

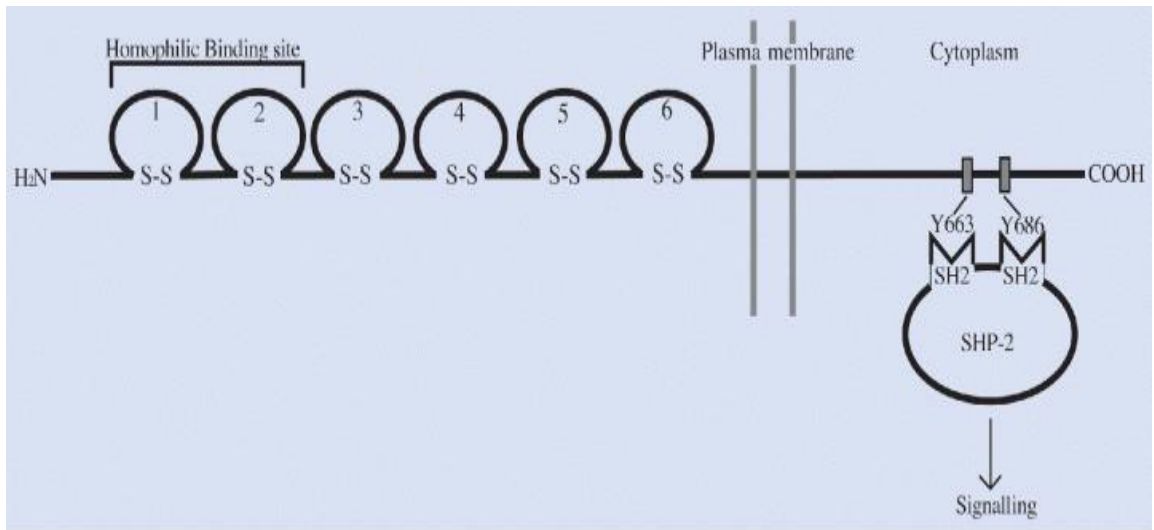


Fig. 10 PECAM-1 の構造と結合しうる蛋白質
 (出典: (Fujiwara K. J Intern Med. 27, 2006))

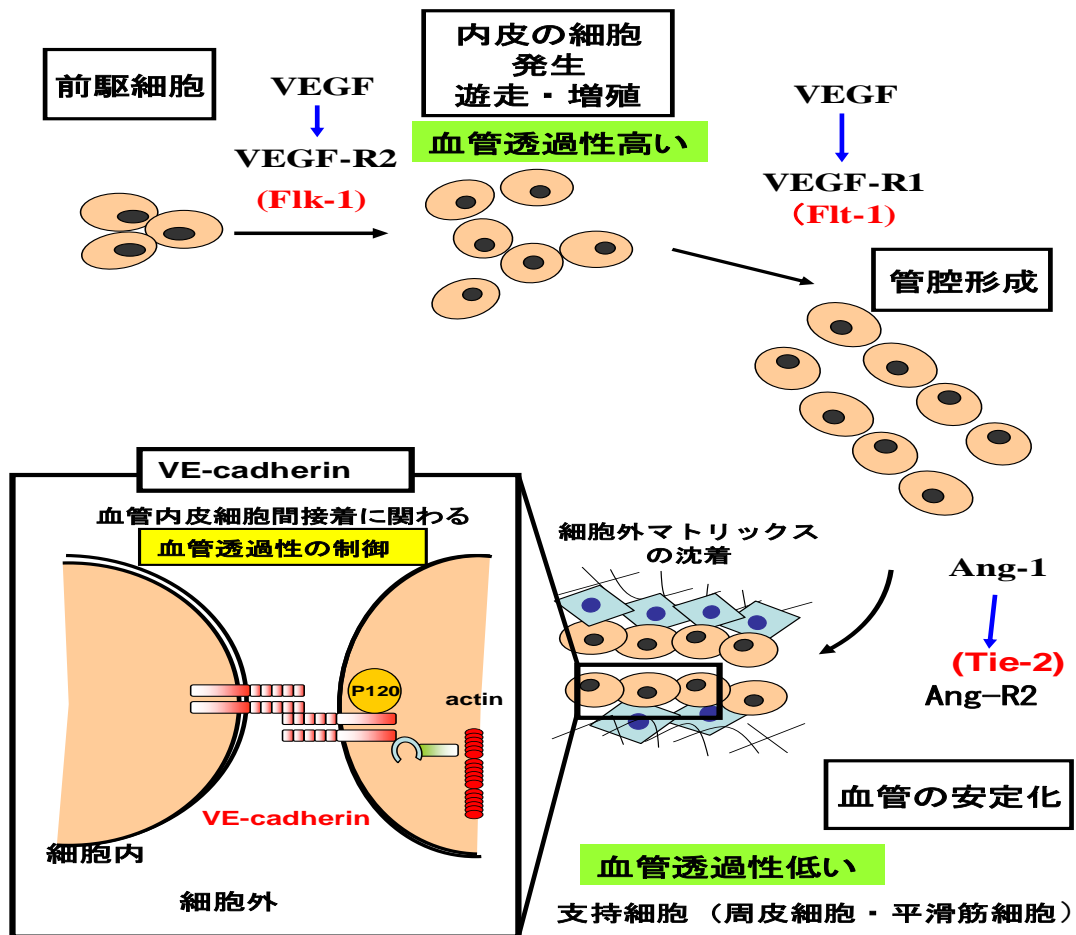


Fig. 11 血管新生関連遺伝子の概略

Table 1 Brachyury の発現部位

	Brachyury
原腸胚期	
胚体中胚葉	+
脊索	+
器官形成期	
中枢神経	-
末梢神経	-
心臓	-
腎臓	-
肺	-
眼	-
肢芽	-
尾芽	+
筋肉	-
皮下組織	-
成体組織	
脳	-
心臓	-
腎臓	-
肺	-
子宮	-
精巣	-

第2章 発生期腎臓における angiogenesis の解明と役割

2-1 研究概要

腎血管系は大血管と糸球体毛細血管および尿細管周囲毛細血管から構成される。腎血管の発生機構には二つの論説がある。一つは背側大動脈である外部血管が発生期腎臓に侵入し腎血管を形成していく **angiogenesis** 説である。もう一つは糸球体原基周囲の間葉系細胞内に分化・成熟により腎血管が形成される **vasculogenesis** 説である。両者とも染色データに基づいて報告されたが、決定的な根拠は明らかになっていない。本研究室の先行研究はマウス発生期腎臓毛細血管の由来を調べ **angiogenesis** と **vasculogenesis** の両方とも働いていることを初めて明らかにした。しかし、**angiogenesis** による背側大動脈から出芽、分岐、成熟化するののかについてはまだ解明されていない。そこで本章ではこのような時空間的な解明は学術的にも応用的にも意義があると考え、解析することにした。

2-2 実験動物

マウスはアルビノ種で白種の ICR を用いた。メーティング (交配) は夕方に行い雌と雄を同じケージに入れ (雌 3~4 匹 v.s. 雄 1~2 匹)、翌日の午前中に引き離した。夜行性なので、受精は主に夜中に行なわれていると考えられている。胎生期においては受精の日を 0 日目とし、誕生までの日数を表す (例: 胎生 12 日 (E12))。

2-3 材料と方法

雌マウスは動物実験室で飼育した、8~25 週齢の雌マウスを妊娠させ、マウスから摘出した E11.5 から E18.5 の胎仔マウスを使用した。

2-4 発生腎血管の形態観察

妊娠した雌マウスは頸椎脱臼法により屠殺したのち、クリーンベンチ内にてマウス胎児を子宮ごと摘出し、PBS(-)を入れた dish にてハサミとピンセットを用いて子宮から胎児を摘出した。採取した胎仔を PBS(-)で 2 回洗浄した後、妊娠マウスから摘出した胎仔マウスをピンセットにて発生腎を摘出し実体顕微鏡にて発生腎内の血管を観察した (Fig. 12)。

2-5 血管鑄型法

2-5-1 胎仔の摘出

妊娠マウスを頸椎脱臼法にて屠殺する。屠殺したマウスをハサミで開腹し、子宮から胎盤を付けたまま胎仔（卵黄膜に包まれている状態）を取り出す。取り出した胎児を PBS の中に移し、実体顕微鏡下にて卵黄膜と羊膜を除去する。除去した胎児を 2%PFA の中で 5 分間固定し、PBS (－) で満たしたシャーレに移す。

2-5-2 Mercox の調合と注入

SEM 用に開発された血管鑄型注入剤(メルコックス：大日本インキ)10 g をカップに取り、別のカップに硬化促進剤を 0.3 g～0.4 g を計量しておく。試料が準備出来た時点で、メルコックス樹脂の入ったカップの方へ素早く移し、十分混合するように混ぜる。実体顕微鏡下にて胎仔の臍帯血管をピンセットで固定し、27 G もしくは 30 G の針にて臍帯血管を穿刺する。穿刺した状態で血管の上から針を押さえるようにして、ピンセットで摘む。シリンジポンプを操作して樹脂をゆっくりと(注入量 0.3～0.4 ml、注入速度 60 秒～90 秒)注入する。

2-5-3 組織腐食および導電性

樹脂注入を終えた試料は、樹脂の硬化促進のため温水中(40～60℃)に 1 時間以上置く。組織溶解のため 10%NaOH 水溶液にて組織を腐食(2～3 日ほど置く)する。腐食した試料を極めて弱い流水にて(流水を鑄型に当てないように)洗浄する。洗浄した試料を 1% 四酸化オスミウムで導電性(1～2 日ほど置く)をもたせる。

2-5-4 SEM 観察

導電性をもたせた試料を 70、80、90、100%アルコールにて脱水し自然乾燥(2～3 日ほど置く)させる。乾燥させた試料を粒子が目立たないように厚く金コーティングする。最後に像質を損なわない程度の低加速度電圧にて SEM で観測した(Fig. 13)。

2-6 墨注入法

胎仔マウス(E13.0 と E13.46)と臍帯血管、胎盤が繋がった状態で摘出する。墨(PBS : 墨 5 : 1)を 20 ml シリンジに充填する。実体顕微鏡下にて胎仔の臍帯血管をピンセットで固定し、27 G もしくは 30 G の針にて臍帯血管を穿刺する。穿刺した状態で血管の上から針を押さえるようにして、ピンセットで摘む。シリンジポンプを操作して墨をゆっくりと(注入量 0.3～0.4 ml、注入速度 60 秒～90 秒)注入する。注入後、背側大血管と発生腎が繋がった状態で摘出する。その後、実体顕微鏡にて観察する(Fig. 12)。

2-7 墨と血管鋳型注入法

2-7-1 scaleA 作成

scaleA は、4M の尿素、10% (wt/vol) のグリセリンと 0.1% (wt/vol) の TRITON X-100 を混合させ作成した。

2-7-2 胎仔に混合した樹脂の注入

SEM 用に開発された血管鋳型注入剤 (メルコックス : 大日本インキ) に墨 (鋳型樹脂 : 墨 5 : 1) を混ぜ臍帯血管から注入し、樹脂を硬化させた。樹脂を注入した胎仔を理化学研究所 細胞機能探索技術開発チームが開発した scaleA 試薬に 1 週間浸した後、明視野顕微鏡にて観測した (Fig. 13)。

2-8 胎仔心臓拍動下による蛍光色素の注入

2-8-1 蛍光色素の準備

TOMATO lectin (VECTOR) と PBS 溶液を (1 : 100) にて混合して冷蔵庫に保存した。

2-8-2 妊娠マウスの麻酔、蛍光色素注入

妊娠マウスを腹腔内麻酔により鎮静させ、妊娠マウスの腹部を開腹し、双角子宮を取り出す。ライトを胎仔にあて目視下で心臓の位置を確認する。確認し終わったら、針を心臓に挿入し、TOMATO lectin (VECTOR) を 2-2.5 μ l 注入する。注入し終わったら、10 分間、心拍動により灌流させる。灌流後、双角子宮から胎仔を取り出し 10%ホルマリンにて 1 時間固定した。

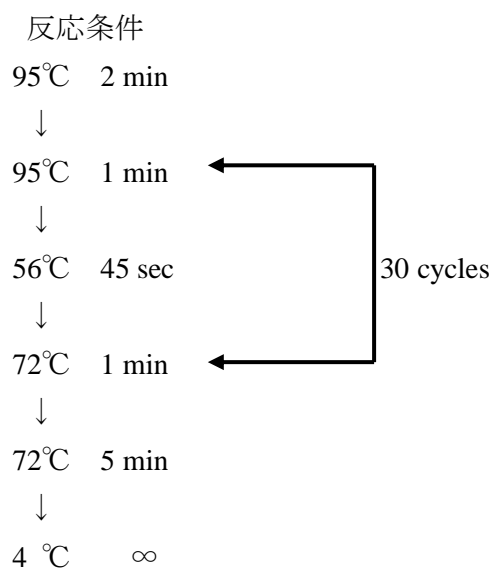
2-8-3 胎仔から組織を単離・蛍光観察

発生腎と背側大動脈が隣り合った状態で単離した組織をスライドガラスに張り付け、fluoromount とカバーガラス、mountquick を用いて封入した後、共焦点レーザー顕微鏡にて観測した (Fig. 14)。

2-9 RT-PCR

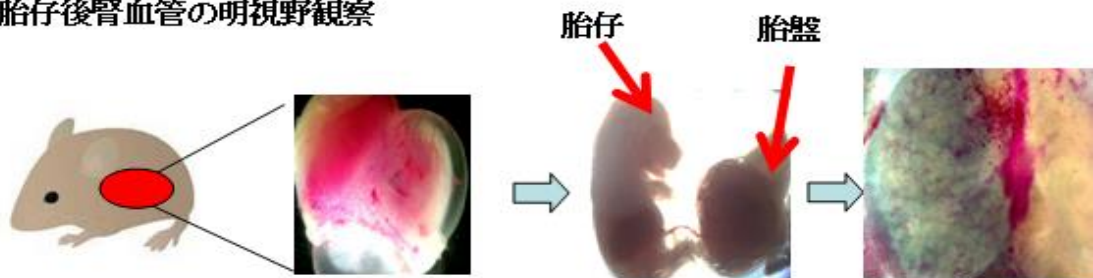
妊娠した雌マウスを頸椎脱臼法により屠殺した後、マウス胎仔を子宮ごと摘出し、PBS (-) を入れた dish にてハサミとピンセットを用いて子宮から胎児を摘出した。採取した胎児を PBS (-) で 2 回洗浄した後、基礎培地に胎児を移し、実体顕微鏡下において 27 G 注射針を用いて胎仔から発生腎を摘出した。摘出した発生腎は RNA 抽出 kit (Isogene, Nippon Genes) にて総 RNA を抽出した。次に総 RNA の抽出量を

microvolume spectrophotometer (Thermo)にて測定した。総 RNA の適正量を計算したのち、SuperScript III One-Step kit (Invitrogen)にて総 RNA を逆転写させ、cDNA を合成した。使用した primer は付録に示し、反応条件は下記に示した。



-20°C保存または電気泳動をした。

胎仔後腎血管の明視野観察



臍帯血管への墨注入法

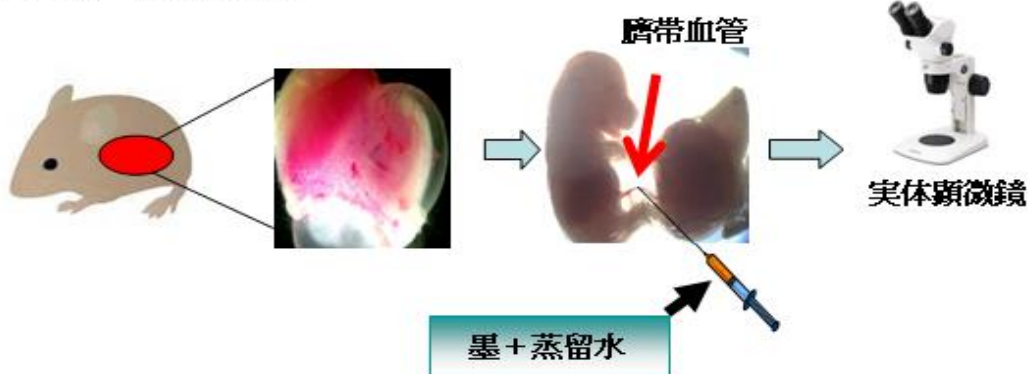


Fig. 12 明視野観察および墨注入法

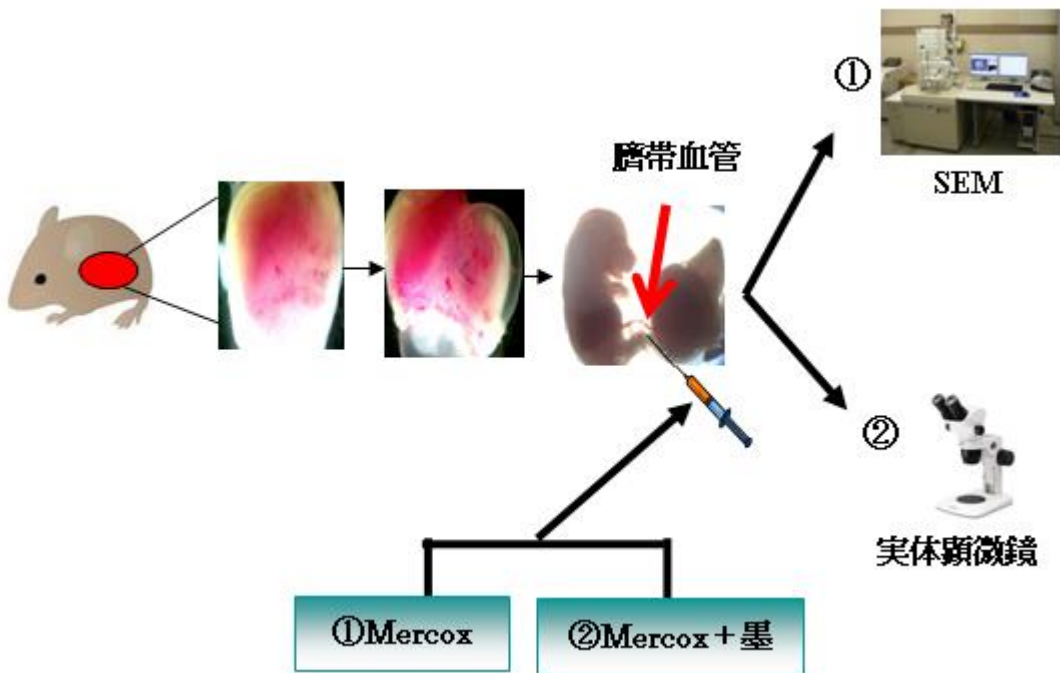


Fig. 13 血管鋳型法および墨樹脂法

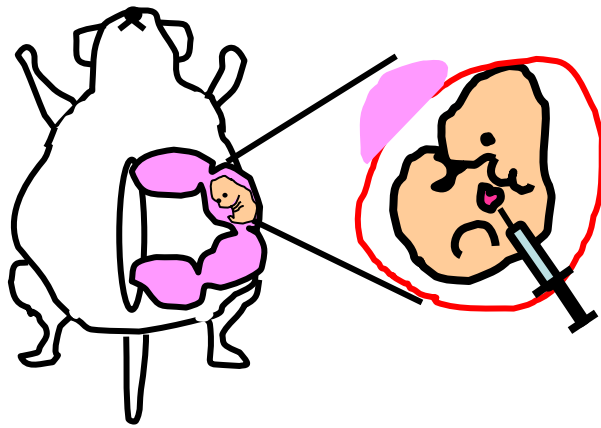


Fig. 14 胎仔心拍動流を利用した蛍光色素灌流法

2-10 実験結果

2-10-1 胎仔マウス発生腎の明視野観察

胎生期マウスから摘出直後の発生腎を倒立顕微鏡で明視野観察すると、血管や血液の分布を見られる。観察は外部血管が発生腎に侵入する時期を特定するため発生後期から初期に向かって、E18.5、E16.5、E15.5、E13.5の経時的に血液の分布と血管の形成過程を観察した。

E18.5では、発生腎内に大きな血管が進入するだけでなく、発生腎全体に毛細血管網が顕著にはりめぐらされている。この時、腎臓の毛細血管の出現に伴い、綿密な血管網ネットワークが構成されていることが確認できた。E16.5では、発生腎の外側から内側に大きな血管が走っているのが観察できた。この時期も発生腎全体で無数の毛細血管が構築されていることが確認できた。E15.5では、発生腎の外側から内側に大きな血管が走っているのが観察できた。そして、発生腎全体で無数の毛細血管が構築されていることが確認できた。E13.5では発生腎に大きな血管が観察されなかった。しかし、後腎内に分散した赤血球が見られ、それらが線状に分散していることがわかった (Fig. 15 矢印)。

2-10-2 マウス発生腎における血管鑄型法の導入

微小循環系の研究方法は、循環量やその変動を検討する生理学的方法と脈管の微細構造などを追究する形態学的方法に大別できる。そして血管の微細構築に関する研究は後者に属するものである。消化管、特に胃や腸の血管構築に関しては血管内色素注入法、バリウム注入法[41]、沃化銀コロイド注入法[42]などにより既に多くの研究がなされてきたが、いずれの方法も長所・短所をもち、これらの方法では微細構築を立体的に観察するには不十分である。

一方、臓器の血管系を立体的に再現するために合成樹脂を用いた鑄型法が開発され、種々の臓器でこれが利用された[42]。さらにMurakamiはアクリル系樹脂を使用した血管鑄型を作製し、走査電子顕微鏡で観察する方法を用いて微細血管構築のより詳細な観察を可能とした[43]。しかしこの方法は、樹脂重合に関して熟練した技術を必要とする難点がある。そこでFujibayashiは硬化操作が極めて容易なメルコックス (大日本インキ製)を使用して血管鑄型を作製し、走査電子顕微鏡で観察した[44]。そして、Kondoはメルコックスを用いて胎仔マウスにおける全身鑄型を世界で初めて成功した[45]。これにより微細な血管網を三次元で観察することが可能となった。本実験は、明視野観察において不可能である立体的な胎仔マウスの腎血管を観察する必要がある。しかし、胎仔における血管鑄型は熟練した高度な技術が必要である難点があり、近藤以外に胎仔マウスの血管鑄型は例がない。そのため、胎仔マウスにおいて、新たな血管鑄型法を開発し、観察できるかを検討した。

2-10-3 胎仔マウスを用いた血管鋳型法の確立

本実験の実験動物は胎仔マウス、血管を鋳型にするために用いる樹脂(メルコックス)、走査型電子顕微鏡を用いて、実験を行った。

① 血管鋳型樹脂注入場所の検討

注入場所には様々な部位がある。例えば、胎仔心臓、眼底血管や臍帯血管などがある。本実験では一番適切な場所である臍帯血管から挿入し、鋳型を試みた。その結果、胎仔マウスの血管鋳型を観察することに成功したため、臍帯血管からのアプローチをすることに決めた(Fig. 16)。

② メルコックスの評価

今回は血管を硬化させ SEM 観察するため、血管鋳型樹脂(メルコックス)を使用した。示したようにメルコックスは注入後、高温にて硬化させ明視野顕微鏡にて胎仔マウスの血管を確認することができた(Fig. 16)。

2-10-4 胎仔マウスにおける腎血管鋳型観察

胎仔マウスの鋳型法の確立が実現できたので、観察は明視野観察と同様に発生後期から E18.5、E17.5、E16.5、E15.5、E15.0、E13.5、E12.5 の経時的に血管の形成過程を SEM にて観察した。

E18.5 では、発生腎全体に毛細血管網が顕著にはりめぐらされている。この時、腎臓の細血管の出現に伴い、綿密な血管網ネットワークが構成されていることが確認できた(Fig. 17 A)。糸球体も観測することができた(Fig. 17 B, C)。E17.5 では、複雑な血管の構築、糸球体の観測(Fig. 17 B, C)や糸球体の形成過程(Fig. 18 C)を観測することができた。SEM から発生腎全体で無数の毛細血管が構築されていることが確認できた(Fig. 18 A, B)。E16.5 では、更に血管の分岐が広がり血管網を形成し始めている事を観測出来た。発生腎全体を覆うように血管の伸長および分岐が観測できた(Fig. 19 A)。糸球体の形成過程時期が多く見られた(Fig. 19 B)。E15.5 では、E18.5 から E16.5 に比較し血管網の減少を観測できた。そして、血管の一本から複数の血管が這い出している様子を観測、発生腎の上部には副腎の存在(Fig. 19 C, D)。E15.0 では両方の発生腎を観察することができた。発生腎内にある血管と背側大血管の繋ぎ目を観測した(Fig. 19 E, F)。E13.5 では肝臓、背側大血管を観測することができた。血管は発生腎の全体を覆うような形成をしていた(Fig. 20 A, B)。E12.5 の鋳型においてマウス胎仔の全身鋳型を SEM にて観測した。頭部の血管から心臓(Fig. 20 C 矢印)、肝臓に至るまで観測することは出来たが、発生腎の血管は観測できなかった(Fig. 20 D)。

2-10-5 墨と血管樹脂による発生腎血管観察

血管鋳型樹脂の粘性を下げるために墨を混合させ、発生腎の血管に注入し、サンプルを scaleA [46]に 1 週間浸した後、明視野観察にて背側大血管から発生腎へ向かって侵

入する血管観察を試みた。E12.375 の全身鋳型を作成した(Fig. 21 A)。全身鋳型の下部に発生腎があり、背側大血管(Fig. 21 B 矢)から発生腎へ侵入する血管(Fig. 21 A 四角枠)を観察することに成功した。

2-10-6 胎仔心臓拍動下による蛍光色素の注入による発生腎血管観察

末梢まで血液を運ぶには血流による拍動が必要である。そこで本研究はマウス胎仔心臓の拍動流を使用し、墨や樹脂による結果と同様の時期に血管侵入があるか蛍光色素を注入後、共焦点顕微鏡にて背側大血管から発生腎へ向かって侵入する血管観察を試みた。E13.5 のマウス胎仔に蛍光色素を注入した結果、発生腎内に血管が張り巡らされていることを確認できた(Fig. 22 A, B)。E12.5 の後腎内では侵入した血管から分岐する血管が観察できた(Fig. 22 C, D)。E12.375 では背側大動脈から発生腎へ侵入する血管を観察することに成功した(Fig. 22 E, F)。

2-10-7 RT-PCR による血管細胞関連遺伝子解析

血管新生には末梢血中や骨髄中に存在する血管内皮前駆細胞(EPC)が関与していることが報告されている[39,40]。骨髄での造血は胎仔マウス中では E12.5 から始まるため、E15.5 以降の胎仔マウスの血液中でも EPC が存在していることが推測されている。そのため、E15.5 以降の腎臓発生における血管新生において、EPC が関与していることは考えられる。E15.5 以前の腎血管は未熟ではあるが、発生腎内の血管の存在が E12.375 の結果から明らかとなった。このことから、E15.5 以前では血管に分化し得る前駆細胞が存在していることが考えられる。E15.5 以前の発生腎において、血管前駆細胞が血管形成に関わる angiogenesis をより明確にするため解析し、血管前駆細胞である hemangioblast と hemogenic endothelium の存在を腎臓発生最初期である E10.5 から E13.5 まで確認した。

本実験は、血管形成における各時期の遺伝子 brachyury、Flk1、c-kit、Flt1、Tie2、PECAM-1 を RT-PCR で調べた。なお、各 primer の配列は付録に示した。

血球血管芽細胞 (hemangioblast) のマーカーである brachyury は E12.5 期から発現が見られ E13.5 期で顕著に発現が上昇した(Fig. 23)。血管新生初期、即ち血管内皮細胞増殖因子マーカー Flk1 は E12.5 に発現せず、E13.5 期から発現した(Fig.23)。血管内皮前駆細胞(Hemogenic endothelium)マーカー c-kit は腎臓原基の発生の 0 日(E10.5)から既に発現がみられ、E12.5 にかけて、発現が徐々に上昇した(Fig. 23)。血管新生中期マーカー Flt1 は、E11.5 から発現が見られ、E13.5 にかけて、発現が上昇した(Fig. 23)。血管新生後期マーカー Tie2 は Flt1 と同様な傾向で発現した(Fig. 23)。興味深いことに、成熟血管の接着マーカー PECAM-1 は E12.5 で顕著に発現した。

2-11 考察

E13.5において、発生腎内に赤血球の観察はできたが、血管の存在は観察できなかった。E15.5では発生腎内に分散した赤血球が消失し、代わりに、微小血管が生じていた。また、発生腎外側から大血管（動脈）の出現が観察された。しかし、大血管と微小血管が融合しているかどうかは明確に観察できなかった。E16.5では発生腎外側から発生腎内側に大きな血管が走っているのが観察できた。この時、外側の大血管は内側に侵入したことを確認できた。E18.5において発生腎内に大きな血管が進入することだけではなく、発生腎全体に毛細血管網が顕著にはりめぐらされている。この時、腎臓の毛細血管の出現に伴い、綿密な血管網ネットワークが構成されている。糸球体の形成は E15.5段階であり、E13.5は C-shape 期が始まる時期である。その時期に赤血球があることは発生腎内の間葉系幹細胞が分化したのか、それとも背側大動脈が血管新生し、そこから赤血球の流入により観察できたのではないかと考えられた。

次に E12.5 の血管鋳型では心臓や肝臓などの血管は観察できたが、発生腎の血管鋳型は観測できなかった。血管鋳型樹脂である粘性が高い為だと思われる。血液の粘性は 3 cp なのに対し今回使用したメルコックスの粘性は 15~20 cp と 5 倍以上と高いため発生腎内に侵入する微小な血管には注入できなかったと考えられる。E13.5 では明視野で観察できなかった血管が鋳型にて観察することが可能であった(Fig. 20)。E15.0、E15.5 から分岐した血管から更に分岐が始まっていた(Fig. 19)。E16.5、E17.5、E18.5 (Fig. 17, 18, 19)は血管網形成、成熟糸球体を観察できた。このことから発生腎内の血管形成は早期において、全体を覆うように血管を形成し、その後、更なる血管新生により腎血管が形成されていくのではないかと考えられる。

墨樹脂法により E12.375 という時期に背側大血管から発生腎へ侵入する成熟血管を突き止め(Fig. 21)、angiogenesis の時期を解明した。

次に心拍動流による蛍光色素が発生腎内の微細な血管を観察することが出来たことから、背側大動脈による angiogenesis は発生腎の成長に必要不可欠であることが考えられた。これは胎仔内に EPC といわれる血管前駆細胞[39, 40]、酸素や栄養などが背側大動脈を通じて発生腎に運ばれるからである。

最後に発生腎内の血管マーカーを遺伝子レベルで解析した結果(Fig. 23)、brachyury 血球血管芽細胞(hemangioblast)のマーカーであり、血管芽細胞は血液と血管内皮細胞への二方向性の分化能を有した中胚葉細胞である。一方、c-kit は血管内皮前駆細胞 hemogenic endothelium のマーカーであり、血管内皮前駆細胞も中胚葉由来細胞であるが、いったん血管内皮細胞の特徴を獲得しており、そこから血液細胞を生み出す特長を有し、胎仔期の一時期のみに存在する。RT-PCR の結果によると、血球血管芽細胞のマーカーである brachyury は腎臓原基発生の 0 日(E10.5)からわずかに発現したが、E13.5 期に急激な発現を示した。一方、造血前駆細胞のマーカーである c-kit は E10.5 期から

比較的高い発現を示した。c-kit は造血前駆細胞の他に、上皮、平滑筋細胞やその前駆細胞に存在するチロシンキナーゼ型のレセプターであり[46]、MAP キナーゼ経路などを介して、細胞増殖、遊走、サイトカインの分泌を引き起こす。E11.5 の発生腎では腎臓原基で上皮系尿管は既に存在し、c-kit を介して増殖、伸展が起きているため、c-kit は他の血管限定マーカーより比較的高く発現したのは不思議ではないと考えられる。Flk-1 は血管内皮細胞増殖因子受容体であり、血管内皮前駆細胞から血管細胞に分化誘導する。Flk-1 は brachyury と同様に腎臓原基発生の 0 日 (E10.5) から少々発現したが、E13.5 期に顕著に発現した。血管内皮細胞遊走に関わる Flt1 と血管内皮細胞の接着および管腔形成に関わる Tie2 は Flk1 と同様に E13.5 に入ってから安定に発現した。これらのマーカー発現傾向は E13.5 に上昇するから発生腎内部 vasculogenesis 由来の血管形成は E13.5 から始動すると考えられた。面白いことに、血管内皮細胞の成熟化に関わる細胞間接着因子である PECAM-1 は E13.5 より早い時期の E12.5 に顕著に発現した。この事実は成熟血管の存在が vasculogenesis よりも腎臓外部の angiogenesis が発生腎に侵入することを示唆した。実際、前述した墨鋳型樹脂法で観察した背側大血管の発生腎侵入は E12.375 である。これは PECAM-1 検出の E12.5 とほぼ同時期である (Fig. 19,20,21)。即ち、E12.5 に背側大血管が発生腎侵入することを分子生物学手法で検証できた。以上の RT-PCR による遺伝子発現解析、墨樹脂鋳型法などの結果を総合評価すると、E11.5 から E12.5 における腎血管形成は angiogenesis の働きを中心に起き、E13.5 からは angiogenesis と vasculogenesis の両方が協調しながら起きることが推測された。よって、angiogenesis の起源は背側大血管から発生腎内に血管が侵入することを示唆した (Fig. 24)。

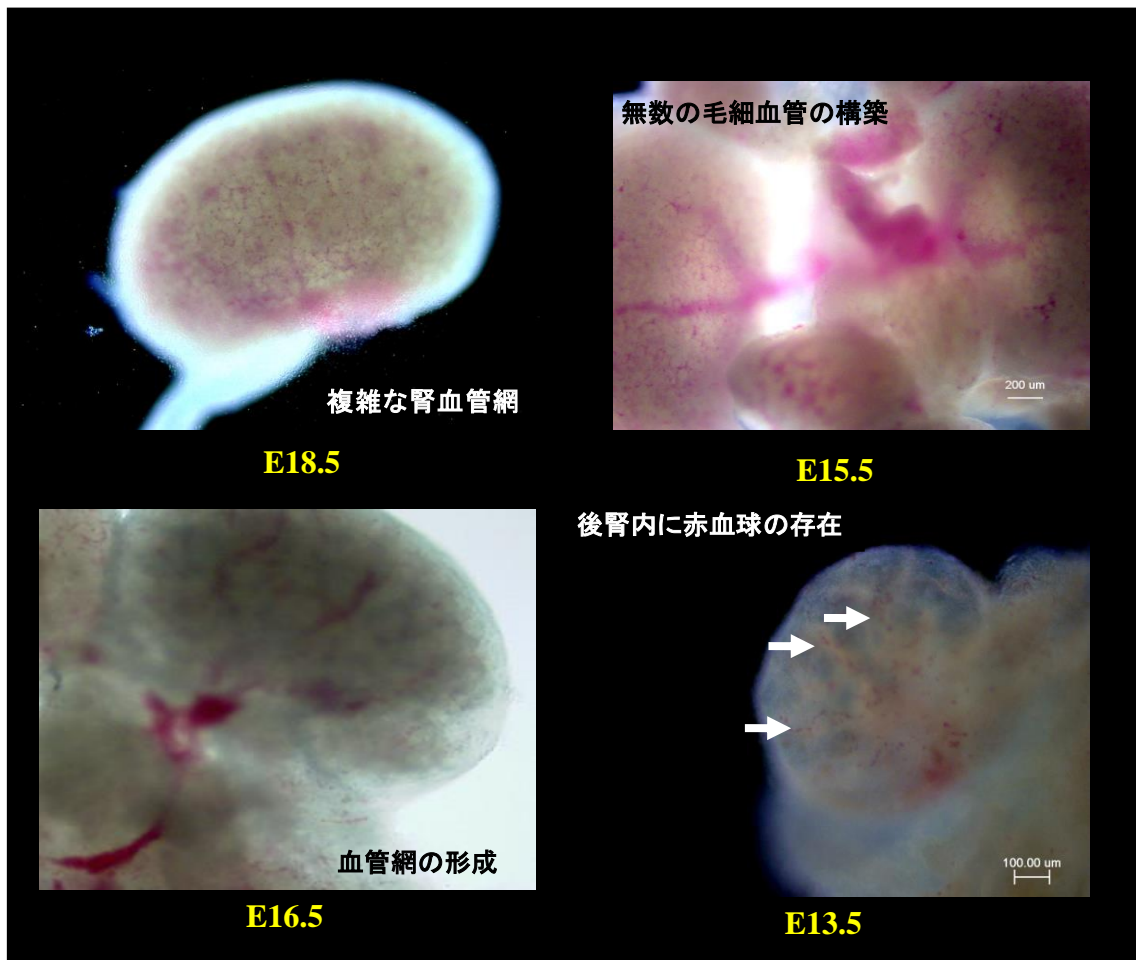


Fig. 15 発生腎各期における血管形成の変遷（明視野観察）

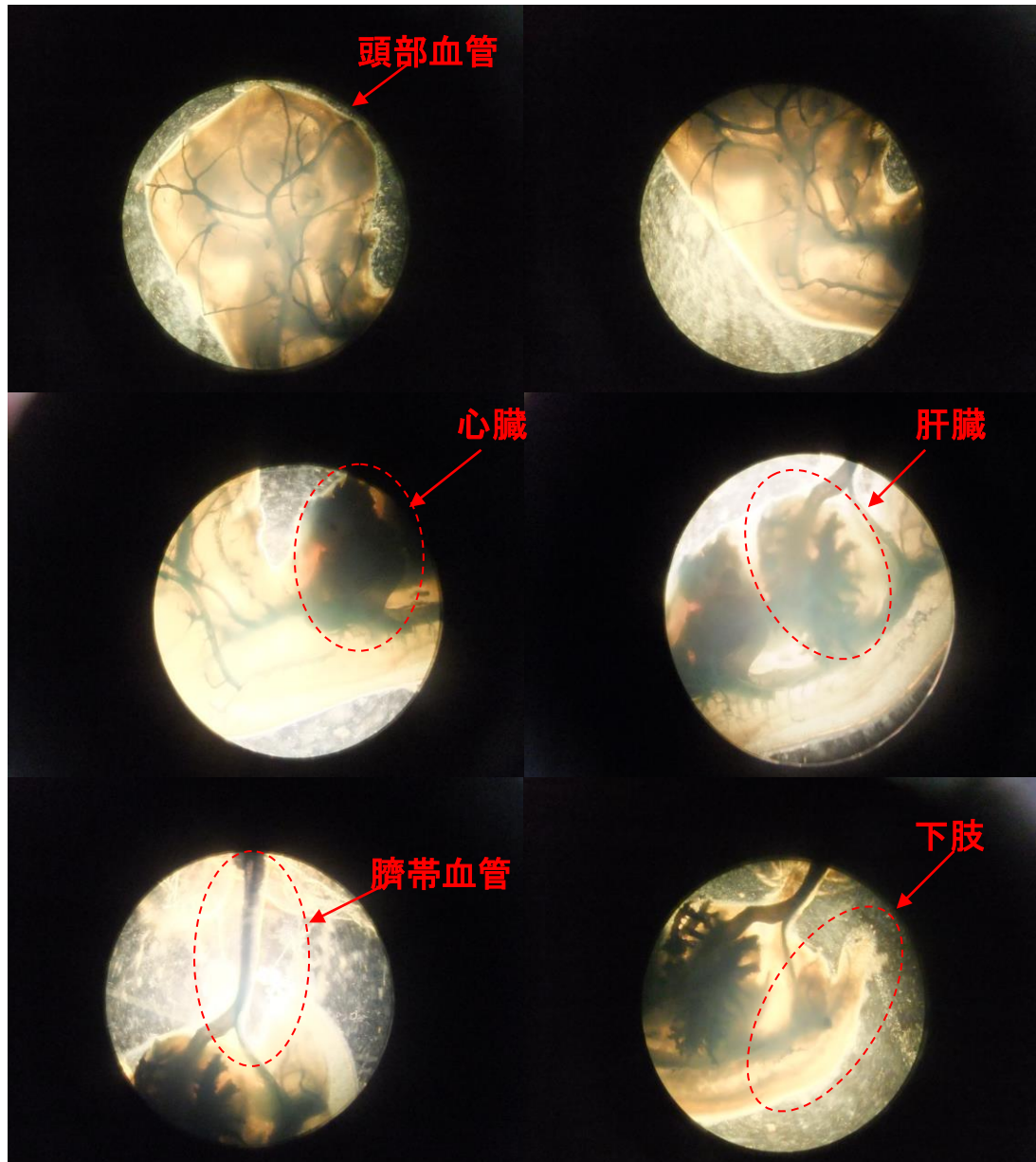


Fig. 16 発生期 E13.0 マウス血管鑄型の明視野観察

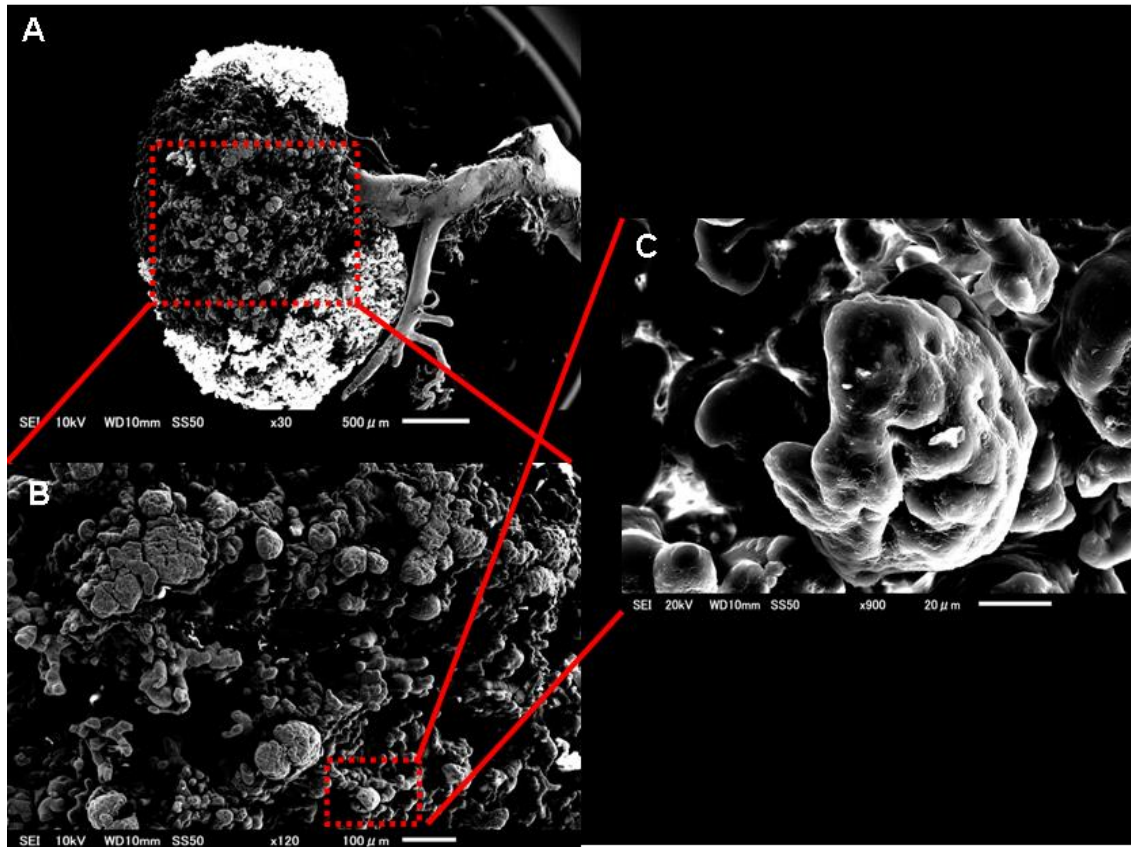


Fig. 17 E18.5 マウス発生腎の血管鑄型
A: E18.5 発生腎; B: A の拡大図 (上部四角); C: B の拡大図 (下部四角)

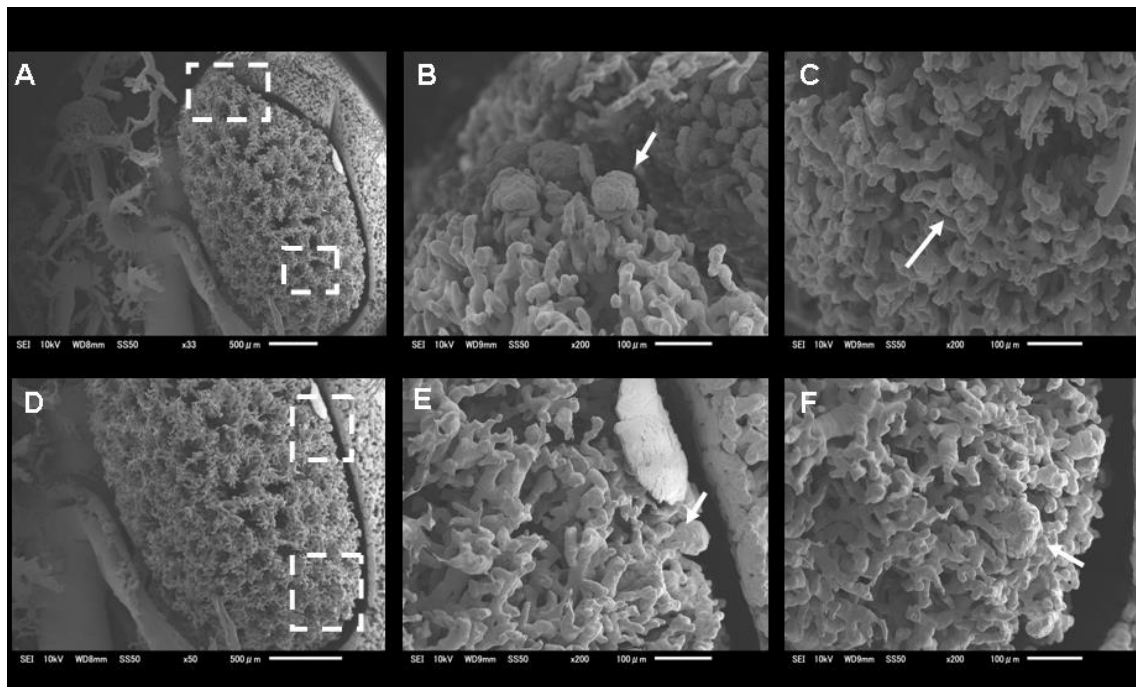


Fig. 18 E17.5 マウス発生腎の血管鑄型

A: E17.5 発生腎; **B:** A の拡大図(上部四角)、矢印: 糸球体形成終了;

C: A の拡大図 (下部四角、矢印: 形成中の血管;

D: E17.5 発生腎; **E:** D の拡大図 (上部四角、矢印: 糸球体形成終了

F: D の拡大図(下部四角)、矢印: 糸球体形成終了

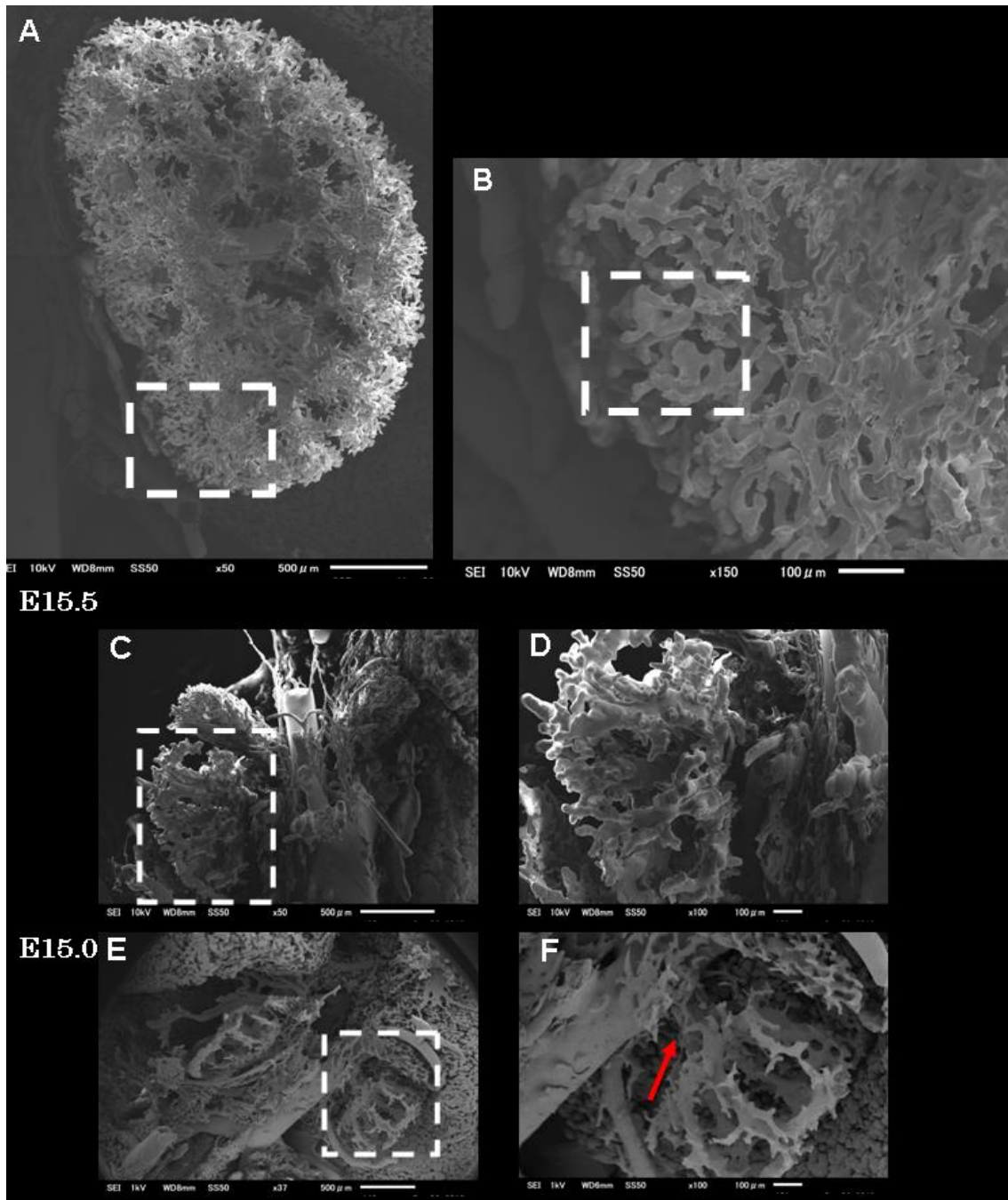


Fig. 19 E16.5、E15.5、E15.0 マウス発生腎の血管鋳型
 A: E16.5 発生腎; B: A の拡大図(上部四角); C: E15.5 発生腎; D: C の拡大図 (下部四角); E: E15.0 発生腎; F: E の拡大図(上部四角)、矢印: 背側大血管が発生腎へ侵入する血管

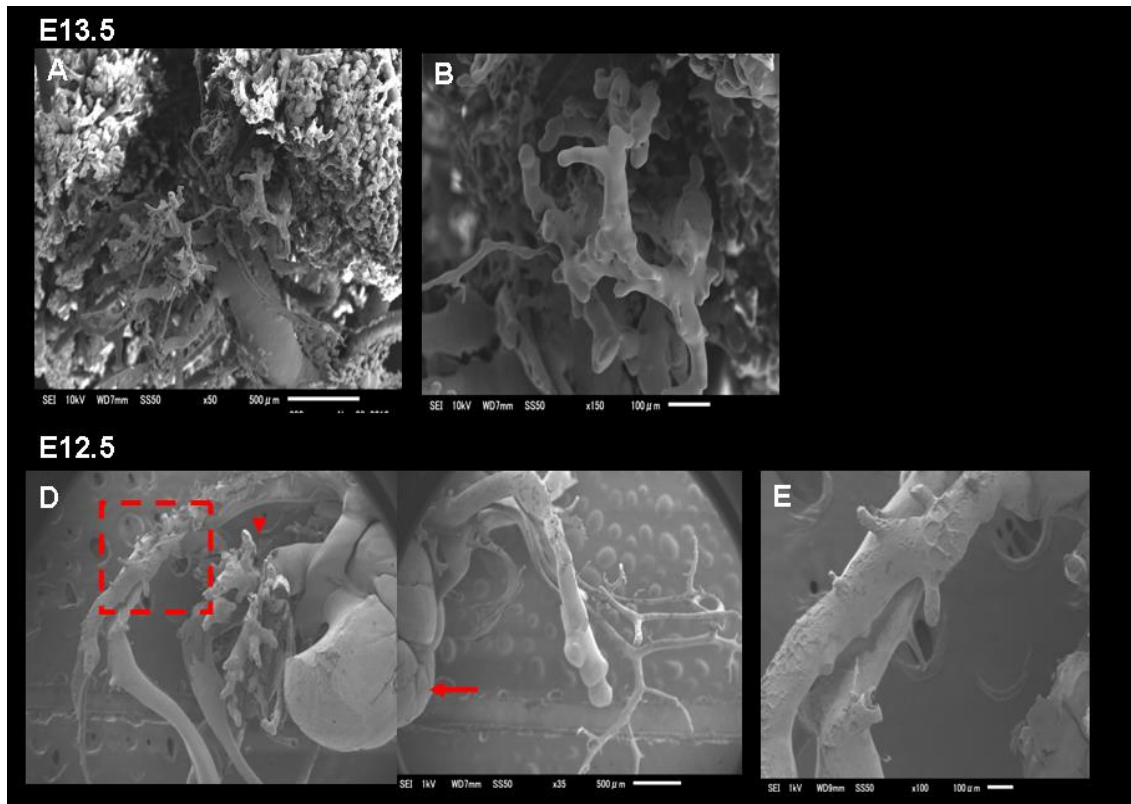


Fig. 20 E13.5、E12.5 マウス発生腎の血管鑄型
A: E13.5 発生腎; B: A の拡大図; D: E12.5 胎仔全体像, 矢印: 心臓; E: D の拡大図

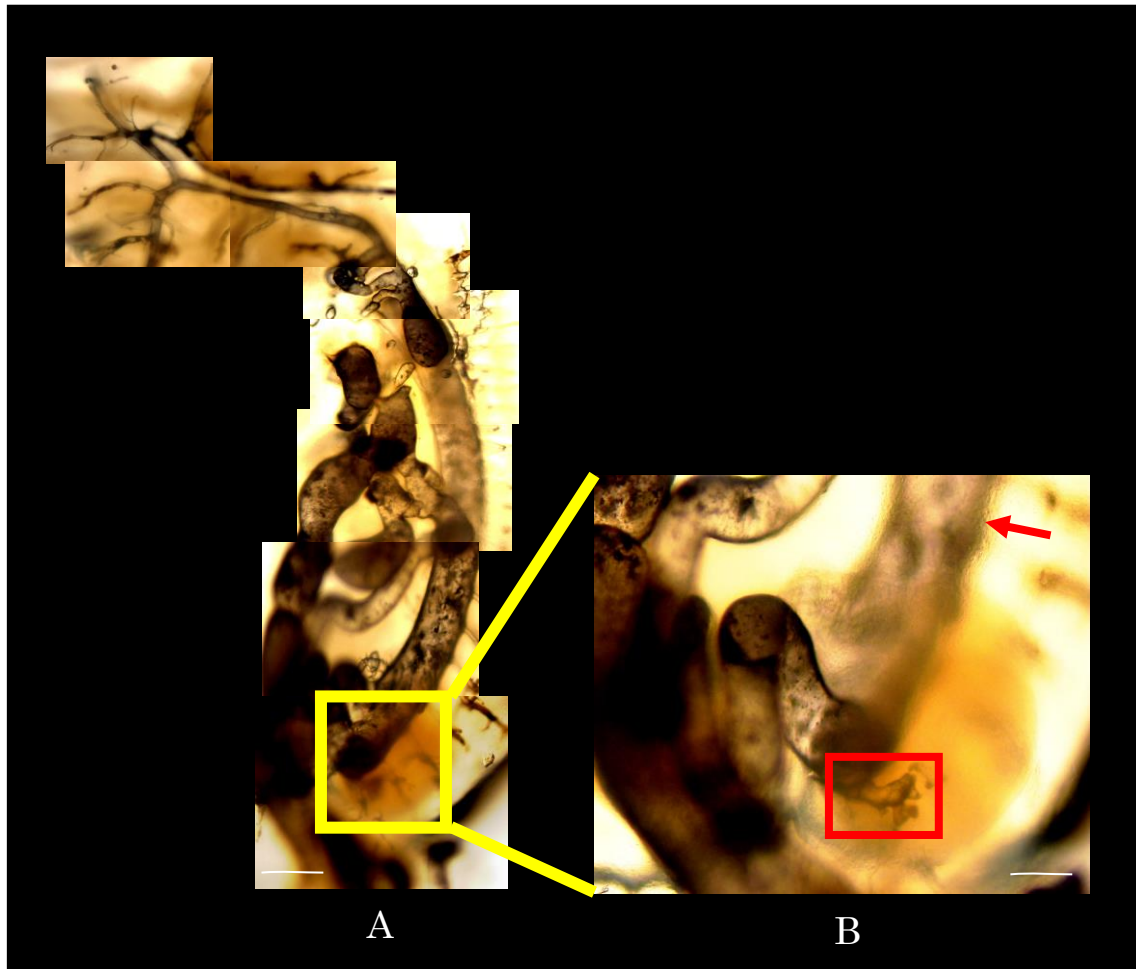


Fig. 21 墨と鋳型樹脂によるE12.375 発生腎血管
A: 全身マウス胎仔鋳型; B: 拡大写真、矢印: 背側大血管
(scale bar: 500 μ m (A)、100 μ m (B))

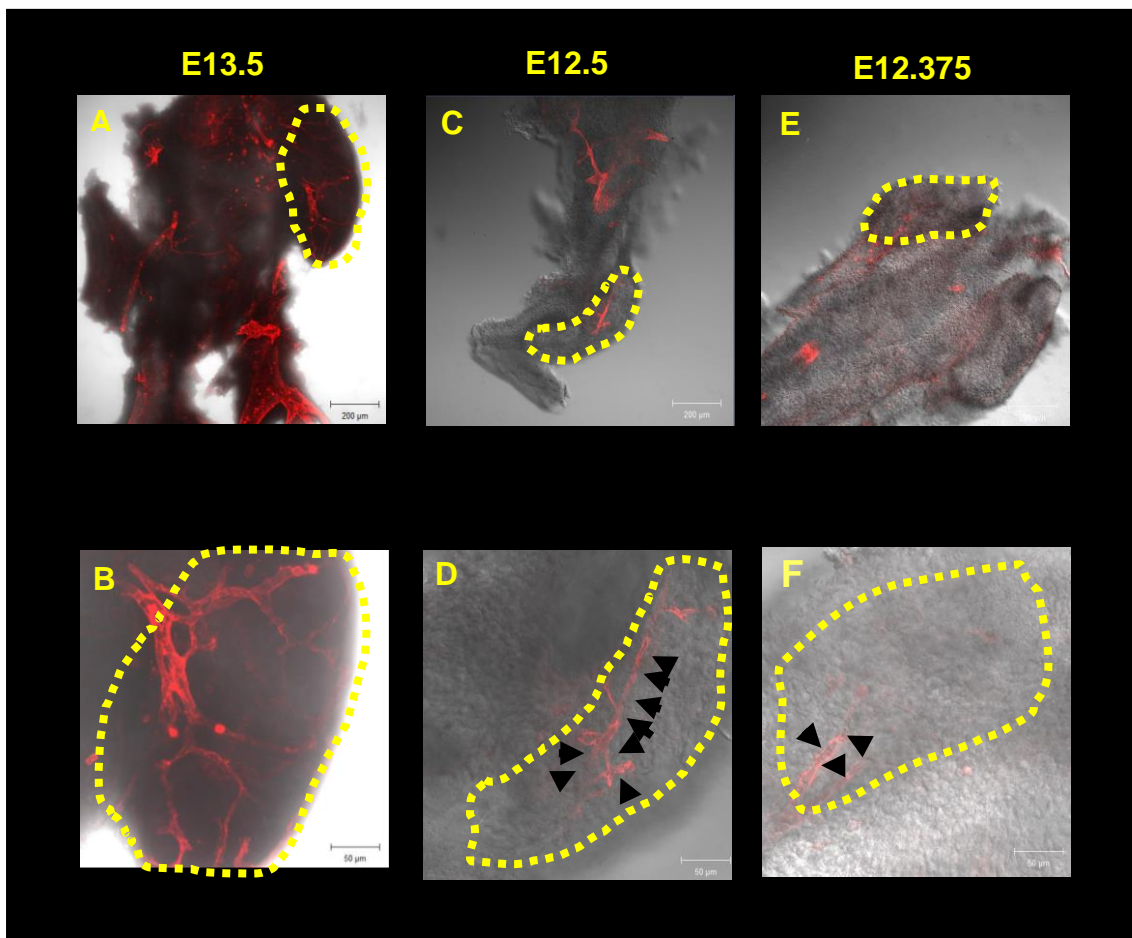


Fig. 22 蛍光色素灌流による発生腎血管
 A、C、Eの虚線領域：発生腎全体； B、D、F： A、C、E其々の拡大写真
 (scale bar: 200 μ m (A)、50 μ m (B))

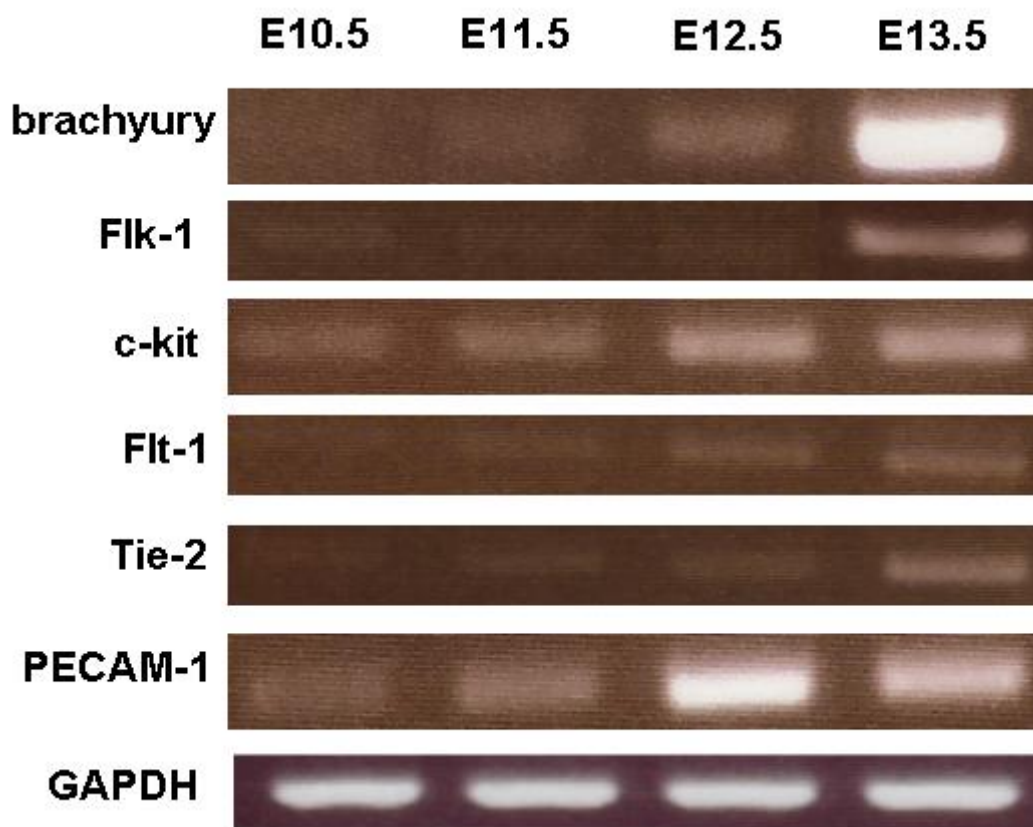
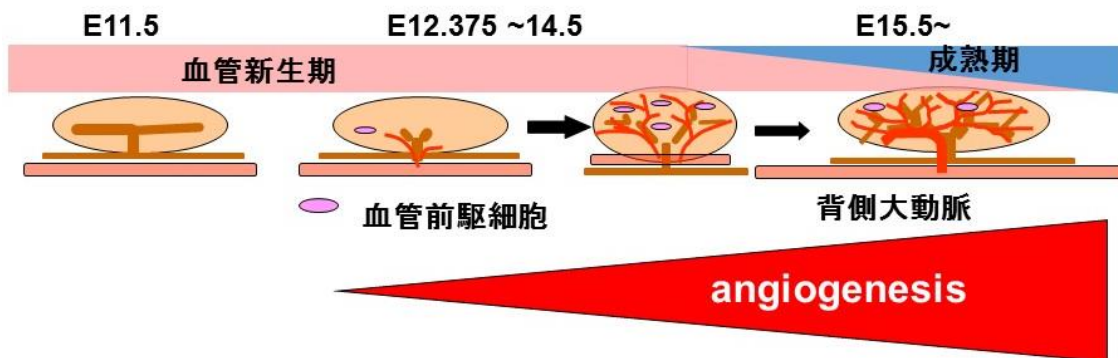


Fig. 23 発生腎初期における血管遺伝子の RT-PCR

発生期腎臓におけるangiogenesisの解明



背側大動脈は腎臓発生期に侵入することを明らかにした

Fig. 24 発生腎初期における angiogenesis の時期

2-12 発生腎における angiogenesis の必要性

これまでの研究では angiogenesis の起源は発生初期に背側大血管から発生腎内に血管が侵入することを検証した。次は生体内の他の大動脈が発生期腎に同様な angiogenesis を起こすか、また angiogenesis を起こしたら、発生腎にどのような役割を働くかを明らかにしたい。そのため、マウス胎仔の発生腎を成体マウスの大腿血管に移植し、host 側からの angiogenesis により腎組織内の血管網、糸球体の成熟化を検証した。なお、コントロールとして大血管が存在してい背部皮下に移植した発生腎組織を用いた。

2-13 材料と方法

雄、雌マウスは動物実験室で飼育した、8~25 週齢の雌マウスを妊娠させ、マウスから摘出した E11.5 胎仔マウスの発生腎を使用した。移植する雄マウスは 8~12 週齢を使用した。

2-13-1 大腿血管および背部皮下組織への発生腎移植

E11.5 マウス胎仔から取り出した発生腎は DMEM に 10%FBS (Bio Whittaker) と 1% streptomycin/penicillin (SIGMA) を混ぜた培地に移植までの間浸けておく。次に host である 8-12 週令の雄マウスは前日から免疫抑制剤 Tacrolimus monohydrate (2 mg/kg; TokyoChemical Industry Co., Ltd) を腹腔内投与しているマウスに sodium pentobarbital (50 μ g/g; Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd) 注射し麻酔する。次に左大腿部分を切開し大腿血管を露出する。移植は大腿血管の上に後腎を置き、その上から 20 μ l のフィブリン糊(Kaketsuken)を添加し移植した。もう一方の移植では、麻酔をしたマウスの背部を切開し、移植まで浸けておいた発生腎を背部皮下組織に移植した。この移植も同様に、移植前日から免疫抑制剤を投与し、さらに両者とも移植期間中毎日、持続的に免疫抑制剤を腹腔内投与した。移植 2 週間後、マウスを麻酔し、移植した後腎を摘出した。

2-13-2 トマトレクチンによる移植腎臓血管のラベリング

移植マウスを麻酔する。麻酔したマウスの尾静脈から DyLight594-conjugate Lycopersicon Esculentum Lectin (Tomato lectin) (Vector Laboratories) を 20~30 秒かけて注入し、5 分間灌流させた後開胸し、マウスの心臓から 10%ホルマリンを流した[18]。その後、移植腎を摘出し、10%ホルマリンに 1 時間固定し、PBS にて洗浄、30% sucrose に一晩漬ける。その後 OCT コンパウンドにいれ液体窒素にて固める。切片するまで -80°C にて保存する。厚さ 20 μ m の切片は OCT を洗浄し、DAPI を含む 20 μ l の封入

剤で切片をスライドガラスに封入し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

2-13-3 免疫蛍光染色

乾燥させた切片を PBS(-)で洗浄、OCT コンパウンドを落とした。0.01%サポニン溶液を切片にのせ、シェーカー上で 15 分間反応させた。サポニン溶液を洗い落とし、0.1%BSA/PBS で 1 時間～一晩ブロッキングさせた。BSA 溶液を洗い落とし、100 倍に希釈した一次抗体で 1.5 時間反応させた。一次抗体を洗い落とし、100 倍に希釈した二次抗体で 1.5 時間反応させた。二次抗体を洗い落とした。風乾後、fluoromount、mountquick を用い、カバーガラスに封入した。使用した一次抗体は其々 DAPI (Abcam), PECAM-1 (Santa Cruz Biotechnology), α SMA (Abcam), synaptopodin (Santa Cruz Biotechnology)であり、二次抗体は 其々Alexa Fluor 568 と Alexa Fluor 488 を使用した。

2-14 実験結果

2-14-1 蛍光灌流による移植腎への angiogenesis

host からの血管侵入により移植腎表面で血管が分岐していた (Fig. 25 A 矢印)。トマトレクチンを尾静脈から注入し全身に灌流した後、移植後腎を摘出し、host 側から移植片への血管侵入状態を観察した。移植 2 週間後の移植腎内には血管網が形成されており (Fig. 25 B)、血管内部まで Tomato lectin が灌流していることが示された (Fig. 24 C)。

2-14-2 angiogenesis による血管形成と糸球体形成

発生腎組織を in vivo 同様の腎組織にするためには血管や糸球体を含めた構造を構築しなければならない。そこで本研究は、大血管へ後腎 (E11.5) を移植することにより host からの angiogenesis で血管を含めた糸球体構造を構築できるか試みた。移植 2 週間後に大腿血管へ移植した後腎は成長し大きくなっていた (Fig. 26 A)。後腎には血管侵入していることが分かった (Fig. 25 A 矢印)。移植した後腎を摘出し明視野にて観察すると後腎に血管が侵入していることが分かった (Fig. 26 B)。次にアダルト腎臓 (10 週齢)、新生仔マウス腎臓 (5 日目)、大腿移植後腎、背部移植後腎、移植前後腎 (E11.5)、を比較した (Fig. 26 C)。大腿移植後腎は移植前の後腎と比較すると極端に大きく成長していることが分かった。新生仔腎臓 (5 日目) と比較すると大きさ、色ともに類似していることが分かった。しかし、血管侵入のない背部移植後腎は血液の流入がないため白色であった。HE 染色の結果は髄質部 (Fig. 26 C, E, G, I) を比較すると大腿移植後腎はアダルト腎臓や新生仔腎臓と同様に糸球体や血管の存在を確認することができた (Fig. 26 C, E, G 矢印、矢頭)。しかし、背部移植では分化した糸球体、血管を観察出来なかった (Fig. 26 I)。アダルト腎臓にある大血管より小さいが、大腿移植後腎にも大血管の存在が確認できた (Fig. 26 G 矢頭)。皮質部 (Fig. 25 D, F, H, J) の HE 染色では、新生仔腎臓、大腿移植腎臓ともに未分化の組織の存在を表す (Fig. 26 F, H; 点線)。アダルト腎臓、新生仔腎臓、大腿移植腎臓ともに糸球体の形成の存在を確認できた (Fig. 26 D, F, H 矢印)。皮質側も髄質同様にネフロン前駆体や糸球体形成は見られなかった (Fig. 26 J)。

2-14-3 各時期の腎臓と移植腎の免疫蛍光染色画像

免疫蛍光染色による成体腎臓、新生仔腎臓、大腿移植腎臓、背部移植腎臓の血管や糸球体の発現を調べた (Fig. 27)。血管平滑筋細胞に多く存在するタンパク質である α SMA (緑)、成熟血管マーカーである PECAM-1 (赤) と核マーカー DAPI (青) を調べた (Fig. 27 A-F)。成体腎臓や新生仔腎臓内に無数の血管や α SMA をともなった成熟血管を観察した (Fig. 27 A, B, E, F)。大腿移植腎臓においては血管が形成され、 α SMA を発現す

る血管も形成された (Fig. 27 I, J)。点線部分を拡大した画像は、血管の内側に PECAM-1、外側には α SMA の発現があり、成熟した血管の形成を示唆した (Fig. 27 J)。背部移植後腎に関しては、 α SMA (緑) と PECAM-1 (赤) をともなった大血管の形態および局在が観察出来なかった (Fig. 27 M,N)。さらに糸球体の足細胞に発現するタンパク質である synaptopodin (緑)、PECAM-1 (赤) と DAPI (青) にて糸球体の発現するタンパク質を調べた。その結果、成体腎臓は synaptopodin, PECAM-1 と DAPI を発現している糸球体が確認し (Fig. 27 C, D)、大腿移植腎臓内にも synaptopodin と PECAM-1 の発現する糸球体の存在が観察された (Fig. 27 K, L 矢印)。しかし、背部移植後腎では synaptopodin (緑)、PECAM-1 (赤) を発現する糸球体の形態は観察できなかった (Fig. 27 O, P)。これらの結果により、大腿移植腎臓は新生仔腎臓の糸球体に類似した構造であった (Fig. 27 G, H 矢印)。

2-14-4 各時期の腎臓と移植腎の糸球体数

糸球体数をそれぞれの時期で比較すると、成体腎臓では 10971 ± 577 、新生児 5 日目腎臓では 5832 ± 561 、大腿移植腎臓では 3271.6 ± 260 、背部移植腎臓では 0 となった (Fig. 28)。

2-15 考察

発生期腎臓の angiogenesis(背側大血管)の侵入は発生初期から始まっている。その重要性を確認するため、背側大血管と類似している大腿血管に異所性移植により検討した。

移植により実際に host 側からの血管侵入が移植後腎内でどのような血管網形成および糸球体と結合しているかどうかを Tomato lectin 灌流による方法で検証した。この方法は、腫瘍や足場を用いた移植による血管形成の観察に多く利用されている。移植 2 週間後のマウス尾静脈から Tomato lectin を灌流した結果、移植した腎臓が大腿血管に生着 (engraftment) し、host からの血管侵入が血管網や尿細管周囲の血管形成を促したと考えられる。host と移植した腎臓は異所移植でも血管侵入による血管網や糸球体との結合を観察できたことから、移植した腎臓内部を HE や免疫蛍光染色にて解析した。移植した腎臓は大きく成長し host からの血管侵入により全体が赤みを帯びていた。移植腎と其々の腎臓に比較すると、in vivo の新生仔腎臓 5 日目と同様の大きさまで成長していた。しかし、背部移植腎は生着していないし、血管の侵入もないため白色を呈した。一方、生着した腎臓を報告された研究[48]と比較すると同様の血管構築していることが分かった。次に形態観察した大腿移植腎臓を HE 染色している報告された研究[49]と変わらないことが分かった。だが、報告された研究では移植 3 週間に対し[49]、本研究では 2 週間移植で、同様の結果が得られている。そして、大腿移植腎臓の HE 染色は新生仔腎臓 5 日目に近い構造となっている。蛍光によるタンパク質の発現を調べるため

に免疫蛍光染色を用いて移植後腎を観察した。成体腎臓ではすべてのマーカーの発現があり、同様に新生児腎臓、移植腎臓も発現があった。大腿移植腎臓の血管網、糸球体は新生児腎臓に近い形態を示した。以上のことから、大腿移植腎臓は host 側の angiogenesis により、酸素、栄養、EPC [39,40]などの供給が十分にあるため、腎臓の成長と成熟を促したと考えられる。angiogenesis は発生腎において成長、成熟するために必要であること示唆された (Fig. 29)。

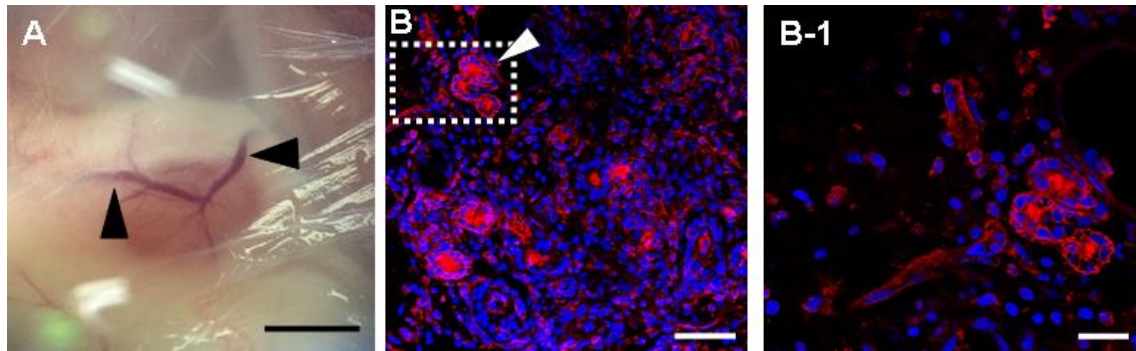


Fig. 25 host 腎臓から大腿移植腎への angiogenesis

A : 大腿移植 2 週間後の発生腎、矢頭 : host 側からの血管新生、B : 大腿移植腎臓内に Tomato lectin を灌流した免疫蛍光染色画像、矢頭 : 移植腎内に血管侵入を示す画像、B-1 : B の拡大図

(scale bars = 2 mm (A)、50 μ m (B)、20 μ m (B-1))

Tomato lectin(赤)、DAPI (青)

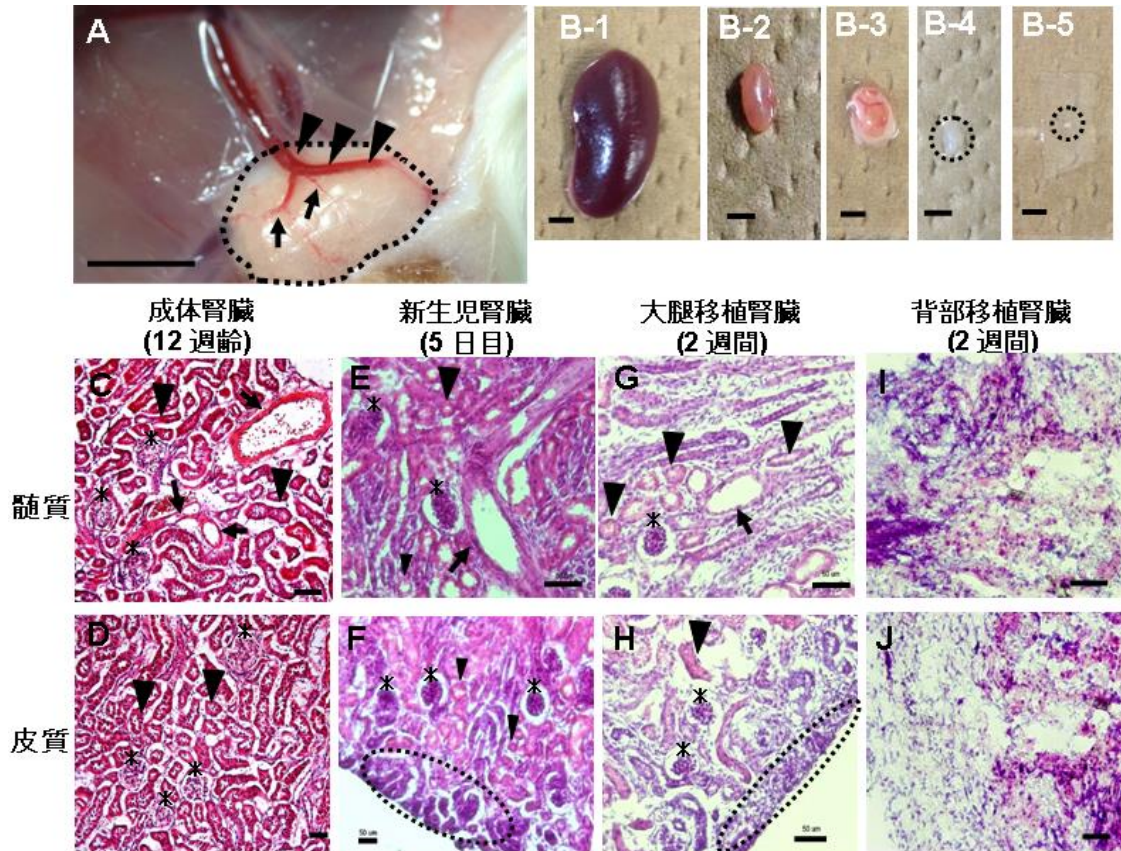


Fig. 26 各時期の生体腎と各移植腎の比較

A : host 側から血管新生した移植腎、 矢印 : 大血管による血管新生、 矢頭 : 分岐した血管、 B-1 : 成体腎臓、 B-2 : 新生仔腎臓、 B-3 : 大腿移植腎臓、 B-4 : 背部移植腎臓、 B-5 : 発生腎 (E11.5)、 C、 E、 G、 I : 髓質側の HE 染色画像、 D、 F、 H、 J : 皮質側の HE 染色画像

(scale bars = 2 mm (A, B1-5)、 50 μ m (C-J))

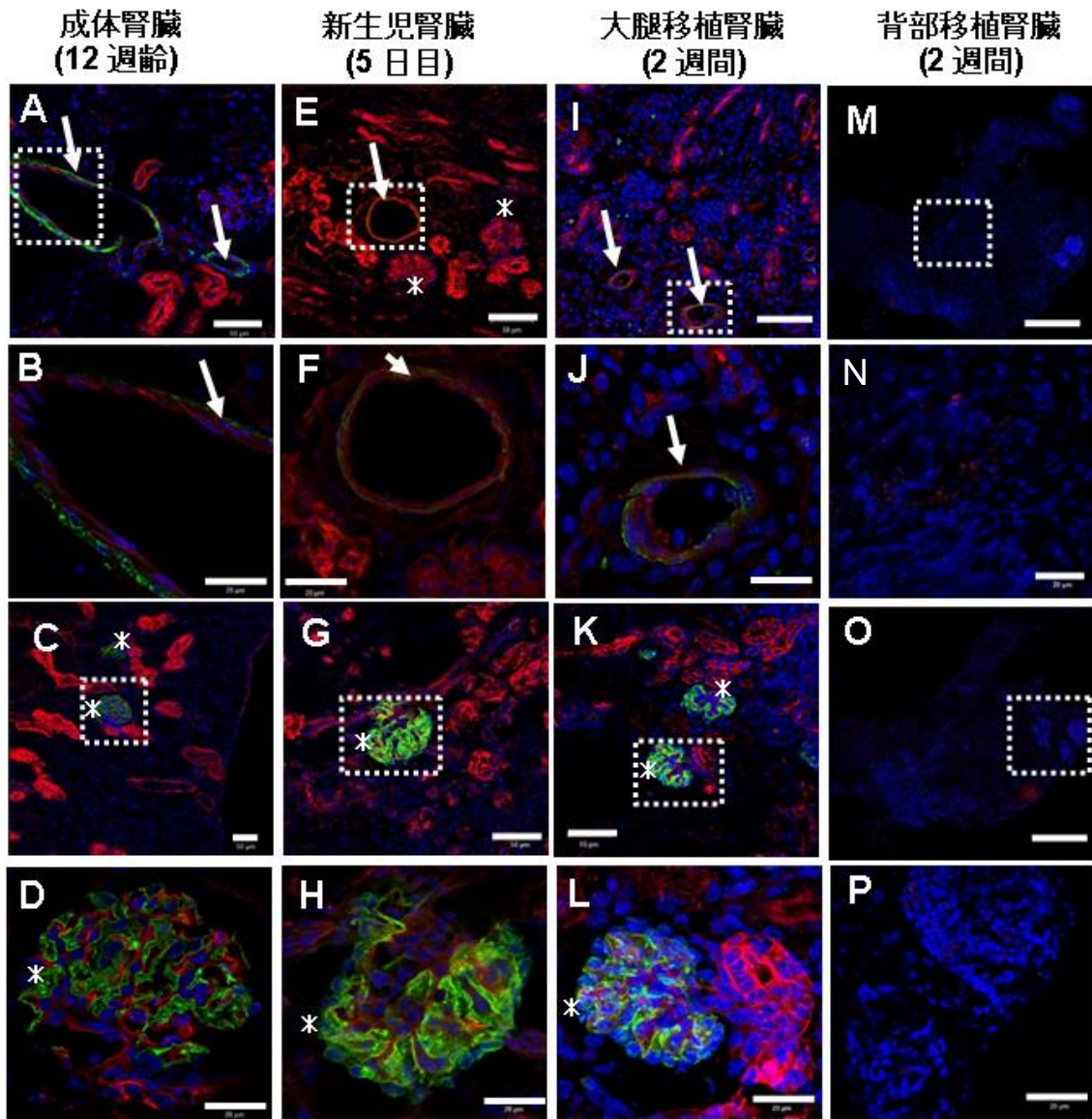


Fig. 27 各時期の生体腎と各移植腎の免疫蛍光染色比較

A : 成体腎臓内の大血管、B : A の拡大図、C : 成体腎臓内の糸球体、D : 拡大図、E : 新生児腎臓内の大血管、F : 拡大図、G : 新生児腎臓内の糸球体、H : 拡大図、I : 大腿移植腎臓内の大血管、J : 拡大図、K : 大腿移植腎臓内の糸球体、L : 拡大図、M : 背部移植腎臓内の画像、N : 拡大図、O : 背部移植腎臓内の画像、P : 拡大図

(scale bars= 50 μ m (A, E, I, M, C, G, K, O)、20 μ m (B, F, J, N, D, H, L, P))

synaptopodin (緑)、 α SMA (緑)、PECAM-1 (赤)、DAPI (青)

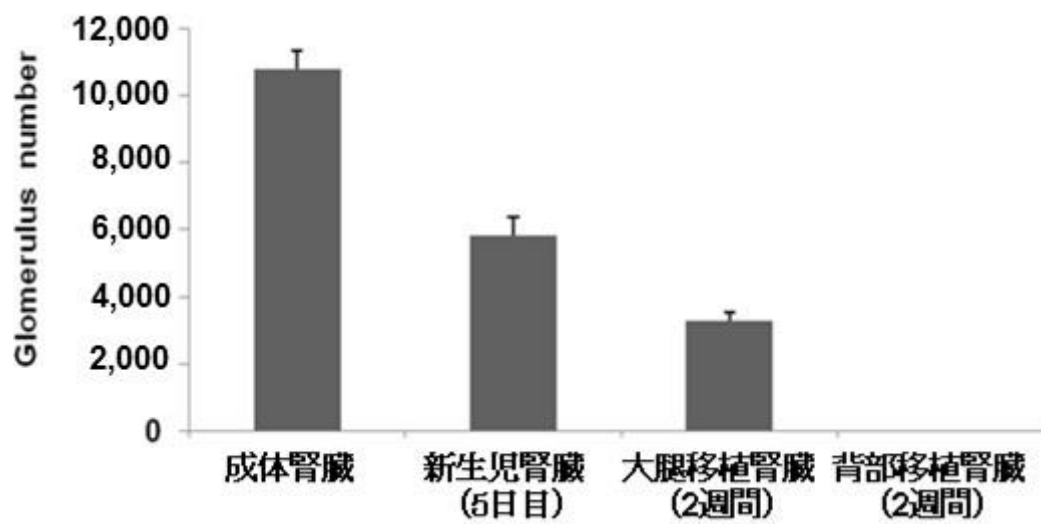


Fig. 28 各時期の生体腎と各移植腎の糸球体数の比較

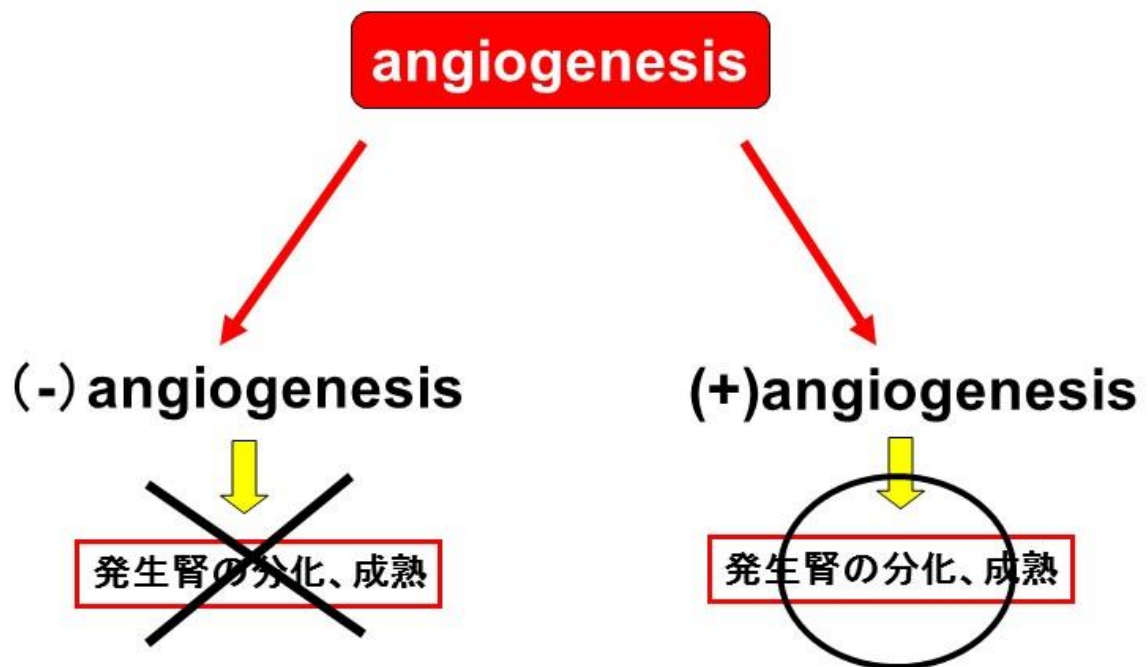


Fig. 29 angiogenesis の必要性

第3章 angiogenesis と vasculogenesis を利用した発生期腎臓組織

の再構築

3-1 研究概要

前章では発生期腎臓組織を直接移植し、腎臓組織の再構築に成功した。しかしながら、腎臓組織を人工的に構築する際、細胞から培養し分化させ、組織化し、移植するプロセスが必要となる。腎臓再生に関して、発生腎臓組織を用いて培養による方法で尿管芽の分岐、伸長を報告されたが、血管形成は言及されていない。最近では、ラットの腎臓幹細胞から腎臓組織の形成に成功した報告がある。しかし、複雑な血管網の形成までは至っていない。また、*in vitro* 組織や細胞を長期にわたって培養しても、直径 100-200 μm 以上組織では血液による循環がなければ組織自体は死滅する。ゆえに血管ネットワークは組織の成長と恒常性において重要である。

そこで本章は上記の問題点を克服するため、二つのステップを用いた。ステップ 1 では E11.5 の発生腎臓を取り出し、気液培養にて腎臓組織レベルにて培養した。培養する際、VEGF（血管内皮細胞成長因子）添加なし(-)、或は添加あり (+) の 2 種類培地を用いて腎臓組織の血管網再構築を検討した。培養後の発生腎臓を host マウスに移植し、腎臓における糸球体の成熟および血管網の形成を検討した。

3-2 材料と方法

3-2-1 実験動物

8~20 週齢の雌および雄マウス、胎仔マウスは E11.5 を使用した。

3-2-2 胎仔の摘出

妊娠マウスから双角子宮を取り出し DMEM の中に浸ける。実体顕微鏡下にて卵黄嚢と羊膜から胎仔を取り出す。取り出した胎仔を実体顕微鏡下にて 30 G 針(Dentronis) を使用して発生腎臓を摘出し、DMEM に浸ける。

3-2-3 発生腎臓培養

DMEM に浸けておいた発生腎臓を pore size 5 μm の ポリカーボネート濾過膜上で培養した。50 ml 中の培養液に 0.25 g DMEM、0.265 g HamF12、0.095 g NaHCO₃、1 ml ITS、10% FBS、1% penicillin/streptomycin をコントロール培地とし、さらに 50 ng/ml rhVEGF を添加した培地を対照培地として使用した。37°C、5% CO₂ in air で培養し、培養液は 2 日毎に交換、培養期間は 10 日間とした。観察時期は 3 日目、7 日目、10 日

目とした。

3-2-4 培養腎移植

ポリカーボネート上で3日間培養した発生腎を剥がし、DMEMに10%FBSと1% streptomycin/penicillinを混ぜた培地に移植まで浸けておいた。hostである8-12週令の雄マウスは前日から免疫抑制剤 Tacrolimus monohydrate (2 mg/kg)を腹腔内投与しているマウスの腹腔内に sodium pentobarbital (50 μ g/g)注射し麻酔する。移植は腸間膜血管の上に発生腎を置き移植した。移植期間中は免疫抑制剤 Tacrolimus monohydrateを毎日腹腔内投与した。移植2週間後、マウスを麻酔し、移植片の発生腎を取り出し、HE染色、免疫蛍光染色を行った。培養から移植までの実験方法を Fig. 30に示した。

3-2-5 凍結切片の作成

発生腎の固定・凍結

発生腎をPBS(-)で洗浄し、付着した血球細胞などを洗い落とした。組織を3 cm dishに移し、10%中性ホルマリンを用いて室温で20~40分間固定した。10%中性ホルマリンを廃液ビンに捨て、10% sucrose溶液に室温で2時間浸けた。10% sucrose溶液を捨て、20% sucrose溶液を入れて室温で22h浸けた。同様に30% sucrose溶液に4℃で1時間~一晩浸けた。組織についての溶液をキムワイプで軽く落とし、OCT compoundに入れて4℃で30 min放置した。液体窒素で組織を凍結させ、-80℃にて保存した。

凍結切片の作成

凍結した組織を2時間マイクロトーム内に置き、その後、厚さ10 μ mの切片を作成した。切片をスライドガラスにはり付け、1時間、風乾した後、4℃で保存した。

3-2-6 HE染色

切片上に冷アセトンに乗せ4分間固定し、DWで2回、最後はdDWで1回洗浄した。ヘマトキシリンで1分間染色した後、DW x 3回、dDW x 1回洗浄した。エオシンで1分間染色した後、DW x 1回、dDW x 1回洗浄した。70%、90%、95%、100% (3回) エタノールで十分に脱水した。顕微鏡で軽く観察した後、キシレンに2回置換し、非水溶性風入剤で風入し、封乾させた。その後、倒立顕微鏡で観察した。

3-2-7 Whole mount 発生腎免疫染色

培養した発生腎をPBS(-)で3回洗浄した。組織を3 cm dishに移し、10%中性ホルマリンを用いて室温で60分間固定した。10%中性ホルマリンを廃液ビンに捨て、PBS(-)で3回洗浄した。サポニン溶液を洗い落とし、0.1%BSA/PBSで1時間~一晩ブロ

ッキングさせた。BSA 溶液を洗い落とし、1/100 倍に希釈した一次抗体で一晩反応させた。一次抗体を洗い落とし、1/100 倍に希釈した二次抗体で 1.5 時間反応させた。二次抗体を洗い落とし、1/100 倍に希釈した DBA で 1.5 時間反応させた。DBA 溶液を洗い落とし、風乾した後、fluoromount、mountquick を用いてカバーガラスに封入した。

3-2-8 免疫蛍光染色

乾燥させた切片を PBS (-) で 10 回×3 セット洗い、OCT コンパウンドを落とした。0.01 %サポニン溶液を切片にのせて、シェーカー上で 15 分間反応させた。サポニン溶液を洗い落とし、0.1%BSA/PBS で 1 時間～一晩ブロッキングさせた。BSA 溶液を洗い落とし、1/100 倍に希釈した一次抗体で 1.5 時間反応させた後、一次抗体を洗い落とした。1/100 倍に希釈した二次抗体で 1.5 時間反応させた後、二次抗体を洗い落とした。切片を風乾した後、fluoromount、mountquick を用いてカバーガラスに封入した。

3-2-9 共焦点顕微鏡観察

免疫蛍光染色したサンプルは共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss) にて観測した。FITC および Alexa568 は 488 と 543 nm の波長を励起させ観察した。

3-3 実験結果

3-3-1 *in vitro* 培養系における発生腎内部の尿管芽とネフロン前駆体の形成

E11.5 の胎仔から取り出した発生腎をポリカーボネート膜上で培養した。*in vitro* 工程では成熟した糸球体が形成される期間、最大で 10 日間培養した。移植に関する工程では、ポリカーボネート膜上で 3 日間後、発生腎を成長させたのち、アダルトマウスの腸間膜血管へ 2 週間移植とした。その後、移植した発生腎を解析した。VEGF (-) 培養腎を明視野で観察すると、日数が進むにつれて、尿管芽の分岐が多くなっていた (Fig. 31 A, B, C)。E11.5 では尿管芽が双葉の様な形をしていたものが、培養 3 日目では尿管芽 (DBA: 緑) が分岐、伸長した様子を観察した (Fig. 32 D)。拡大図を観察すると尿管芽の先端にネフロン前駆体 (WT-1: 赤) [51, 52] が形成されている (Fig. 32 D-1)。培養 7 日目になると、尿管芽の分岐数の増加がみられ、WT-1 を発現するネフロン前駆体も数も多く現れた (Fig. 32 E)。7 日目の拡大図では 3 日目の尿管芽先端にしか存在していなかったネフロン前駆体が renal vesicle を形成していた (Fig. 32 E-1)。培養 10 日目になると、尿管芽やネフロン前駆体の形成の数は顕著な差が認められなかった (Fig. 32 F)。拡大写真では、renal vesicle を形成するネフロン前駆体の発現がより強く現れた (Fig. 32 F-1)。一方、VEGF (+) (50 ng/ml) 培地で培養した発生腎において、明視野観察では、尿管芽の分岐、伸展、発生腎の大きさは培養日数が進むにつれ顕著に促進していた (Fig. 31 D, E, F)。VEGF (-) にて培養した発生腎と比較したところ、培養 3 日目では大きさは変わらないが、7 日目になると著しい成長が観察された (Fig. 32 G, H, I)。また、免疫蛍光染色において VEGF (+) 培養 3 日目では、より多くの尿管芽の分岐、伸長が観察された (Fig. 32 J)。Cap mesenchyme に WT-1 の発現も観察された (Fig. 29 J-1)。培養 7 日目では、尿管芽、ネフロン前駆体の数も増え (Fig. 32 K, K-1)、10 日目になると、発生腎の尿管芽 (緑)、ネフロン前駆体 (赤) の目視上の数は 7 日目との大差がなくなった (Fig. 32 L, L-1)。

3-3-2 *in vitro* 培養系における発生腎内部の尿管芽、糸球体および血管の形成

成体の腎臓内には複雑に形成された大小異なる血管の存在がありその血管同士が複雑に絡み合った血管ネットワークを形成していた [52]。その中でも血液濾過を機能する糸球体は毛細血管が複雑に絡み合い球状の形をしていた [52]。本実験は血管網や糸球体を *in vitro* にて形成可能かどうかを検討した。使用した血管マーカーは血管内皮細胞の接着因子 PECAM-1 である [53]。VEGF (-) による 3 日間培養では、発生腎の辺縁部に PECAM-1 (血管内皮接着マーカー: 赤) の発現が観察された (Fig. 33 A)。発現部位を拡大してみると線状を形成していることが分かった (Fig. 33 D)。培養 7 日目では 3 日目と同じく辺縁部に線状の血管があり (Fig. 33 B)、拡大図では線状形成の中心部が 2 本に分岐していた (Fig. 33 E)。10 日目では線状の形成していたものが観察できな

ったものの、球状の構造をなした形態を明らかにした (Fig. 33 C, F)。VEGF (+) による培養では、3 日目において VEGF (-) と異なり、原始血管叢状 (primary vascular plexus) の形成が認められた (Fig. 33 G, J)。培養 7 日目では、密なネットワーク構造を示した (Fig. 33 H, K)。10 日目の培養では、ネットワークが観察できなくなった。VEGF (-) と同様に球状構造を呈した形態を認められ、その周囲には、内皮細胞の散在が観察された (Fig. 33 I, L)。

3-3-3 in vitro 培養によるポドサイトマーカーの発現と成熟糸球体数

本実験では糸球体の濾過機能の要ともいえるポドサイトを in vitro 培養系で発現するかどうかを調べた。培養 7 日目から VEGF (-) 培地、VEGF (+) 培地共に synaptopodin (ポドサイトマーカー：緑) および WT-1 (赤) の発現を呈したポドサイトを観察できた (Fig. 34 A, A-1, B, B-1)。成熟糸球体数の計測は、synaptopodin, WT-1, PECAM-1 三者とも発現した糸球体のみを成熟糸球体としてカウントした。培養 7 日目では synaptopodin と WT-1 の発現はあったが PECAM-1 の発現はないため両培養共に 0 と計測した。10 日目では 3 種類のマーカーの発現があったので糸球体数を計測した。その結果、VEGF (-) 培地に比べ、VEGF (+) 培地では糸球体の形成数に顕著な差が見られた (Fig. 34 E) もの、VEGF (-) 培地でも成熟糸球体を形成させることが可能であった。

3-3-4 in vitro 培養からの移植による腎臓再生

in vitro 培養にても血管網形成を促せなかったことから、移植による腎血管再構築を試みた。移植する培養日数として 3 日目とした。その理由として両培養系とも 3 日目までは WT-1 (ネフロン前駆体)、PECAM-1 (血管) の両マーカーが発現し三次元の組織形態も保たれたためである。この培養腎を栄養、酸素が豊富な腸間膜血管上に移植し 2 週間後、腸間膜血管に生着、成長した培養腎写真を (Fig. 35 A, B) に示した。移植腎と同時期の新生仔 7 日目腎臓と成体腎臓 (8-12 週齢) を比較した。各培養移植腎と同時期の新生仔 7 日目腎臓と比較した結果、顕著な差は認められなかった (Fig. 35 C-b, C-c, C-d)。目視による観察では、移植腎に血管侵入により少し赤み帯びていた。 (Fig. 35 C-d)。HE 染色にて 4 種類の腎臓の形態を比較した結果、成体および新生児 7 日目の腎臓は複数の糸球体が観察された (Fig. 35 D, F, E, G)。両培養系移植腎共に、糸球体の形成および血液を濾過する際、受け皿であるボーマン嚢形成も認められた (Fig. 35 H, I, J, K)。

3-3-5 移植腎内の免疫蛍光染色

各マーカーの発現を調べるために免疫蛍光染色にて観察した。移植腎内に PECAM-1 (赤) の発現が認められ、血管の構築が観察され、特に皮質辺縁部から中心部にかけて複数の個所に長い血管が点在していることが分かった (Fig. 36 A)。また、synaptopodin

(緑)を発現する糸球体を複数個見られた (Fig. 36 A 矢印)。拡大図を観察すると、血管を伴った糸球体が認められた (Fig. 36 D)。この移植腎と新生児 7 日目の腎臓を比較すると、血管の数は劣るものの (Fig. 36 B)、糸球体の成熟度が同様であることが認められた (Fig. 36 E)。成体腎臓においては PECAM-1(赤)の発現が複数あり血管網の形成と存在を示した (Fig. 36 C)。糸球体では丸い球状の形態を示した (Fig. 36 F)。VEGF (+)移植腎と VEGF (-)移植腎を比較すると、血管の面積においては、VEGF (+)移植腎臓は大きい (Fig. 36 J)、糸球体に関しては、その差が 10%未満であり、形成数に差があまりないことが分かった (Fig. 36 I)。

3-4 考察

様々な発生期の組織は綿密な血管を含んだ構造をしており [54,55]、血管網の形成およびパターンニングは、組織の増殖およびホメオスタシスに重要である [56]。本章では、ポリカーボネートを用い、気液相の培養法を利用して発生腎を *in vitro* 培養系で、初めて糸球体や血管網の形成を確認できた。また、VEGF は血管形成に重要な因子であることから、VEGF (-)培地と (+)培地の発生腎培養を比較した。その結果 VEGF 無添加の培養系において、発生腎は、尿管芽の伸長や分岐、ネフロン前駆体の形成を観察したが、VEGF (+)培地による発生腎培養は無添加に比べ著しく尿管芽の伸長、分岐やネフロン前駆体の数の増加があった。VEGF は血管のみならず、尿管芽に存在する VEGF レセプターにも結合したためだと考えられた [57]。そのため、尿管芽と後腎間葉系細胞との相互作用が促進し、ネフロン前駆体数の増加も促したのではないかと考えられる。血管形成において、VEGF (-)と (+)を比較した結果、7 日目までは VEGF (-)培養系では、線状の血管を観察したが、10 日目になると原始血管叢構造が消失していた。一方、VEGF (+)培養系では、3 日目には血管ネットワーク様を形成し、7 日目にはさらに密集した構造をなしていたが、10 日目になると消失していた。これは、血管の成長と発達には血流が必要だと考えられた [58]。10 日目に球状の血管内皮集合体の形成があり、これは両者の培地共に形成されていた。しかし、VEGF (+)の培地には多数の血管様構造体の集合体が形成され、無添加培地において数は少ない。両培地培養系共にポドサイトマーカーは 7 日目から発現はあったが、PECAM-1 の発現はなかった。その理由として VEGF (+)の方が VEGF による尿管芽、ネフロン前駆体により多数の形成を促進しているのではないかと考えられた。VEGF (-)培養系では VEGF が存在しないもの、ネフロン前駆細胞に由来する糸球体足細胞 (ポドサイト) 自体は血管内皮増殖因子 (VEGF) を分泌することが報告された [59]。また、分泌される VEGF が糸球体血管内皮を引き寄せることがノックアウトマウスの結果から明らかになった [60]。そのため VEGF (-)培養系でも 7 日目からポドサイトが誘導でき、10 日目に血管内皮細胞を引き込み糸球体形成できたのではないかと考えられた。

移植実験において、マウス胎仔期 (E11.5)の発生腎は小さくかつ未分化であるが[61]、培養 3 日目で WT-1(ネフロン前駆体)および PECAM-1 (血管) を発現し、三次元腎臓構造も保たれたので、この培養腎を生体に移植し、腎臓血管再構築を図ろうと考えた。培養した発生腎は腸間膜血管に生着し大きく成長していた。成長した移植腎は少し赤みを帯びており血液が入っていることが分かった。その内部を観察すると糸球体や血管の存在があった。免疫蛍光染色にて観察してみると、ポドサイトマーカ存在が認められた。他のグループの発生腎組織を使用した移植報告と比較すると同等の糸球体形成をしていた[48,62]。但し、これまでの報告において血管網の存在は皆無であった。本研究における血管網の形成は、移植腎内部に host からの血管侵入があり、血管新生による血管網の形成が移植腎全体に張り巡らされていることを実証した。また、**angiogenesis** による血管の成長と発達には血流が必要であることが報告されたことから[62]、本実験の血管網の形成に必要な血流や血圧は host 側からの供給であると考えられた。また、移植前と移植後の発生腎を比較したところ、腎臓の大きさに顕著な差が見られた。これは、host 側からの血管侵入によって EPC [40,41]が、移植腎の成長や発達に関わっていることを示唆した。(Fig. 37)。

本研究の一番重要な点として、血管内皮細胞成長因子 (VEGF) を添加しなくとも、**angiogenesis** さえ効けば、腎臓内の重要な血管形成とネフロン前駆体形成が構築できることである。ネフロン前駆体は、長期間培養すれば糸球体を形成することができる。しかし、*in vitro* 培養系でも示したが、**angiogenesis** なしの系では、血管網の形成は培養 10 日目で消失してしまうため、**angiogenesis** による血管新生が必要であることが考えられる。

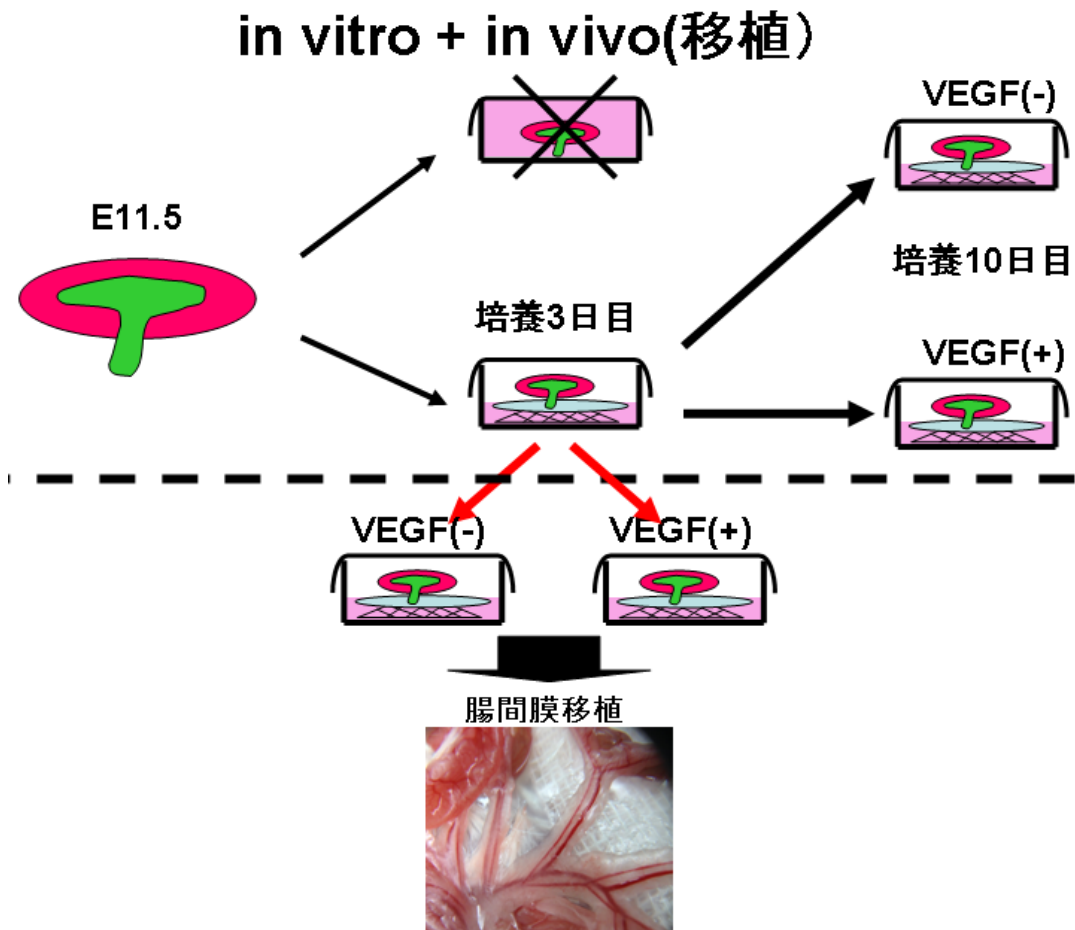


Fig. 30 第3章における実験の流れ

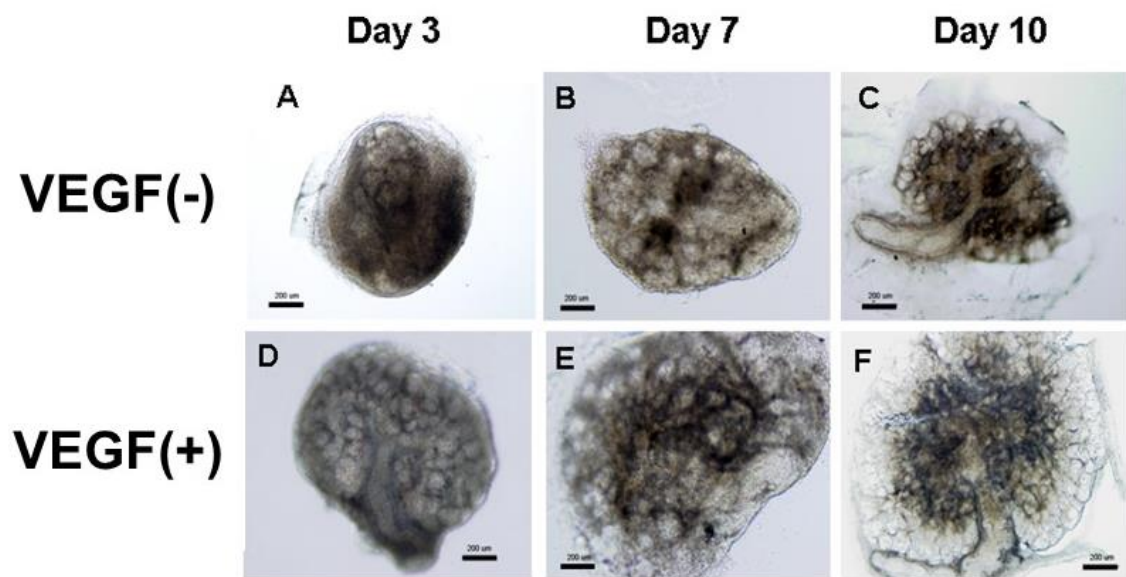


Fig. 31 発生腎培養による明視野観察

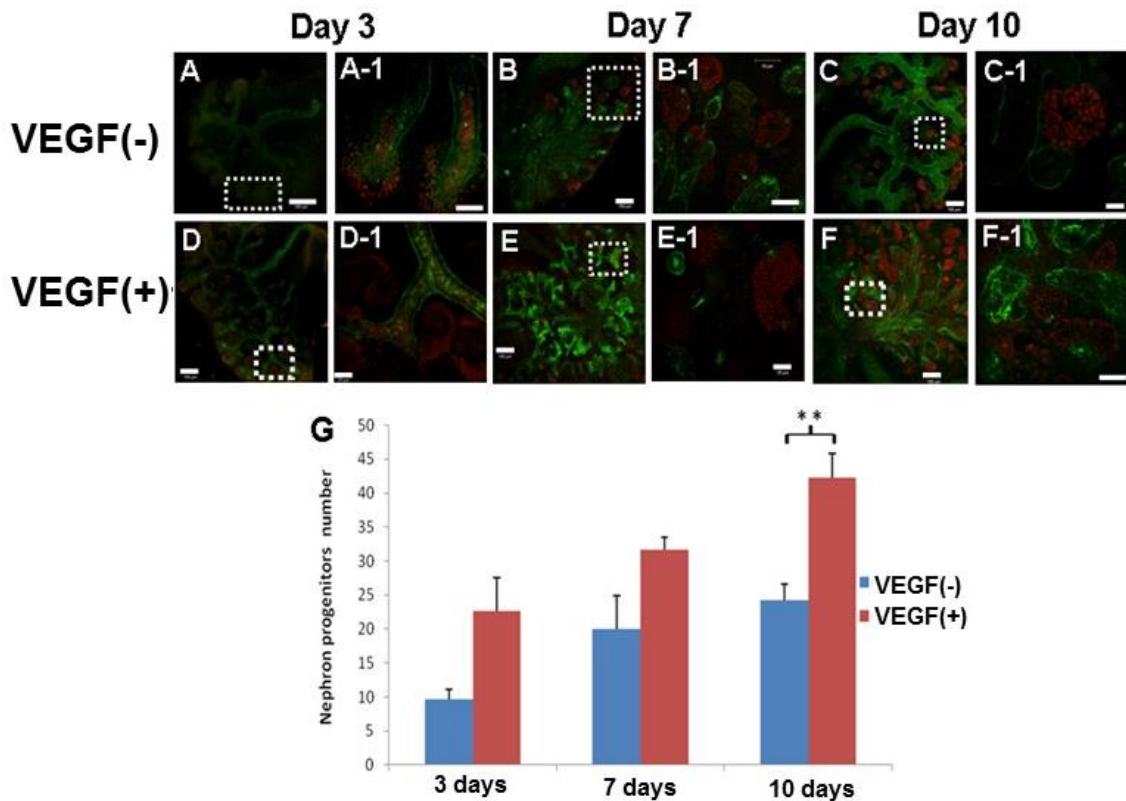


Fig. 32 培養発生腎の免疫蛍光染色およびネフロン前駆体数
 (A-C) : VEGF (-)培養の免疫液蛍光染色。(D-F): VEGF (+) 培養による免疫染色画像。DBA (緑) は尿管芽を染色し、WT-1 (赤) はネフロン前駆体を染色。
 (G): VEGF (-)、(+)培養の発生腎内に存在するネフロン前駆体の数。(A-1~F-1) は (A~F) の拡大図。(scale bars= 100 μ m (A~F)、20 μ m (A-1~F-1))
 **P<0.01

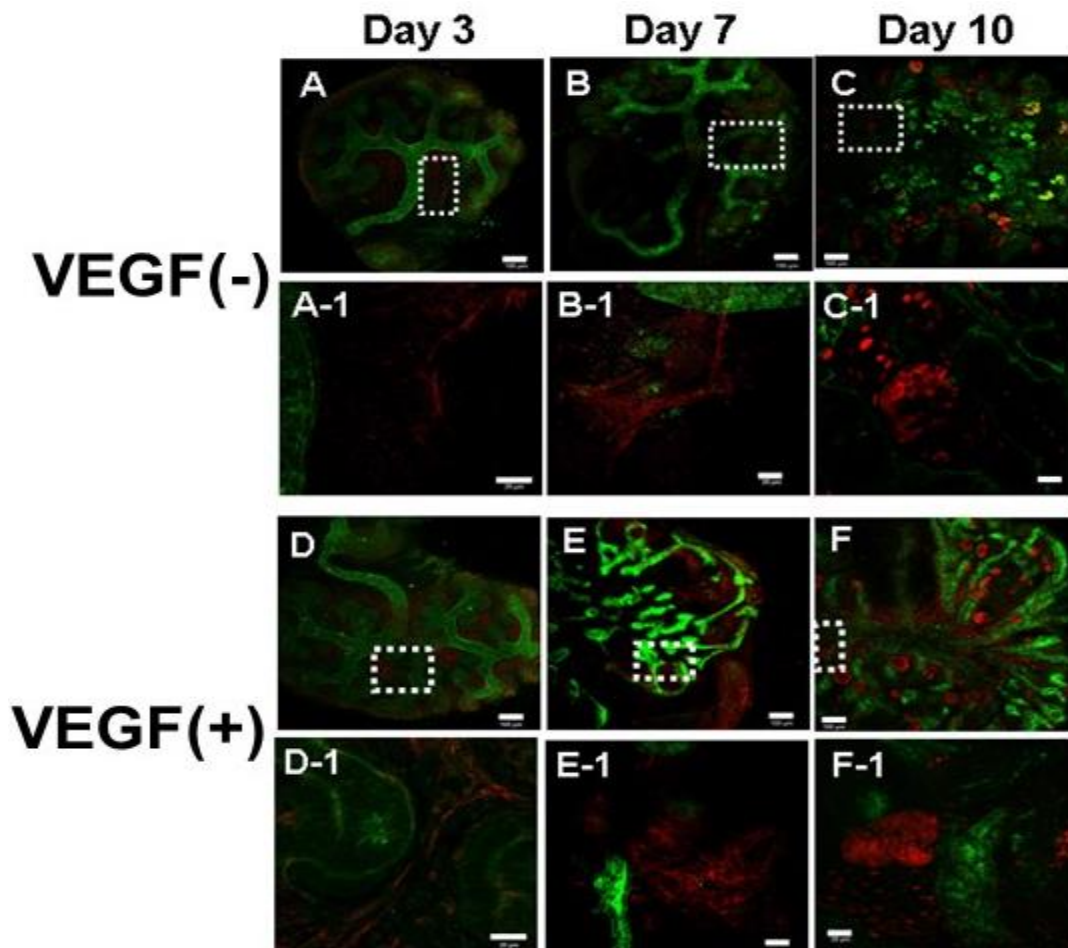


Fig. 33 培養発生腎の免疫蛍光染色の画像

(A-C) : VEGF (-)培養による免疫蛍光染色写真; (D-F): VEGF (+) 培養による免疫蛍光染色写真。尿管芽を DBA (緑) で染色し、血管内皮接着マーカーを PECAM-1 (赤) にて染色。(A-1~F-1) は (A-F) の拡大図。(scale bars= 100 μ m (A~F)、20 μ m (A-1~F-1))

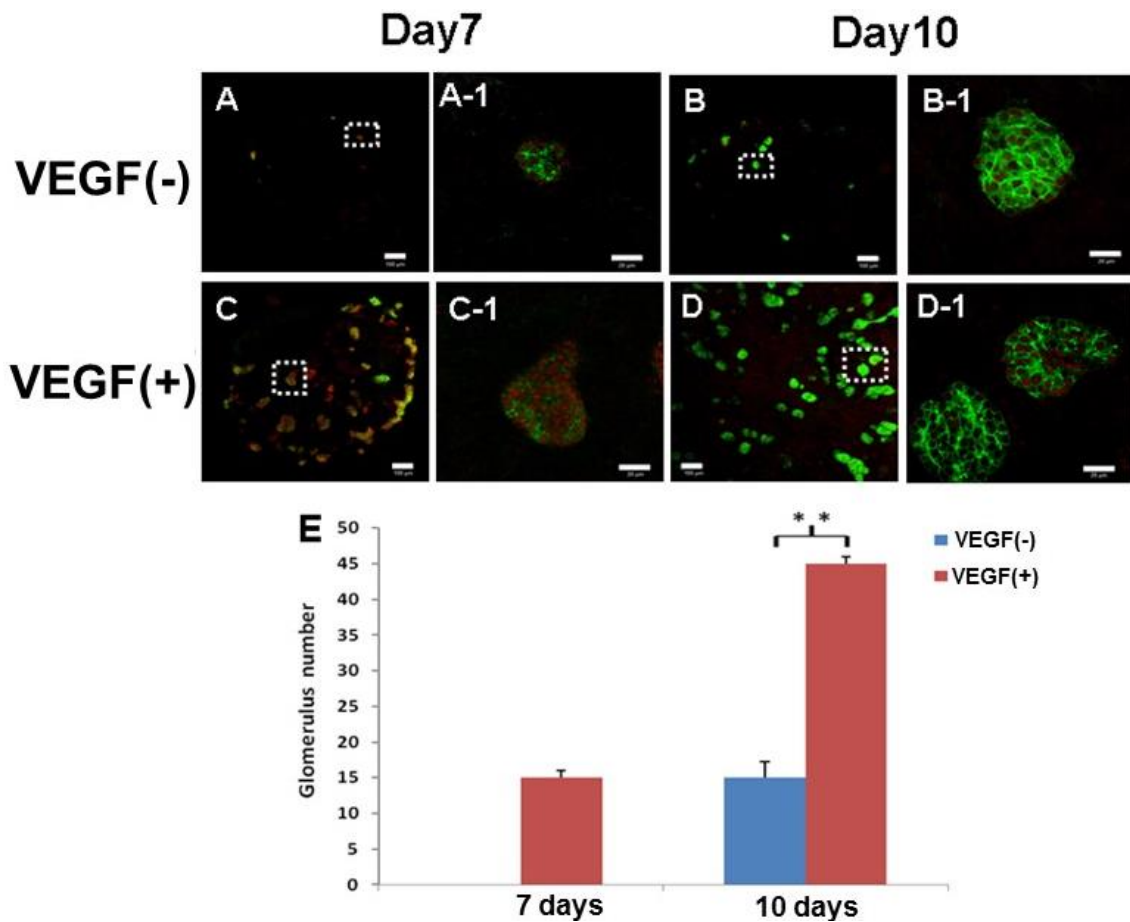


Fig.34 培養 7、10 日目の免疫蛍光染色による成熟糸球体数
 synaptopodin (緑) はポドサイトマーカー、WT-1 (赤) はネフロン前駆体を染色。(A, B: VEGF (-)培養の免疫蛍光染色画像; (C, D: VEGF (+) 培養による免疫蛍光染色; (E: 各培養系による成熟糸球体 (WT-1, Synaptopodin, PECAM-1 全てが陽性) 数を解析。(scale bars = 100 μ m (A-D), 20 μ m (A-1 ~D-1)) **P<0.01

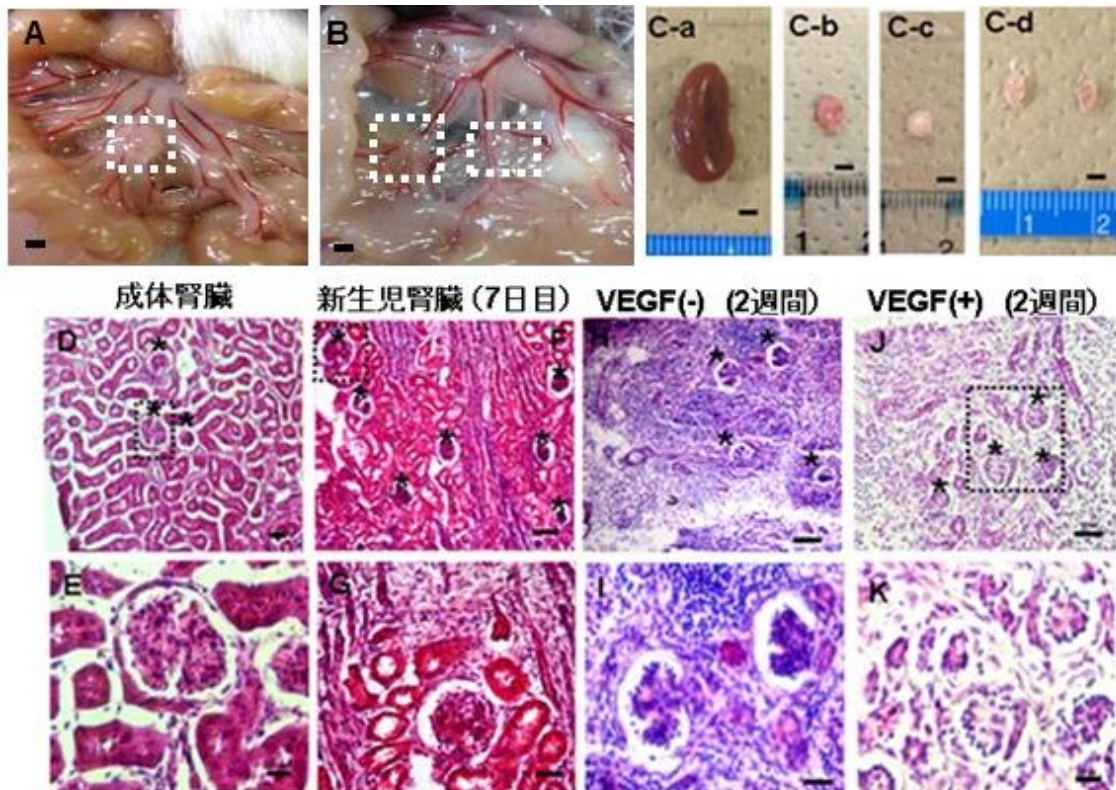


Fig. 35 移植 2 週間後の発生腎および各時期の生体腎臓

(A) VEGF(-)培養 3 日目および (B) VEGF(+)培養 3 日目の発生腎を腸間膜血管に移植 2 週間後の明視野写真。四角点線は移植腎。(C) 各腎臓の比較画像。C-a: 成体腎臓; C-b: 新生児 7 日目腎臓; C-c: VEGF (-)移植腎; C-d: VEGF (+)移植腎。(D) 成体腎臓の HE 染色画像。(E) 新生児 7 日目の腎臓の HE 染色画像。(F) VEGF (-)移植腎の HE 染色画像。(G) VEGF (+) 移植腎の HE 染色画像。*: 糸球体。(E, G, I, K) 点線四角の拡大図。(scale bars = 2 mm (A, B, C)、50 μ m (D, F, H, J)、20 μ m (E, G, I, K)).

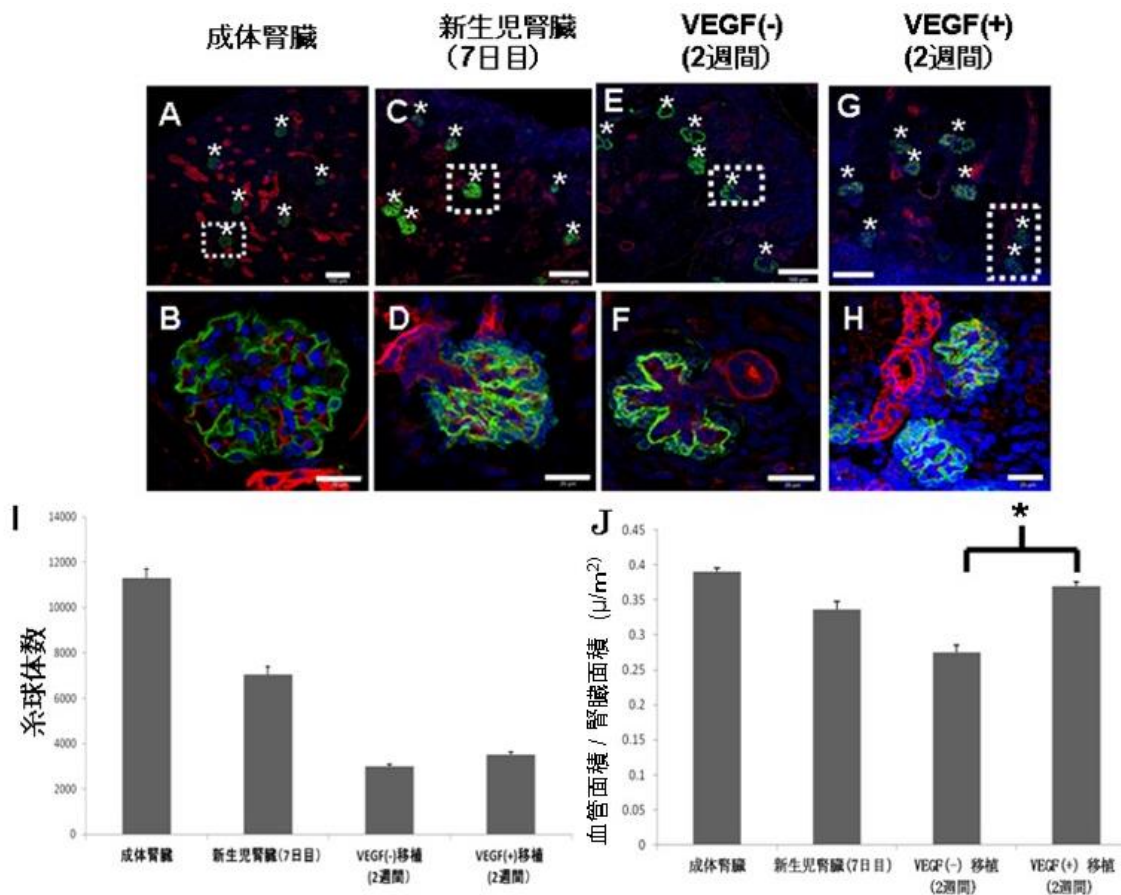


Fig. 36 異所性移植による発生腎の免疫染色および糸球体数と血管面積の比較
 免疫染色：血管内皮細胞接着マーカー（赤）、糸球体マーカー（緑）、核（青）。
 A~H 各腎臓の免疫染色画像。 A: 成体腎臓； C: 新生児7日目腎臓； E: VEGF (-) 移植腎； G: VEGF (+) 移植腎。 B, D, F, H は A, C, E, G の拡大図。 *: 成熟糸球体。
 (scale bars = 100 μm (A, C, E, G); 20 μm (B, D, F, H)). I: 各腎臓の成熟糸球体数；
 J: 各腎臓の血管面積。 (n=5) *P<0.01

in vitro + in vivoの組み合わせによる腎血管構築

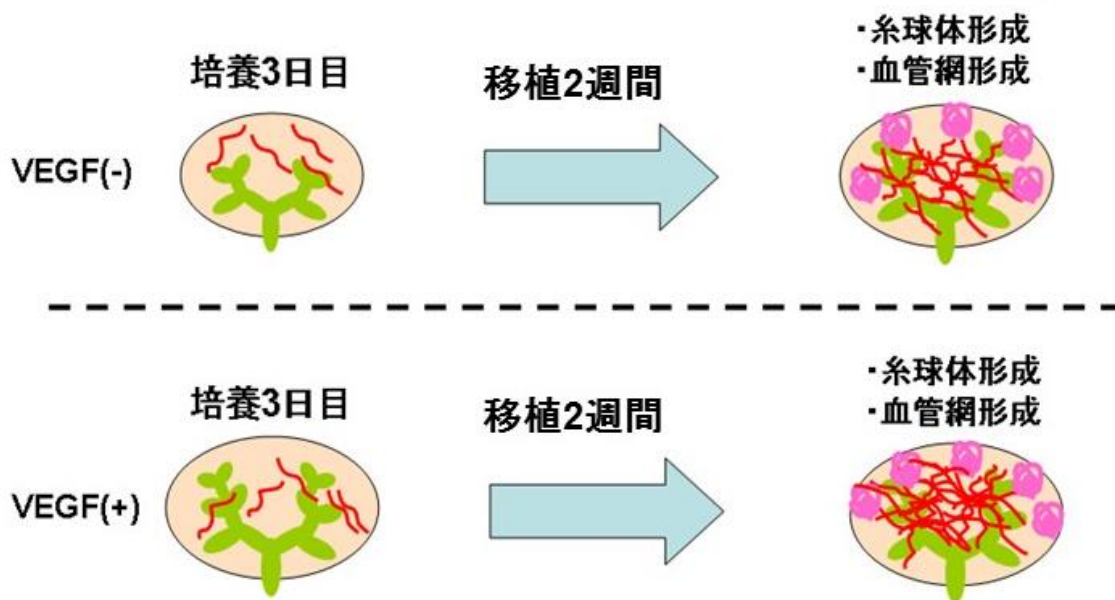


Fig. 37 異所性移植による各培養系発生腎の総括

第4章 発生期腎臓細胞を用いた腎組織の再構築

4-1 研究概要

現在は、iPS細胞技術を筆頭に、組織幹細胞の発見、利用、研究は目覚ましいものがある。組織幹細胞幹細胞の臨床応用を目的とした、分化効率や安全性などの研究が世界中でなされる一方で、分化される細胞を有効に移植する技術の開発も急務である。これまでの研究で得られた分化細胞を臨床への応用として、細胞を直接臓器への注入または血管注射といった手法が最も汎用されている。しかし、生着効率の悪さが問題視されている。一方、VacanttiとLangerによりTissue engineeringという概念が提唱され、生体可溶性の高分子などの足場を利用し組織構築する技術が提唱されている[64]。この手法は、足場として外来異物を用いるため、生体可溶性素材に対するアレルギー、感染症など問題の解決が課題として残されている。しかしながら、形態学的特徴や力学的作用を有するように、組織（例えば血管、骨、腎臓など）を細胞のみで構築する技術は見当たらず、再生医療は未だ開発途上であるといえる。最近、腎臓原基細胞を使用した研究が報告されている。即ち、原基から分散された単一細胞をポリカーボネート上で培養した後、移植により腎臓組織を再構築したものである。この方法の特徴にはROCK inhibitor (Rho結合キナーゼ阻害剤)を利用し、細胞を培養皿に接着させず、腎臓組織を再構築する点にある。本章では生体に近い組織形成手段の一つとして、元来接着系細胞が自然に有する性質である凝集反応により三次元的な細胞塊の形成原理を利用し、さらに擬微小重力環境から生じる非対流物理現象を生かし、細胞塊を巨大スフェロイドに形成するところに特徴がある。通常のスフェロイドでは二次元培養と比較し、三次元的に培養できるが、さらに巨大化すると、細胞塊中心に酸欠のため、死んでしまう問題点が克服できない。擬微小重力環境を導入することにより、巨大化した細胞塊は非対流液体に浮遊するため、通常の静置培養以上の効果が見込まれる。ゆえに、擬微小重力の特徴である栄養と酸素の効率的供給、組織の分化誘導促進、シェアストレスの最小化、ECM産生の促進、三次元組織の形成が可能である。理想的な臨床応用が可能な臓器再生のためには、細胞のみで高機能を有する（生体と同じように機能する）組織を作製する必要がある。

本章は、巨大スフェロイド内部に糸球体、血管、ネフロン前駆体といった組織を再構築したうえで、angiogenesisを活かせる移植法により生体内での機能に近似した腎臓組織を作製する。

4-2 材料と方法

雄および雌マウスは動物実験室で飼育した、8~25週齢の雌マウスを妊娠させ、マウ

スから摘出した E11.5 胎仔マウスを使用した。移植する雄マウスは 8 週齢を使用した。

4-3 発生期腎臓組織の単一細胞化

妊娠マウスから双角子宮を取り出し DMEM の中に浸ける。実体顕微鏡下にて卵黄嚢と羊膜から胎仔を取り出す。取り出した胎仔を実体顕微鏡下にて 30G 針を使用して発生腎を取り出し、DMEM に浸けた。浸けておいた発生腎を Accutase に 20 分間、インキュベート後、40 μ m フィルターを使用し、発生腎細胞を単離・分散し、単一細胞化した。

4-4 単一細胞からスフェロイド形成

単一細胞化した発生腎細胞を 50 ml 中の培養液に 0.25g DMEM、0.265g HamF12、0.095g NaHCO₃、1 ml ITS、10% FBS、1% penicillin/streptomycin を培地とし、低吸着用 24well dish (住友ベークライト)にて 37°C、5% CO₂ in air で培養し、培養液は 2 日毎に交換、培養期間は 5 日間とした。

4-5 スフェロイド融合化

スフェロイドした発生腎細胞を擬似微小重力装置 (RWV, Synthecon, USA)に移して培養した。培地は上記に記載した培地を使用した。擬似微小重力装置の使用法は RWV 用培養チャンバー(Synthecon, D-410)に発生腎培地(容量: 10 ml)を 9 ml 程度満たした後、スフェロイドをチャンバーに移した。チャンバー内が培養液で満たされるように残りの培地を添加した。チャンバーの蓋を完全に閉めた後、一度チャンバーを反転させ 2~3 回、壁に軽く叩きつけた。(チャンバー内の気泡を集めるため)チャンバーに 2 つ付いている培養液交換口の蓋を開け、そこに 2 本の注射針を差し込んだ。片方から培養液を添加しながら、もう片方から気泡を吸い、チャンバー内の気泡を完全に除去した後、蓋を完全に閉め、37°C インキュベーター内の RWV 装置にセットした。回転速度を設定した後、RWV のスイッチを入れて 3 日間培養した。培養開始後、2 日に 1 回培養液全量の 10% を新しい培地と交換し、同時にチャンバー内に発生する気泡を除去した。

4-6 スフェロイドと融合したスフェロイドの同所性移植

移植用の細胞塊は 2 種類ある。一つは低接着性プレートにて 5 日間培養したスフェロイドであり、もう一つは RWV にて 3 日間培養した融合スフェロイドを DMEM

に10%FBSと1%streptomycin/penicillinを混ぜた培地に移植までの間浸けておいた細胞塊である。移植全日からhostである8-12週令の雄マウスに免疫抑制剤 Tacrolimus monohydrate (2 mg/kg)を腹腔内投与し、さらに腹腔内に sodium pentobarbital (50 μ g/g)注射し麻酔した。移植部位は腎臓被膜下であ、移植期間中は免疫抑制剤を毎日 host 腹腔内投与した。移植2週間後、マウスを麻酔し、移植片のスフェロイドを摘出し、HE染色、免疫蛍光染色を行った。本実験の流れは Fig. 38 に示した。

4-7 凍結切片の作成

4-7-1 移植腎の固定・凍結

移植腎をPBS(-)で3回洗浄し、付着した血球細胞などを洗い落とした。組織を3cm dishに移し、10%中性ホルマリンを用いて室温で20~40分間固定した。10%中性ホルマリンを廃液ビンに捨て、10% sucrose 溶液に室温で2時間浸けた。10% sucrose 溶液を捨て、20% sucrose 溶液を入れて室温で2h浸けた。同様に30% sucrose 溶液に4℃で1時間~一晩浸けた。組織についての溶液をキムワイプで軽く落とし、OCT compoundに入れて4℃で30分間放置した。液体窒素で組織を凍結させ、-80℃にて保存した。

4-7-2 凍結切片の作成

凍結した組織を2時間マイクロトーム内に置き、その後、厚さ10 μ mの切片を作成した。切片をスライドガラスにはり付け、1時間ほど風乾した後、4℃で保存した。

4-8 HE 染色

切片上に冷アセトンを乗せ4分間固定し、DWで2回、最後はdDWで1回洗浄した。ヘマトキシリンで1分間染色した後、DW x3回、dDW x1回洗浄した。エオシンで1分間染色した後、DW x1回 dDW x1回洗浄した。70%、90%、95%、100% (3回) エタノールで十分に脱水した。顕微鏡観察した後、キシレンに2回置換し、非水溶性封入剤で風入し、風乾させた。その後、倒立顕微鏡で観察した

4-9 スフェロイドの免疫染色

培養したスフェロイドをPBS(-)で3回洗浄した。組織を3cm dishに移し、10%中性ホルマリンを用いて室温で60分間固定した。10%中性ホルマリンを廃液ビンに捨て、PBS(-)で3回洗浄した。サポニン溶液を洗い落とし、0.1%BSA/PBSで1時間~一

晩ブロッキングさせた。BSA 溶液を洗い落とし、1/100 倍に希釈した一次抗体で一晩反応させた。一次抗体を洗い落とし、1/100 倍に希釈した二次抗体で 1.5 時間反応させた。二次抗体を洗い落とし、fluoromount と mountquick を用いてカバーガラスに封入した。

4-10 免疫蛍光染色

乾燥させた切片を PBS (-) で洗浄、OCT コンパウンドを落とした。0.01 % サポニン溶液を切片にのせて、シェーカー上で 15 分間反応させた。サポニン溶液を洗い落とし、0.1 % BSA/PBS で 1 時間～一晩ブロッキングさせた。BSA 溶液を洗い落とし、1/100 倍に希釈した一次抗体で 1.5 時間反応させた。一次抗体を洗い落とし、1/100 倍に希釈した二次抗体で 1.5 時間反応させた。二次抗体を洗い落とした。風乾した後、fluoromount とカバーガラス、mountquick を用いて封入した。

4-11 実験結果

4-11-1 発生腎の単一細胞化とスフェロイド形成と移植

マウス胎仔から取り出した発生腎 (Fig. 39 a) を Acutase で分散させ、さらに 40 μ m のフィルターを通させ、単一細胞状態にした (Fig. 39 B)。単一化した発生腎細胞を低接着性のプレートにて培養し、スフェロイドを形成した (Fig. 39 C)。5 日間培養後、スフェロイドが成長し大きくなった (Fig. 39 D)。単一化した直後の発生腎細胞を Flk-1 (血球血管前駆体細胞: 赤)、DBA (尿管芽: 緑)、DAPI (核: 青) で免疫蛍光染色し、細胞間が接着していない状態を確認した (Fig. 39 E)。確認した単一化細胞を低接着性プレートで培養した後、Flk-1 (血球血管前駆体細胞: 赤)、DBA (尿管芽: 緑)、WT-1 (ネフロン前駆体: 緑)、synaptopodin (ポドサイト: 緑)、DAPI (核: 青) で免疫染色した。その結果、尿管芽が形成された (Fig. 39 F)。ネフロン前駆体マーカー WT-1 および血管マーカー PECAM-1 は形成箇所が認められたが (Fig. 39 G)、足突起細胞のマーカー synaptopodin の発現は見られなかった (Fig. 39 H)。培養 5 日目のスフェロイドでは AQP-1 (近位尿細管: 緑) の発現はなかった (Fig. 39 I) が、WT-1 および PECAM-1 (赤) の両方を発現した球状のネフロン前駆体や尿管芽を形成した (Fig. 39 J, K)。しかし、synaptopodin の発現は見られなかった (Fig. 39 L)。これらの結果から培養 5 日目までのスフェロイドにおいて、ネフロン前駆体や尿管芽を形成したものの、近位尿細管と足突起細胞は形成できていないことが分かった。この 5 日間培養したスフェロイド (Fig. 40 A) を腎被膜下へ同所性移植した結果、スフェロイドは生体腎に生着・成長した (Fig. 40 B, C)。HE 染色では、移植片が host 側への細胞侵入が観察されたが、host 側の HE 染色と比較すると (Fig. 41 B) 移植スフェロイド自身の分化は認められなかった (Fig. 41 A-A-4)。これらの結果から、単一化した細胞塊のスフェロイドの移植は腎臓組織への構築に達成できないことが分かった。

4-11-2 RWV によるスフェロイドの融合

RWV 装置 (Fig. 42 A) を使用し、上記 5 日間培養したスフェロイドを融合させる。3 日後、融合した巨大化スフェロイドが観察された (Fig. 42 B)。RWV 装置から取り出した巨大化スフェロイドは複数のスフェロイドが融合しものである (Fig. 42 C)。融合したスフェロイドを免疫蛍光染色した結果 (Fig. 42 D-G)、WT-1 (ネフロン前駆体: 赤) が発現したネフロン前駆体組織の形成が多数認められ (Fig. 42 D)、PECAM-1 (血管内皮細胞接着マーカー: 赤) もスフェロイド全体に発現した。また上記巨大化していないスフェロイドを比べ、近位尿細管マーカーの AQP-1 (緑) (Fig. 42 E) と足突起細胞マーカーの synaptopodin (緑) の発現 (Fig. 42 G) が認められ、糸球体の形成も観察できた。

4-11-3 融合スフェロイドの同所性移植

3日間RWVによって融合した巨大スフェロイドを (Fig. 43 A)を腎臓被膜下に移植し2週間後、成長している巨大スフェロイドを観察できた (Fig. 43 B)。拡大写真では巨大スフェロイド内に赤い血液の流入が観察できた (Fig. 43 B 右下)。移植後のスフェロイドは移植前のスフェロイドの約3倍以上に成長し、host腎臓に生着していることが分かった (Fig. 43 C)。移植スフェロイドの内部形態観察するためにHE染色を行った。その結果、移植スフェロイド内に糸球体の形成していることが分かった (Fig. 43 D)。その拡大写真では糸球体内に赤血球の存在が観察できた (Fig. 43 E)。host側に隣接した移植スフェロイドではhostとの血管連結があった (Fig. 43 F)。その拡大写真では血管内に赤血球が多数見られた (Fig. 43 G)。さらに、hostと移植スフェロイドが癒着している部位を観察すると移植片がhost側に侵入している様子を観察できた (Fig. 43 H)。その拡大写真では移植スフェロイドに流れる赤血球が存在した (Fig. 43 I)。

4-11-4 移植スフェロイドの免疫蛍光観察

PECAM-1 (血管内皮細胞接着マーカー：赤)、synaptopodin (ポドサイト：緑)、AQP-1 (近位尿細管：緑)、Col IV (糸球体基底膜：緑) Nephtrin (スリット膜：緑)、DAPI (核：青) を用いて移植スフェロイドを染色した。その結果、血管マーカーである PECAM-1 が発現している血管網が観察され、足突起細胞の成熟マーカーである synaptopodin、および濾過機能に重要な Nephtrin も糸球体に局在していた (Fig. 44 A-D)。血液濾過後、原尿を再吸収および電解質の補正を行う尿細管、特に重要な近位尿細管マーカーである AQP-1 も発現していた (Fig. 44 E, F)。糸球体は内側から内皮細胞、糸球体基底膜 (GBM)、足突起構造を呈しているし、糸球体基底膜の ECM 主成分である Col IV も発現していた (Fig. 44 G, H)。

4-11-5 移植スフェロイド内にある糸球体機能

糸球体の主な機能は血液濾過であり、即ち、尿を濾過するが、血球やタンパク質 (アルブミン) といった成分は流出されないようになっている。本実験は移植後生着したスフェロイド内の糸球体が機能しているかどうかを調べるために、BSA-FITC (アルブミン：分子量 50,000~70,000) を host 側の腎臓から流し、アルブミンが糸球体内部に留まるかどうかを検証した。その結果、BSA-FITC は血管付近に検出でき (Fig. 45 A)、拡大写真では糸球体に留まっている BSA-FITC を観察することに成功した (Fig. 45 B: 矢印)。

4-12 考察

移植治療分野において、近年、in vitro にて培養した細胞を用い、生体内組織や臓器

を人為的に再構築し、人工臓器として患者へ移植する治療法が研究されている。特に最近注目させている iPS、ES 細胞はいずれ腎臓細胞への分化が期待されている。しかし分化後の細胞はどのように最適化し、高効率に再生医療に応用するか、まだ試行錯誤の段階に留まっている。本研究は iPS、ES から腎分化に誘導する細胞をミミックし、発生腎原基細胞を低接着性プレートにて培養し、24 時間後にスフェロイドを形成した。これは細胞と低接着性プレート間の結合よりも細胞間結合の方が上回ったと考えられた。スフェロイド形成を 5 日間培養後、ネフロン前駆体、尿管芽、内皮細胞集合体を再構築に至ったが、尿細管の再構築には至らなかった。このスフェロイドを生体腎皮膜下に移植した結果、スフェロイドが host 側への侵入が認められた。しかし、移植前、スフェロイドの分化が不完全であったため、分化が進まなかったと考えられる。この問題点を改善するため、5 日間培養した各スフェロイドをさらに RWV 環境で培養し、非対流液体中、スフェロイド同士を融合させ巨大化スフェロイドを形成させた。巨大化スフェロイド内では糸球体の形成や尿細管の形成が見られ、ネフロン前駆体の分化も進んでいた。この現象は RWV 環境からもたらされたを示唆した。擬微小重力の特徴である栄養と酸素の効率的供給、組織の分化誘導促進、シェアストレスの最小化、ECM 産生の促進、三次元組織の形成が可能である[65-70]。巨大化スフェロイドを同所性移植（腎臓被膜下）した結果、スフェロイドが生体腎に生着、成長していたことが確認できた。HE 染色にて観察すると糸球体内に流入した赤血球や移植片と host 側を繋ぐ血管を観察した。また、移植片が host 腎臓へ侵入する部位も認められた。さらに免疫染色を行った結果、AQP-1（近位尿細管）、PECAM-1（内皮細胞接着）、Col IV（糸球体基底膜）、Nephrin（足突起のスリット膜）、synaptopodin（足突起細胞）の発現形態が観察できた。形態のみならず、BSA-FITC を用い host 側の腎血管に灌流した結果、糸球体の濾過機能も確認した。BSA-FITC を使用し糸球体の機能を観察した研究が報告されたが、BSA-FITC は糸球体には留まらず尿細管へと流失してしまった結果であった[71]。本研究は RWV をスフェロイドの巨大化と分化に一助し、さらに *in vivo* の移植により、巨大化スフェロイドに濾過機能を持たせることに成功した。移植片に対して、host 側が EPC、栄養、酸素といった物質が血管を通して移植腎に流れることが知られている[40,41,72]。このことから本実験の成功は、RWV 環境による影響ではないかと考える。RWV によって融合したスフェロイドは移植による影響を受け、成長、分化、成熟を促した。その結果、濾過機能を持った糸球体が構築できたのではないかと考えられる（Fig. 46）。

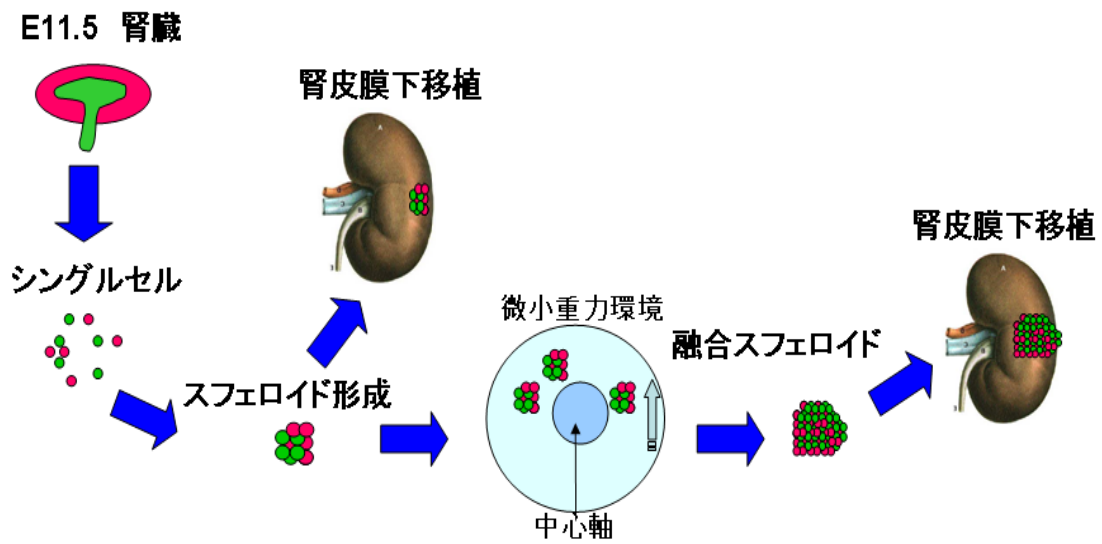


Fig. 38 発生腎細胞による腎組織再構築の実験の流れ

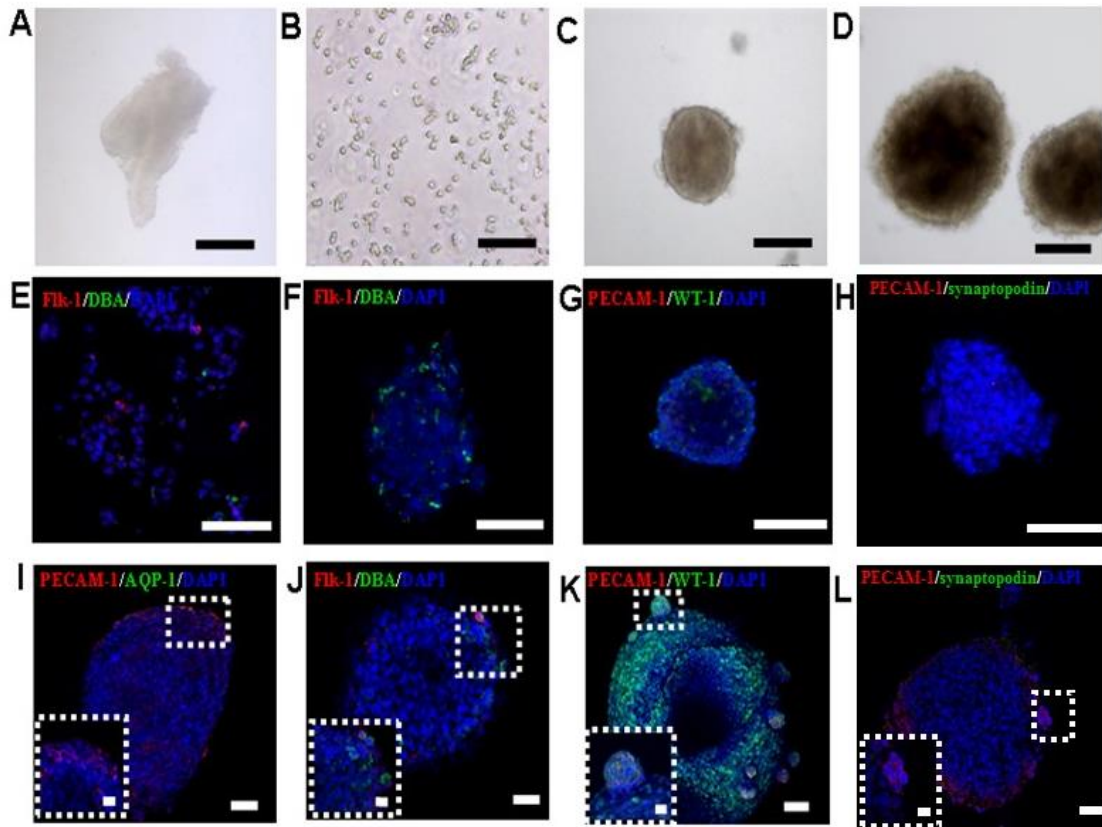


Fig. 39 発生腎の単一細胞化とスフェロイド形成

A: 発生初期腎臓; B: 発生初期腎臓細胞; C: 発生初期腎臓細胞スフェロイド (培養1日目); D: 発生初期腎臓細胞スフェロイド (培養5日目); E: 発生初期腎臓細胞の免疫蛍光染色; F-H: 発生初期腎臓細胞スフェロイド (培養1日目) の免疫蛍光染色; I-L: 発生初期腎臓細胞スフェロイド (培養5日目) の免疫蛍光染色。

(scale bars= 100 μ m (A-H), 50 μ m (I-L) 。 I-LはA-Hの拡大図、10 μ m (I-L))

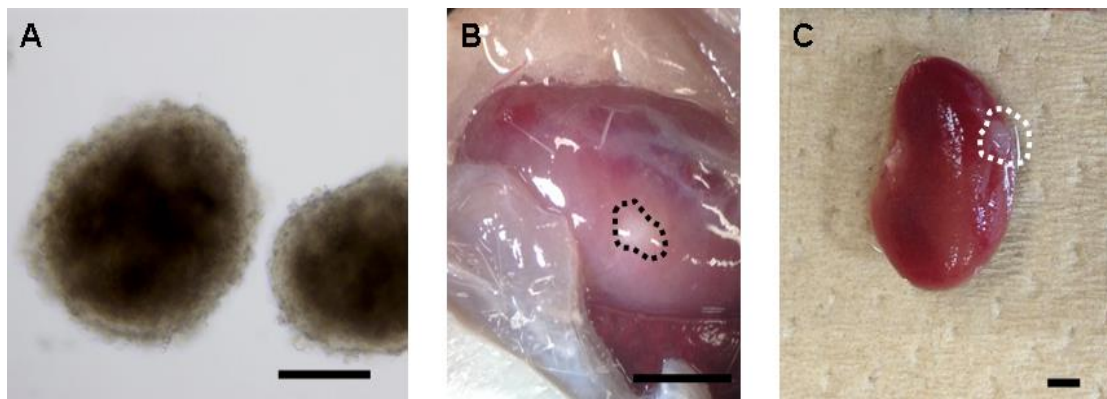


Fig. 40 スフェロイドによる同所性移植

A: 発生初期腎臓細胞スフェロイド (培養5日目) ; **B:** 腎皮膜下移植後2週間後のスフェロイド (点線四角) ; **C:** 腎皮膜を取り除いた腎臓と移植スフェロイド。

(scale bars= 100 μ m (A), 2 mm (B, C))

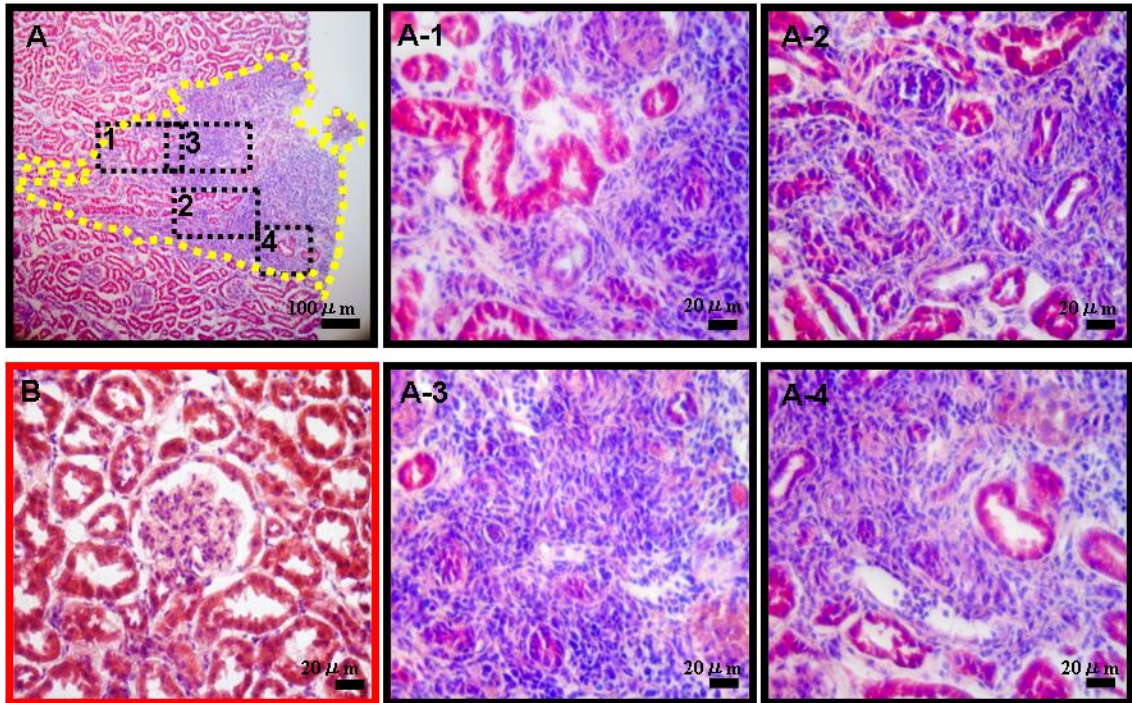


Fig. 41 スフェロイド移植とhost側のHE染色画像

A: 移植したスフェロイドのHE染色画像 (点線四角: 移植スフェロイド)

A1-4: 移植スフェロイド内の拡大図; B: アダルト糸球体。

(scale bars= 100 μ m (A), 20 μ m (A-1-4, B)).

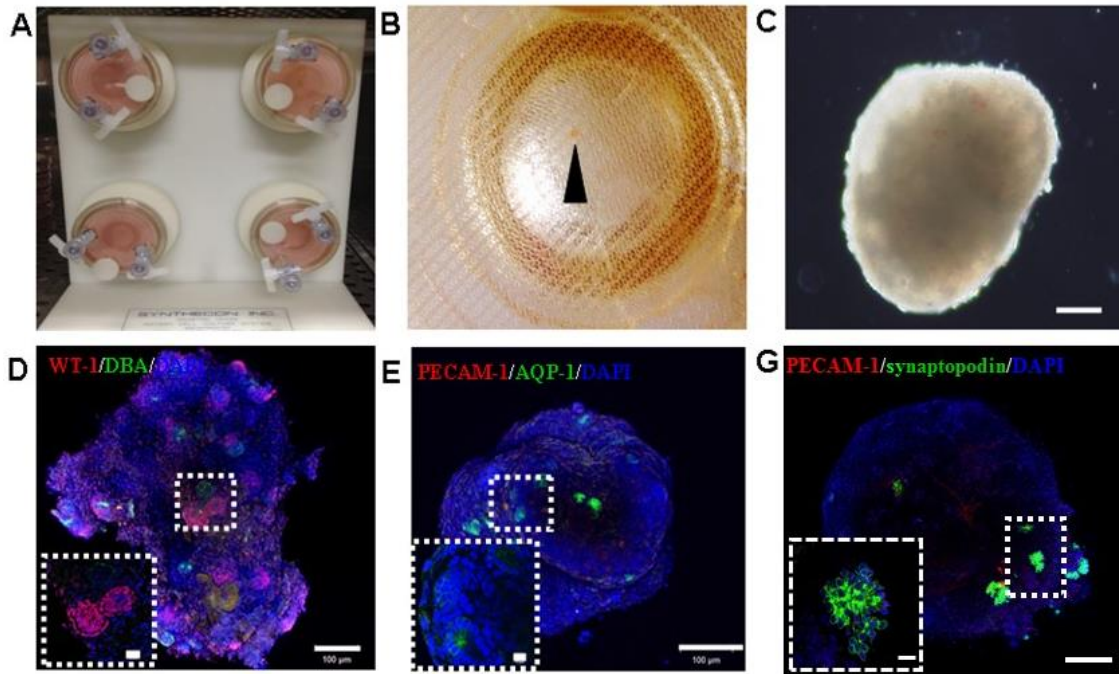


Fig. 42 RWVによる融合スフェロイド形成

A: RWV装置; **B:** RWV装置内の融合スフェロイド (矢印: 融合スフェロイド); **C:** 巨大化スフェロイド; **D-G:** 免疫染色による巨大化スフェロイド。
 (scale bars= 200 μ m (C), 100 μ m (D-G), D-Gの拡大図は10 μ m (D-G))

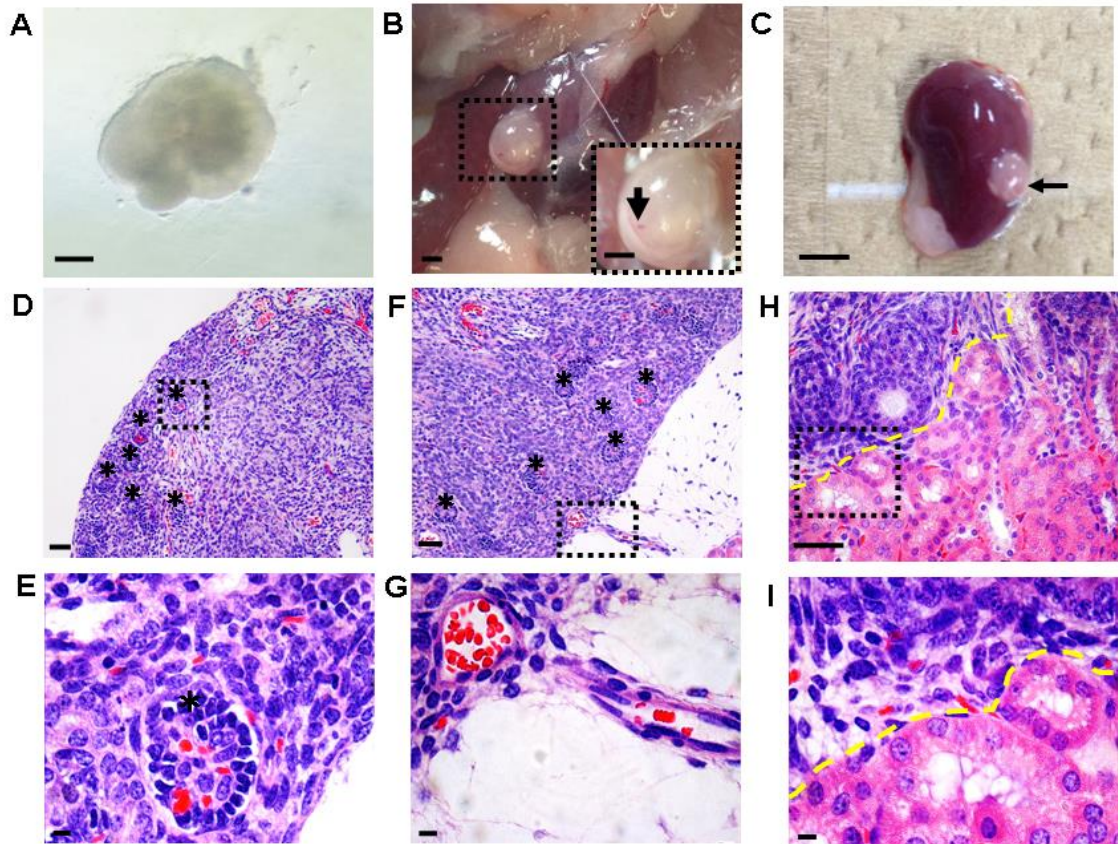


Fig.43 同所性移植による腎組織の再構築

A: 移植前の巨大スフェロイド; B: 移植後、生着、成長したスフェロイド; C: 成体から摘出した腎臓と移植スフェロイド; D-H: 移植スフェロイドのHE染色画像。E-I: D-Hの拡大図。

(scale bars= 200 μ m (A), 1 mm (B), 5 mm (C), (B) の点線四角の拡大図の scale barは1 mm (B), 50 μ m (D, F, H), 10 μ m (E, G, I)).

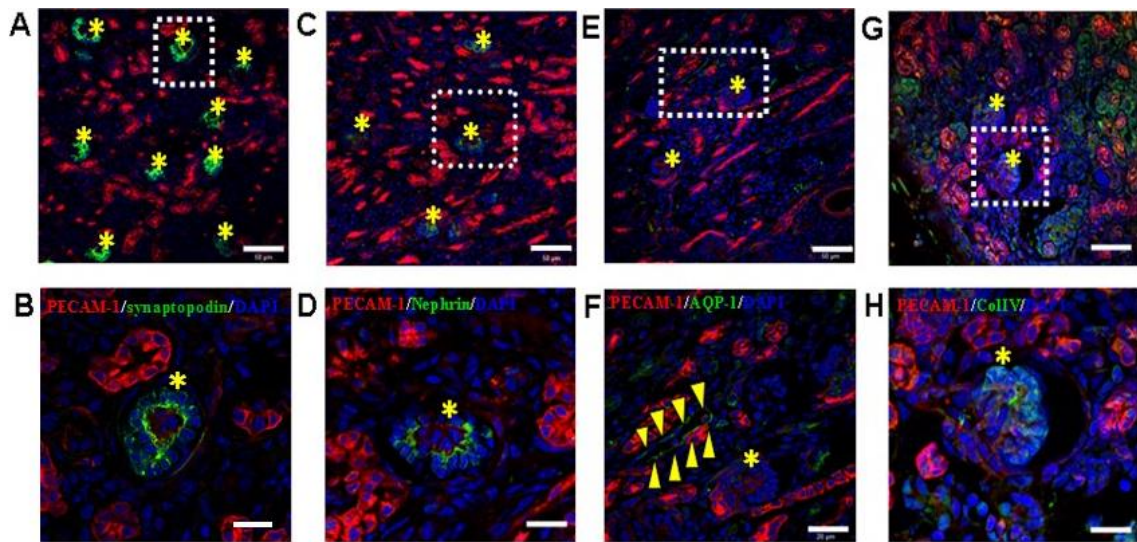


Fig. 44 同所性移植による腎組織再構築の免疫蛍光染色

A, C, E, G: 各バイオマーカーによる移植スフェロイド内の免疫蛍光画像。

B, D, F, H: A, C, E, Gの拡大図

(scale bars= 50 μ m (A, C, E, G), 20 μ m (B, D, F, H)).

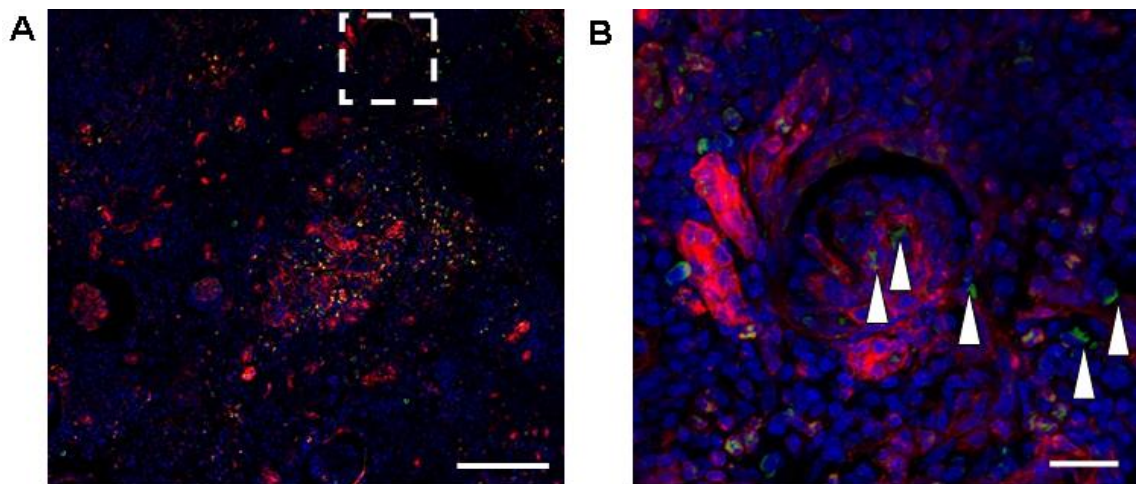
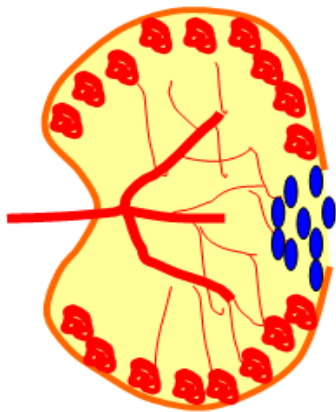


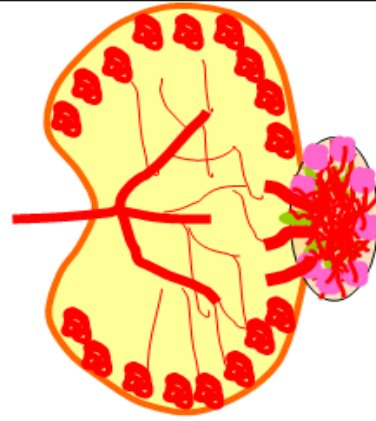
Fig. 45 BSA-FITC灌流による移植腎内の糸球体機能
A: 移植スフェロイド内の蛍光色素灌流による画像; B: Aの拡大図。
(scale bars= 100 μ m (A), 20 μ m (B))

スフェロイド



- ・組織の成長
- ・血管形成
- ・host側と融合箇所あり
- ・糸球体形成なし
- ・尿細管形成なし

巨大化スフェロイド



- ・組織の成長
- ・糸球体及び基底膜形成
- ・血管網の形成
- ・糸球体の濾過機能
- ・尿細管の形成
- ・host側と融合箇所あり

Fig. 46 スフェロイドおよび巨大化スフェロイド移植の総括

第5章 総括および展望

慢性腎不全の治療法として、人工透析や腎臓移植があるが、透析は一部を代行するのみで対処療法である。臓器移植は根本治療法ではあるものの、ドナー不足や拒絶反応といった問題点を克服できない限り、治療法だとは言えない。これらの問題を克服するために再生医療が注目を集めている。しかし、組織工学を用いても複雑構造を持つ腎組織の再構築は現段階では達成できていない。最大の問題点は、腎臓内に複雑血管網が存在しており、これを正確に構築することは人為的に困難である。この問題点を解決するため発生腎の血管新生機序から解析を始め、最終的に腎組織再構築を試みた。

第1章では、腎血管系の構造、血管発生機構およびこれまでの解析問題点を論述した。腎血管系は大血管と糸球体毛細血管および尿細管周囲毛細血管から構成され、発生機構には2説ある。1つは背側大動脈が発生腎に侵入し腎血管を形成していく **angiogenesis** 説である。もう1つは発生腎内の間葉系細胞が分化し腎血管が形成される **vasculogenesis** 説である。両者とも報告はあるが、決定的な根拠は明らかになっていない。現在、**vasculogenesis** 説の報告例は多数存在するが、**angiogenesis** 説の報告例は少ない。それは **angiogenesis** を観測するための開発方法が困難であることが挙げられる。

第2章は **angiogenesis** を可視化可能な観測法を開発し、発生腎の形成に関わる **angiogenesis** の役割を解明する。方法として、血管鋳型法、墨注入法、墨樹脂注入法、RT-PCR によって解析した。血管鋳型法および墨注入法において E18.5 から E13.0 の発生腎内に血管の存在があった。墨樹脂を用いることにより、背側大動脈からの出芽が発生腎内へ侵入している時期の特定に成功した。次に、腎臓発生初期に **angiogenesis** がなぜ必要であるのか検討した。検討方法として、発生腎 (E11.5) を使用し、大腿血管移植、背部移植した2つの方法を用いた。その結果、大腿移植腎臓では、血管網、大血管、尿細管、糸球体形成を確認できたのに対し、背側移植腎臓はすべて不形成であった。この結果を考察すると **angiogenesis** は発生腎において成長、成熟するために必要であること示唆された。このことから臓器形成の時空間的な解明は学術的に応用的に意義があることを実証した。

第3章では、**in vitro** で培養分化させた組織に移植プロセスを加え、腎血管が再構築できるかどうかを検討した。発生腎組織の **in vitro** 培養法では尿管芽の分岐、伸長を報告されたが、複雑な血管網の形成までには至っていない。本章では2ステップを用いて血管網形成を目指した。まず E11.5 の発生腎を気液培養にて培養し、培養液に VEGF(血管内皮細胞成長因子)を無添加(-)および添加(+)の2種類の培養系にて実験した。その結果、両培養系とも発生腎内にネフロン形成を促し、糸球体のポドサイトを形成させることに成功した。実際、VEGF(-)でも糸球体や血管を再構築できることが分かった。さらに両培養系にて培養発生腎を **host** に移植した結果、**host** の血管に生着、成長していることが明らかになった。両培養系とも新生児腎臓(7日目)の大きさと変わらないことが認められた。VEGF(+)

培養腎移植では腎臓表面が少し赤みを帯びており血液が入っていることが分かった。その内部の形態形成を免疫蛍光染色にて観察してみると、両培養系腎臓とも糸球体や血管の存在が認められた。本研究における血管網形成は、移植腎内部に host からの血管新生があり、全体に張り巡らされていることが証明された。このことから考察すると、血管網形成に必要な血流、栄養、物理的因子は host 側からの供給が必要であり、**angiogenesis** は血管の成長と発達に役に立つことを示唆した。また、**VEGF** を添加したうえで、後腎間葉系細胞の分化による微小血管形成を促すことは可能である。しかし、培養期間が長期化すると血管の消失、組織の崩壊が起こる。それを防ぐには、培養腎の成長、糸球体数の増加、血管網形成を促すことが出来る **angiogenesis** による方法が必要であることを示唆した。

第 4 章では、今後 **iPS**、**ES** 細胞を用いて腎臓組織を構築する際、高効率な方法を開発するため、マウス腎臓原基組織ではなく、腎臓原基細胞を用いて、**in vitro** 培養および **in vivo angiogenesis** 利用法を試みた。本章で考案した方法では、発生腎原基組織から分散された単一細胞を、**in vitro** で複数個のスフェロイドに形成させた後、**RWV** にてスフェロイドを融合させ、巨大化したうえで、腎被膜下に移植した。その結果、単純スフェロイドに比べ、**RWV** で融合された巨大スフェロイドのみは糸球体や血管の形成が認められた。また、マウスの腎臓被膜下に移植した結果、巨大化していないスフェロイド組織はネフロンまで成長できなかったが、巨大化したスフェロイドが生着、成長し、腎臓に重要なネフロン組織までの再構築に成功した。この結果から、発生腎細胞をスフェロイド、巨大化スフェロイド化および腎皮膜下移植の方法では、**in vitro** で操作した細胞塊が host 側の腎臓において治療効果が最大限発揮できるように期待できる。

第 2、3、4 章の実験で得られた結果に基づき、腎臓原基の **in vitro** 培養にて糸球体、血管を再構築することは可能であることが分かったが、腎臓内の高機能組織である血管網、糸球体数の増加およびネフロン成長を促すには培養系のみでは達成できない。本研究によって高機能腎組織の構築に **angiogenesis** が必要であることは初めて明らかになった。また、細胞から高機能腎組織への構築を目指すため、本研究では **RWV** の物理的手法を考案し、細胞塊を巨大化したうえで、さらに **angiogenesis** を利用する新たな方法を提唱した (**Fig. 47**)。この方法は **iPS**、**ES** 細胞にも幅広く利用できるから、近未来再生医療に、特に慢性腎不全患者に腎臓機能を再生もしくは代行することが出来るのではないかと考える (**Fig. 48**)。

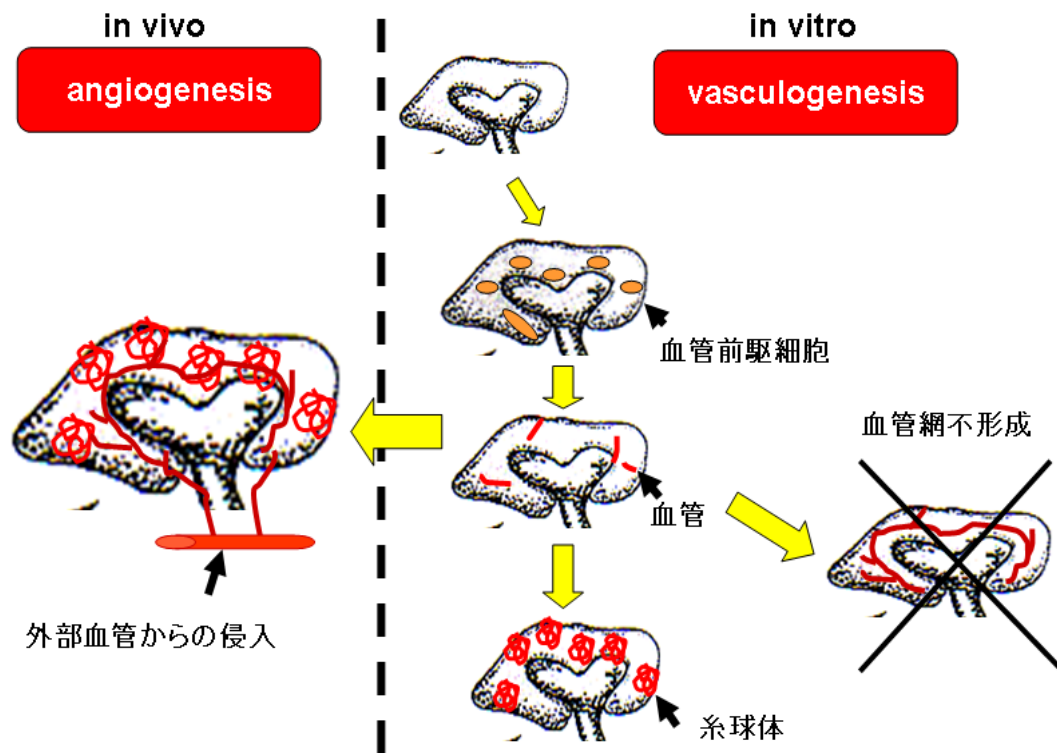


Fig. 47 本論文の総括

臨床応用の可能性

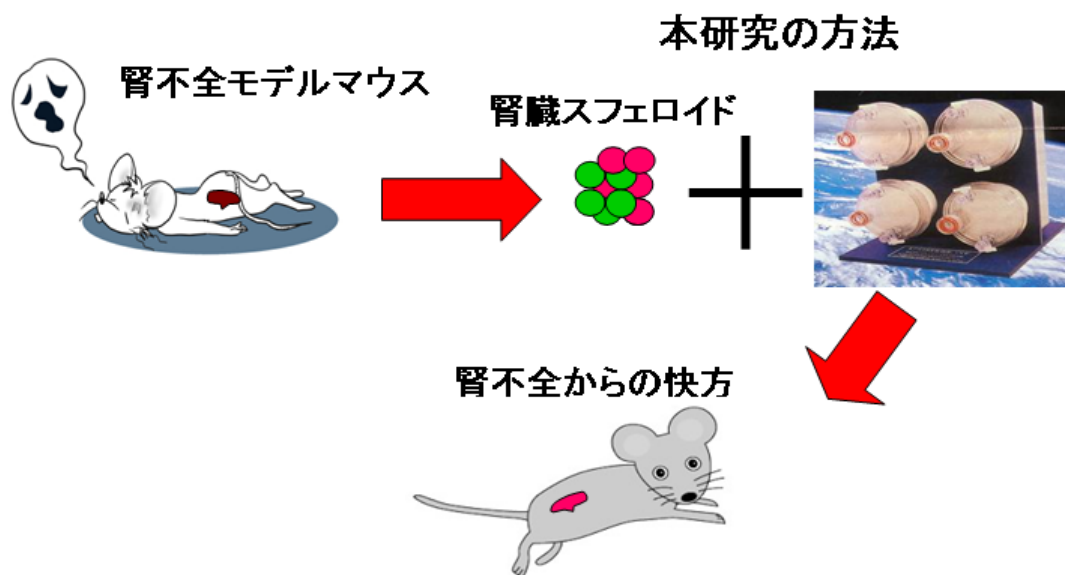


Fig. 48 今後の展望

付録 使用した Primer の種類および配列

Name	Sense 5' ----- 3'	Size
Flk1	Fw gacggagaaggagtctgtgc (GC%=60、Tm=60.4)	458
	Rv gtcactgacagaggcgatga (GC%=55、Tm=58.4)	
Flt1	Fw caaccagcccctgacagtat (GC%=50、Tm=58.4)	470
	Rv aggccaggagtgagaagtca (GC%=50、Tm=58.4)	
Tie2	Fw gagacagaccctgcttttgc (GC%=50、Tm=59.99)	474
	Rv cttctccctccagcactgtc (GC%=50、Tm=60.4)	
Brachyury	Fw ccggtgctgaaggtaaagt (GC%=50、Tm=59.99)	297
	Rv cctccattgagcttggtggt (GC%=50、Tm=60.11)	
c-kit	Fw ttatccttaggccgtgtgg (GC%=50、Tm=59.95)	230
	Rv tgtggccccttaagtacctg (GC%=50、Tm=59.99)	
PECAM-1	Fw tgcaggagtcccttccact (GC%=50、Tm=59.99)	245
	Rv acggttgattccactttgc (GC%=50、Tm=59.98)	
GAPDH	Fw aactttggcattgtggaagg (GC%=50、Tm=59.99)	472
	Rv ccctgttgctgtagccgtat (GC%=50、Tm=59.99)	

謝辞

本論文を結ぶにあたり、本研究の遂行において、ご指導、御協力をいただいた方々に感謝の意を表します。

まず本研究の遂行ならびに論文作成に多大なご指導、ご鞭撻を受け賜りました筑波大学 生命環境系 王 碧昭 教授に深く感謝いたします。また本論文を作成するにあたりご指導、ご助言を受け賜りました筑波大学 生命環境系 中村 幸治 教授、中島 敏明 教授、山田 小須弥 准教授に心から感謝いたします。

さらに大学院での学生生活においてお世話になりました友人、王研究室の皆様にも深く御礼申し上げます。また、本研究に尊い命を捧げてくれた実験動物たちのご冥福をお祈りいたします。

最後に、経済的、精神的な支援をして頂いた家族に深く御礼申し上げます。

本論文に関する報告

受賞

西村 裕介、王 碧昭 腎臓原基細胞を用いた腎組織の再構築
化学工学会第 47 回秋季大会 2015 年 優秀発表賞

西村 裕介、王 碧昭 異なる培養条件下の発生腎における *in vitro* 及び *in vivo*
の血管構築
化学工学会第 46 回秋季大会 2014 年 優秀発表賞

競争的研究資金

西村 裕介、王 碧昭 腎血管新生・再生におけるガイダンス因子の解明
平成 26 年度笹川科学研究助成 研究番号：26-533

研究発表

西村 裕介、王 碧昭 腎臓原基細胞を用いた腎組織の再構築
化学工学会第 47 回秋季大会 2015 年 9 月

西村 裕介、王 碧昭 異なる培養条件下の発生腎における *in vitro* 及び *in vivo*
の血管構築
化学工学会第 46 回秋季大会 2014 年 9 月

Yusuke Nishimura, Pi-Chao Wang. Study in the kidney primordial culture.
The Japan Tissue Culture Association May. 2014

西村 裕介、王 碧昭 セラミックス製担体培養による発生期腎臓血管ネット
ワークの形成
第 13 回日本再生医療学会 2014 年 3 月

Yusuke Nishimura, Pi-Chao Wang. Angiogenesis in developing kidney and transplanted
kidney. ASCB (American Society of Cell Biology) Dec. 2013

西村 裕介、王 碧昭 拍動流培養装置を用いた発生期腎臓血管形成の検証
第 51 回日本人工臓器学会 2013 年 9 月

西村 裕介、王 碧昭 発生期腎臓血管形成の解析及び血管構築の試み
日本動物細胞工学会 2013 年 7 月

投稿論文

Detection of initial angiogenesis from dorsal aorta into metanephroi and elucidation
of its role in kidney development. Regenerative therapy. DOI
10.1016/j.reth.2016.01.003 (2016) accepted, in press

参考文献

1. Cebrián C, Borodo K, Charles N, Herzlinger DA. Morphometric index of the developing murine kidney. *Dev Dyn.* 2004; 231:601-8.
2. Abrahamson DR. Glomerulogenesis in the developing kidney. *Seminars in nephrology.* 1991; 11:375-389.
3. Takahashi T, Huynh-Do U, Daniel TO. Renal microvascular assembly and repair: Power and promise of molecular definition. *Kidney Int.* 1998; 53:826-835.
4. Cullen-McEwen LA, Caruana G, Bertram JF. The where, what and why of the developing renal stroma. *Nephron Experimental Nephrology.* 2005; 99: e1-e8.
5. Eremina V, Cui S, Gerber H, Ferrara N, Haigh J, Nagy A, Ema M, Rossant J, Jothy S, Miner JH, Quaggin SE. Vascular endothelial growth factor signaling in the podocyte-endothelial compartment is required for mesangial cell migration and survival. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17: 724-735.
6. Odysee Michos : Kidney development from ureteric bud formation to branching morphogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2009; 19:484-490.
7. Song JJ, Guyette JP, Gilpin SE, Gonzalez G, Vacanti JP, Ott HC. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med.* 2013; 19:646-51.
8. Kitamura S, Sakurai H, Makino H, Single adult kidney stem/progenitor cells reconstitute 3-dimensional nephron structures *in vitro*, *Stem Cells.* 2014; 33 :774-784.
9. Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, Nishinakamura R, Redefining the *in vivo* origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells, *Cell.* 2014; 14:53–67.
10. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 2000; 6: 389-395.
11. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors and regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* 2006; 312: 549-560.
12. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors.

- Nat. Med. 2003; 9: 669-676.
13. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation research*. 1999; 85: 221-228.
 14. Demenico R. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. *Leukemia research*. 2007; 31: 439-444.
 15. Ekblom P, Sariola H, Karkinen-Jaaskelainen M, Saxen L. The origin of the glomerular endothelium. *Cell Differ* 1982; 11: 35-39.
 16. Sariola H, Ekblom P, Lehtonen E, Saxen L. Differentiation and vascularization of the metanephric kidney grafted on the chorioallantoic membrane. *Dev. Biol.* 1983; 96: 427-435.
 17. Gomez RA, Norwood VF, Tufro-McReddie A. Development of the kidney vasculature. *Microsc Res. Tech.* 1997; 39:254-260.
 18. Hyink DP, Tucker DC, St. John PL et al. Endogenous origin of glomerular endothelial and mesangial cells in grafts of embryonic kidneys. *Am. J. Physiol.* 1996; 270: F886-F899.
 19. Robert B, St John PL, Hyink DP, Abrahamson DR. Evidence that embryonic kidney cells expressing flk-1 are intrinsic, vasculogenic angioblasts. *Am J Physiol Fluid Electrolyte Physiol.* 1996; 271:F744-F753.
 20. Abrahamson DR, Robert B. Derivation and differentiation of glomerular endothelial cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003; 18:2-7.
 21. Dekel B, Hochman E, Sanchez MJ, Maharshak N, Amariglio N, Green AR, Izraeli S. Kidney blood, and endothelium: Developmental expression of stem cell leukemia during nephrogenesis. *Kidney Int.* 2004; 65:1162-9.
 22. Oliver JA, Barasch J, Yang J, Herzlinger D, Al-Awqati Q. Metanephric mesenchyme contains embryonic renal stem cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002; 283:F799-809.
 23. Usui J, Yamada R, Kanemoto K, Koyama A, Nagata M. Murine metanephric mesenchyme possesses characteristics of vascular endothelial cells in vitro. *Nephron Exp Nephrol.* 2004; 102:e93-e98.
 24. Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, Yamada Y, Noda T, Ito Y, Satake M, Suda T, Drake CJ. A role for hematopoietic stem cells in promoting

- angiogenesis. *Cell*. 2000; 102:199-209.
25. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*. 1999; 155:739-52.
 26. Masuda M, Kogata N, Mochizuki N. Crucial roles of PECAM-1 in shear stress sensing of vascular endothelial cells. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 2004; 124: 311-318.
 27. Jim Smith. Brachyury and the T-box genes. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1997; 7: 474-480.
 28. Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase in an early marker for endothelial cell precursors. *Development*. 1993;118:489-498
 29. Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev*. 1993 ;12:303-24.
 30. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med*. 1998 ;4:336-40.
 31. Satchell SC, Harper SJ, Tooke JE, Kerjaschki D, Saleem MA, Mathieson PW. Human podocytes express angiopoietin 1, a potential regulator of glomerular vascular endothelial growth factor. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13:544-50.
 32. Yuan HT, Suri C, Yancopoulos GD, Woolf AS. Expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and the Tie-2 receptor tyrosine kinase during mouse kidney maturation. *J Am Soc Nephrol*. 1999 ;10:1722-36.
 33. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor. *Mol Cell Biol*. 1996;16:4604-13.
 34. Bernhardt WM, Schmitt R, Rosenberger C, Münchenhagen PM, Gröne HJ, Frei U, Warnecke C, Bachmann S, Wiesener MS, Willam C, Eckardt KU. Expression of hypoxia-inducible transcription factors in developing human and rat kidneys. *Kidney Int*. 2006; 69:114-22.
 35. Freeburg PB, Robert B, St John PL, Abrahamson DR. Podocyte expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2 during glomerular development. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14:927-38.

36. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*. 2000; 408:92-6.
37. Alpers CE, Seifert RA, Hudkins KL, Johnson RJ, Bowen-Pope DF. Developmental patterns of PDGF B-chain, PDGF-receptor and alpha-actin expression in human glomerulogenesis. *Kidney Int*. 1992; 42:390-399.
38. Arar M, Xu YC, Elshihabi I, Barnes JL, Choudhury GG, Abboud H E. Platelet-derived growth factor receptor beta regulates migration and DNA synthesis in metanephric mesenchymal cells. *J Biol Chem*. 2000; 275:9527-33.
39. Demenico, R. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. *Leukemia Res*. 2007; 31:439-444.
40. Takayuki, A., Haruchika, M., Tomono, T., Christoph, K., Christopher, P., Marcy, S., Marianne, K., Meredith, M., Jeffrey, M. I. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res*.1999;85:221-228 .
41. Barclay AE, Bentley FH. The vascularisation of the human stomach. A preliminary note on the shunting effect of trauma. *Gastroenterology*. 1949; 12:177-183.
42. More RH, Duff GL. The renal arterial vasculature in man. *Am. J. Anat*. 1951; 27:95-117.
43. Murakami T. Application of the scanning electron microscope to the study of the fine distribution of the blood vessels. *Arch. Histol. Jpn*. 1971; 32:445-454.
44. Fujibayashi T, Matsusaka T. Findings of the vascular system coated with a new material for SEM use. *J. Electron Microsc*. 1972; 23: 228-229.
45. Shunzo K. Application of corrosion cast method for scanning electron microscopic observation of mouse embryo vasculature. *J. Electron. Microsc*. 1993; 42: 14-23.
46. Jensen BM, Akin C, Gilfillan AM. Pharmacological targeting of the KIT growth factor receptor: a therapeutic consideration for mast cell disorders. *J Pharmacol*. 2008; 154:1572-82.
47. Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H,

- Fukami K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci.* 2001; 14: 1481-1488.
48. Takashi Yokoo, Akira Fukui, Toya Ohashi, Yoichi Miyazaki, Yasunori Utsunomiya, Tetsuya Kawamura, Tatsuo Hosoya, Masataka Okabe and Eiji Kobayashi. Xenobiotic Kidney Organogenesis from Human Mesenchymal Stem Cells Using a Growing Rodent Embryo. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 1026–1034.
 49. Sharon A. Rogers and Marc R. Hammerman. Transplantation of rat metanephroi into mice. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 2001; 280: 1865–1869.
 50. Hartwig S, Ho J, Pandey P, Macisaac K, et al. Genomic characterization of Wilms' tumor suppressor 1 targets in nephron progenitor cells during kidney development. *Development.* 2010; 137:1189-1203.
 51. Kreidberg JA. WT1 and kidney progenitor cells. *Organogenesis* 2010; 6:61-70.
 52. Wagner R, Van LD, Hossler F, Czymmek K, Pauwels E, Van H. High-resolution imaging of kidney vascular corrosion casts with Nano-CT. *Microsc Microanal* 2010; 17:215–219.
 53. Baldwin HS, Shen HM, Yan HC, DeLisser HM et al. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development* 1994; 120:2539-2553.
 54. Sohail RS, Farzad E, Adam J, Jose P, Nikesh L, Marcus M, Douglas AP, Krishna P, Pier GM, Chiyo S, Ping G, Kelly AM, David JH, Sidhartha ST, George KG. Embryonic mouse blood flow and oxygen correlate with early pancreatic differentiation. *Dev. Biol.* 2011; 349:342–349.
 55. Marlier A, Schmidt-Ott KM, Gallagher AR, Barasch J, Karihaloo A. Vegf as an epithelial cell morphogen modulates branching morphogenesis of embryonic kidney by directly acting on the ureteric bud. *Mech Dev.* 2009; 126:91-98.
 56. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 2011; 146:873-887.
 57. Marlier A, Schmidt-Ott KM, Gallagher AR, Barasch J, Karihaloo A. Vegf as an epithelial cell morphogen modulates branching morphogenesis of

- embryonic kidney by directly acting on the ureteric bud. *Mech Dev* 2009; 126:91-98.
58. Watson O, Novodvorsky P, Gray C, Rothman AM, Lawrie A, Crossman DC, Haase A, McMahon K, Gering M, Van Eeden FJ, Chico TJ. Blood flow suppresses vascular Notch signalling via *dll4* and is required for angiogenesis in response to hypoxic signalling. *Cardiovasc Res* 2013; 100:252-261.
 59. Takahashi T, Huynh-Do U, Daniel TO. Renal microvascular assembly and repair: power and promise of molecular definition. *Kidney Int* 1998; 53: 826-835.
 60. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* 2003; 111:707-716.
 61. Han-Hsiu Hsu, Yusuke M, Pan Qi, Yusuke N, Pi-Chao W. Type V collagen fibrils in mouse metanephroi. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 441:649–654.
 62. Rosines E, Sampogna RV, Johkura K., Vaughn DA, Choi Y, Sakurai H, Shah MM, and Nigam SK. Staged in vitro reconstitution and implantation of engineered rat kidney tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104:20938-20943.
 63. Christophe L, Patrycja S, Alicia GS, Arnaud G, Cristina F, Valerie K, Georges L. Blood cell generation from the hemangioblast. *J Mol Med* 2010; 88:167-172.
 64. Robert Langer and Joseph P. Vacanti. *Tissue Engineering*. *Science* 1993; 260:920-926.
 65. Barzegari A, Saei AA. An Update to Space Biomedical Research: Tissue Engineering in Microgravity Bioreactors. *BioImpacts* 2012; 2:23-32.
 66. Hymer WC, Grindeland RE, Salada T, Cenci R, Krishnan K, Mukai C et al. Feeding Frequency Affects Cultured Rat Pituitary Cells in Low Gravity. *J biotechnol*, 1996;47:289-312.
 67. Yu X, Botchwey EA, Levine EM, Pollack SR and Laurencin CT. Bioreactor-Based Bone Tissue Engineering: The influence of Dynamic Flow on Osteoblast Phenotypic Expression and Matrix Mineralization. *Proc Natl Acad Sci USA*.2004; 101: 11203-11208.
 68. Hammond TG, Hammond JM. Optimized suspension culture: the

- rotating-wall vessel. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; 281:12-25.
69. Altman G, Horan R, Martin I, Farhadi J, Stark P, Vollach V, Richmand JC, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J.* 2002; 16:270-2.
70. Carver SE and Heath CA. Semi-Continuous Perfusion System for Delivering Intermittent Physiological Pressure to Regenerating Cartilage. *Tissue eng.* 1999; 5:1-11.
71. Xinaris C, Benedetti V, Rizzo P, Abbate M, Corna D, Azzollini N, Conti S, Unbekandt M, Davies JA, Morigi M, Benigni A, Remuzzi G. In vivo maturation of functional renal organoids formed from embryonic cell suspensions. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23:1857-68.
72. Watson O, Novodvorsky P, Gray C, Rothman AM, Lawrie A, Crossman DC, Haase A, McMahon K, Gering M, Van Eeden FJ, Chico TJ. Blood flow suppresses vascular Notch signaling via *dll4* and is required for angiogenesis in response to hypoxic signaling. *Cardiovasc Res.* 2013; 100: 252-261.