
厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

ES細胞からの腎臓細胞誘導法の開発に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西中村 隆一

平成18(2007)年 3月

目次

I. 総括研究報告	
ES 細胞からの腎臓細胞誘導法の開発	1
西中村 隆一	
II. 分担研究報告	
ES 細胞と腎臓に共通する分子機構の解明	9
小林 千余子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	15
IV. 研究成果の刊行物・別冊	16

ES 細胞からの腎臓細胞誘導法の開発

主任研究者 西中村 隆一 熊本大学発生医学研究センター 教授

研究要旨

腎不全は難病指定とされ、社会的負担は大きいにもかかわらず、腎機能を回復させる画期的な治療法はいまだ存在しない。腎臓の再生研究に決定的に欠けているもの、それは腎臓前駆細胞を検定する系である。そこで我々は発生期腎臓から前駆細胞を同定する系を確立した。我々が単離した核内因子 *Sall1* は、腎臓前駆細胞を含むと考えられる後腎間葉に発現し、そのノックアウトマウスは腎臓を欠損する。この遺伝子座に GFP を導入したマウスの後腎間葉から、GFP が高発現する細胞を FACS で選別し、*Wnt4* を発現するフィーダー上で培養すると、1 個の細胞からコロニーが形成され、このコロニーは糸球体、近位尿細管、遠位尿細管という多系統へ分化することを見いだしている。本計画ではこのコロニーアッセイを基盤として、胚性幹 (ES) 細胞から腎臓前駆細胞の誘導を目指す。まず ES を 2 次元で分化誘導し、各分画をコロニーアッセイに投入したがコロニーは形成されなかった。また *Sall1* の遺伝子座に GFP を挿入した ES 細胞も誘導には適さなかった。そこで発生期に発現する別の遺伝子座に GFP を挿入した ES を作成し、胚様体を形成させたところ、GFP が増加した。この GFP 陽性細胞をコロニーアッセイに投入することによって前駆細胞の誘導法を探りたい。

分担研究者氏名・所属機関及び所属機関
における職名

小林 千余子 熊本大学発生医学研究センター助手

A. 研究目的

日本で腎不全により人工透析を受ける人は26万人を超え、この10年で2倍となった。現在、慢性腎不全の原因の第1位は糖尿病であり、今後も増える一方である。腎不全は難病指定とされ、その医療費はすべて国庫によって賄われるため、社会的負担は大きい。このような状況にもかかわらず、腎機能を回復させる画期的な

治療法はいまだ存在せず、最終的には透析導入となる。この状況は申請者が臨床医だった10年前と何ら変わらない。腎臓領域に再生医療を導入しようと考えたときに、決定的に欠けているもの、それは腎臓前駆細胞を検定する系である。つまりES細胞や骨髄などから腎臓細胞を誘導しようとするとき、腎臓前駆細胞を同定でき、かつその頻度まで算定できる確実に信頼できる系がなければならない。我々は、前駆細胞が存在する発生期腎臓をポジティブコントロールとして、そこから前駆細胞を同定する系を確立したので、これを基盤にES細胞からの誘導を試

みる。まずES細胞を使用するのは、この細胞のみが *in vivo*で腎臓に分化することが証明されているからである。もちろんES細胞には倫理的な問題が伴うが、腎臓細胞を誘導する方法を見いだすことが先決である。これが成功してから、骨髄や臍帯血、あるいは患者の腎臓などに応用するのが望ましく、腎臓に分化しないかもしれない細胞で始めることはない。よって本研究期間中はESに専念する。より長期的には、腎臓誘導条件を広く開示すれば、骨髄間葉系幹細胞など多領域の研究者の参入が期待でき、飛躍的に実用性が増すであろう。また腎不全治療に向けた新しい方策の可能性を提示することになる。腎臓は再生医療から最も遠い臓器と考える人も多く、現時点ではその通りであろうが、10年先を見越して今ここで力を入れなければ他臓器の流れから置いていかれるのではないだろうか。

B. 研究方法

本計画ではES細胞から腎臓前駆細胞への誘導を目指す。前駆細胞の同定とその頻度の検定は、上述のコロニーアッセイを使用する。

1) ES細胞の分化誘導

ESの分化系として、培養皿で2次元に展開する方法（RIKENの西川伸一らが開発）を主として使用した。この利点は、分化誘導後再解離が容易でFACSが可能であること、かつ側方中胚葉がf1k1陽性画分に、沿軸中胚葉がPDGFR陽性画分に存在することである。腎臓はこの2つに挟まれた中間中胚葉から生じるので、どちらかの画分に重複する形で腎臓前駆細胞

を含む集団があると考えた。いずれにしても、コロニーアッセイを指標にしながら、腎臓前駆細胞が最も濃縮される画分をFACSで絞り込んでいくことになる。また検定系として、同じく我々が開発した器官培養法、新生マウスへの移植法も併用することによって、*in vivo*でも確かに前駆細胞としての機能があることを確認する。

2) ES細胞への遺伝子導入による誘導効率の改善

上の方法で腎臓前駆細胞が検出されたとしても、その頻度は極めて低いことが予想される。よって2つの工夫を行う。一つは、発生期に重要な遺伝子群をES細胞に導入して、誘導の効率を高めることである。腎臓発生カスケードの現時点での最上流(Sal11より上流)に位置するPax2を、ニワトリ沿軸中胚葉に導入すると異所性の腎管が誘導できることが学会レベルで報告されている。よってPax2を薬剤で制御できる形でESに導入し、上記2次元誘導法で沿軸中胚葉を誘導中にPax2の活性化を試みる。もう一つは検定系の更なる単純化、迅速化である。腎臓前駆細胞に特徴的な遺伝子座にそれぞれGFPという蛍光色素をノックインしたES細胞を作製する。これによって蛍光検出だけでその頻度が判明し、現在の7-10日に比較して飛躍的に効率化される。もちろん蛍光頻度とコロニーアッセイが関連することは確認する必要がある。

最終的には腎病態モデルへの移植を行い、病態の改善を試みるわけだが、この時点で情報を公開し日本中の腎臓内科と広く共同研究を行いたい。各々得意とす

る病態モデルへ導入してもらった方が、迅速で網羅的に検討できると考える。そのためにも本研究期間中はESからの誘導に専念する。

(倫理面への配慮)

実験動物は、麻酔下での手術を行い、検体採取時には安楽死させ、無用な苦痛を与えないようガイドラインに従って取り扱う。

C. 研究結果

腎臓は前腎、中腎、後腎の三段階を経て形成される。成体哺乳類の腎臓は後腎だが、前腎はアフリカツメガエルのアニマルキャップからアクチビンとレチノイン酸によって3日間で誘導が可能である。この系を用いてカエル腎管に発現する新規核内因子を単離し、さらにそのマウスホモログSall1を単離した。10個ものzincフィンガーを持つこのSall1は、腎臓前駆細胞集団である後腎間葉に発現し、かつノックアウトマウスは腎臓を完全に欠損することを見いだした(Nishinakamura et al. Development, 2001)。またヒトSALL1の変異も報告され、腎臓形成におけるSall1の種を超えた重要性が認識されている。さらにSall1の遺伝子座にGFPを導入したマウスをノックインの手法で作製し、腎臓前駆細胞集団である後腎間葉が光ることを確認した(Takasato et al. Mech Dev, 2004)。このマウスの胎児期腎臓からGFPが高発現する細胞群をFACSで選別し、Wnt4を発現するフィーダー上で無血清の条件下で培養すると、1個の細胞からコロニーが形成

され、このコロニーは糸球体、近位尿管及び遠位尿管という多系統へ分化することを、本研究申請時までに見いだしていた(図1)。

さらに17年度には腎臓間葉中のGFP高発現の細胞群を再凝集させ液相と気相の境界面で器官培養すると、5日間で3次元構造を再構築でき、その中には糸球体様構造や尿管様構造が認められた。これらは各種マーカーで陽性に染まり、分化していることが証明された。これに対してGFP陰性の細胞群からの凝集塊は数日中に消失した。よってSall1を高発現する後腎間葉細胞中に腎臓前駆細胞が存在し、これは3次元立体構造を再構築できることを証明した(図2)。(Osafune et al. Development, 2006)。

18年度は以下の結果を得た。

1) 上述の系を基盤にして、ES細胞からの腎臓前駆細胞誘導を試みた。ESを2次元で分化させる方法をほぼ再現し、分化誘導した各分画をコロニーアッセイと器官培養に投入した。具体的にはES細胞をOP9細胞上、あるいはIV型コラーゲン上で平面培養したあと、Flk1とPDGFRの二つのマーカーでソートし、各分画をWnt4発現フィーダー上で、あるいは器官培養系で検討を行った。しかし、どの分画からもコロニーや尿管は形成されなかった。

2) 次に誘導の効率をあげるため、腎臓発生カスケードの現時点での最上流Pax2を薬剤制御下に誘導できるESを作成した。ROSA26遺伝子座に挿入された遺伝子をテトラサイクリンで制御できるES細胞をRIKENの丹羽らが既に発表している。これにPax2を組み込んだES細胞を確立した。

Pax2の誘導を確認した後、1)と同じアッセイに投入したがこれも陰性の結果であった。

3) そこで今度は、野生型ESから胚様体を形成させ、アクチビンとレチノイン酸を添加したところ、非常に効率よく発生期腎臓関連の遺伝子群が発現することを見出した。10年前の我々の研究の出発点だが、アフリカツメガエルのアニマルキャップをアクチビンとレチノイン酸で処理して腎管を誘導するという系であったことを考えると、アニマルキャップとESの類似性が示唆され、興味深い知見である。ともあれ、まず手持ちのSal11GFP ES細胞で前駆細胞の濃縮ができないか検討したが、ES細胞でもSal11が発現するために分離が不可能であった。ちなみにES細胞ではSal14が必須であり(Sakaki-Yumoto et al. Development 2006)、ESにおけるSal11の役割は不明である。次いで、腎臓発生においてSal11の上流で機能するSix1/Six4 (Kobayashi et al. Mech Dev 2007) についても検討したが、発現が筋肉など広汎なため適さないと判断した。結局ある転写因子の誘導が最も顕著であった。この遺伝子は腎臓が発生してくる中間中胚葉と後腎間葉に強く発現し、その欠失マウスはSal11やSix1/4よりも初期に腎臓発生異常をきたすことが報告されている。よってこの遺伝子座にGFPを組み込んだESをノックイン法で作成した。つまりゲノムを単離してノックイン用ベクターを作成し、ES細胞に導入、500個の候補から2個の相同組み換え体を単離した。これから胚様体を形成しアクチビンとレチノイン酸で処理すると確かにGFP

の強度が増加し(図3)、ソートが可能であった。今後陽性細胞をコロニーアッセイと器官培養に投入する予定である。

4) ESからの誘導法をさらに改善するためには、腎臓発生における遺伝子カスケードの解明が必須である。前述の通りSal11は後腎発生初期に必須であるが、今回、その上流であるSix1/Six4の機能を解析した。Six遺伝子ファミリーはショウジョウバエからヒトまで保存された転写因子であり、後腎間葉に発現するSix1はマウス腎発生に必須であることが明らかになっていた。しかし、Six1単独の欠失マウスでは、不完全ながら腎臓が形成される個体も存在しているため、他の遺伝子によってSix1の機能の一部が補われている可能性が考えられていた。そこで、その候補としてSix4を考え、Six1/Six4二重欠失マウスを用いて解析を行った。Six1/Six4欠失マウスでは腎臓及び尿管が完全に欠損し、尿管原基である尿管芽も全く形成されなかった(図4)。さらに、尿管芽の引寄せに関わる液性因子Gdnfの後腎間充織における発現も完全に消失しており、これらの症状はすべて、Six1欠失マウスと比べて重篤であった。よって、Six1とSix4は協調的にGdnfの発現を制御することで尿管芽を引寄せ、間充織と上皮の相互作用に関与していることが明らかになった。またSix1単独欠損で中腎発生も障害されていることも判明した(Kobayashi et al. Mech Dev 2007)。

D. 考察

平成17年度は腎臓前駆細胞検定系の確立に時間を費やして、それを発表することができた。これは腎臓前駆細胞を

prospective に同定する初めての系であり、独自性の高いものであると自負している。また前駆細胞がどのように運命決定されていくかを追える可能性があり、ノックアウトマウスをこの系に投入することによって、腎臓という臓器に、造血領域で研究されているような lineage commitment のコンセプトを導入できるのではないかと考えている。言い換えると、組織や切片のレベルでしか検討されていなかった腎臓形成が、単一細胞レベルで解析できるようになる可能性を秘めている。

18 年度に入り、本来の目的である ES 細胞からの腎臓前駆細胞の誘導実験を本格的に開始し、2次元での ES 細胞からの中胚葉誘導の再現に成功した。この方法においては、側方中胚葉が flk1 陽性画分に、沿軸中胚葉が PDGFR 陽性画分に存在する。腎臓はこの2つに挟まれた中間中胚葉から生じるので、どちらかの画分に重複する形で腎臓前駆細胞を含む集団があると考えた。しかし残念ながら ES 細胞を2次元で分化させる方法ではコロニーは形成されなかった。この原因の背景としては、ES 細胞からどこまでの（中間中胚葉、中腎、後腎）誘導がどれくらいの頻度で可能なのか、その場合中間中胚葉や中腎が後腎と同様にコロニーを作るのか、という問題を明らかにしなければならない。そのために中間中胚葉、中腎、後腎に発現する遺伝子に注目した。これは必ずしも腎臓特異的ではないが、ES 細胞をアクチビンとレチノイン酸で処理すると著明に増加する。実際この遺伝子座に GFP を挿入した ES 細胞は処理後に顕著

な GFP 増加を示す。GFP を指標にすることによって頻度の少ない前駆細胞を同定することが可能になると期待している。また同時に ES 細胞からマウスを作成中であり、このマウスから中間中胚葉、中腎、後腎を GFP を指標に単離する計画である。この遺伝子発現様式を解析し、かつコロニーアッセイにかけることによって、前述の問題点のかなりの部分を解決できるはずである。

E. 結論

ES 細胞の2次元誘導からはコロニーは形成されなかった。Pax2 を薬剤で制御できる形で ES に導入し、同様の検定を行ったがこれも陰性であった。ようやくアクチビンとレチノイン酸による誘導法と、それに反応する GFP ノックイン ES を確立したので、今後これらを使ってコロニーアッセイと器官培養を試みる。

F. 健康危険情報

本研究はヒトを対象とした検討を行っていないので、該当する情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakaki-Yumoto M, Kobayashi C, Sato A, Fujimura S, Matsumoto Y, Takasato M, Kodama T, Aburatani H, Asashima M, Yoshida N, Nishinakamura R. The murine homolog of *Sall4*, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with *Sall1* in anorectal, heart, brain and kidney development. *Development* (2006) 133(15):

3005-3013.

2. Nishinakamura R and Osafune K.

Essential roles of Sall family genes in kidney development. *J. Physiol Sci.* (2006)

56(2):131-136. Review.

3. Yamashita K, Sato A, Asashima M, Wang PC, Nishinakamura R. Mouse homolog of SALL1, a causative gene for Townes-Brocks syndrome, binds to A/T-rich sequences in pericentric heterochromatin via its C-terminal zinc finger domains. *Genes Cells* (2007)

12(2):171-182.

4. Kobayashi H, Kawakami K, Asashima M

Nishinakamura R. *Six1* and *Six4* are

essential for *Gdnf* expression in the metanephric mesenchyme and ureteric bud formation, while *Six1* deficiency alone causes mesonephric tubule defects. *Mech. Dev.*

(2007) 124(4), 290-303.

2. 学会発表

1. 榎 真代、小林 千余子、西中村 隆一
二 Zinc finger 蛋白 Sall4 は ES 細胞増殖に必須である 第 4 回幹細胞シンポジウム 2006 年 5 月 20 日、東京

2. Kobayashi C, Sakaki-Yumoto M, Fujimura S, Takasato M, Nishinakamura R. The murine homolog of Sall4 is essential for inner cell mass and embryonic stem cell proliferation. 第 39 回日本発生生学会 2006 年 6 月 1 日、広島

3. Nishinakamura R, Sakaki M, Yoshida N, Kobayashi C. Murine homologue of *Sall4*, a causative gene for Okihiro syndrome, is essential for early embryogenesis and proliferation of embryonic stem cells. 20th

IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Jun. 22, 2006, Kyoto.

4. Kobayashi H, Kawakami K, Asashima M, Nishinakamura R. *Six1* and *Six4* cooperatively function in the nephrogenic mesenchyme development. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Jun. 23, 2006, Kyoto.

5. Nishinakamura R. Molecular mechanisms of kidney development. (oral presentation) The 19th Naito Conference on Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells. Nov. 16, 2006, Kanagawa.

6. 西中村 隆一 腎臓の初期発生の分子機構 (特別講演) 第 1 回 JJK 東京腎・脈管フォーラム 平成 19 年 1 月 25 日、東京

7. Nishinakamura R, Kobayashi C, Yuri S, Yamaguchi Y. Essential roles of Sall4 in embryonic stem cells and primordial germ cells. (oral presentation) CDB symposium 2007; Germ Line versus Soma: Towards Generating Totipotency. Mar. 28, 2007. Kobe.

3. その他

1. 井上 秀二、西中村 隆一 「Sall family と腎の発生・幹細胞」腎の再生医学 医学のあゆみ (医歯薬出版) 220(6):477-480, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

図1. 1個の後腎間葉細胞からのコロニー形成

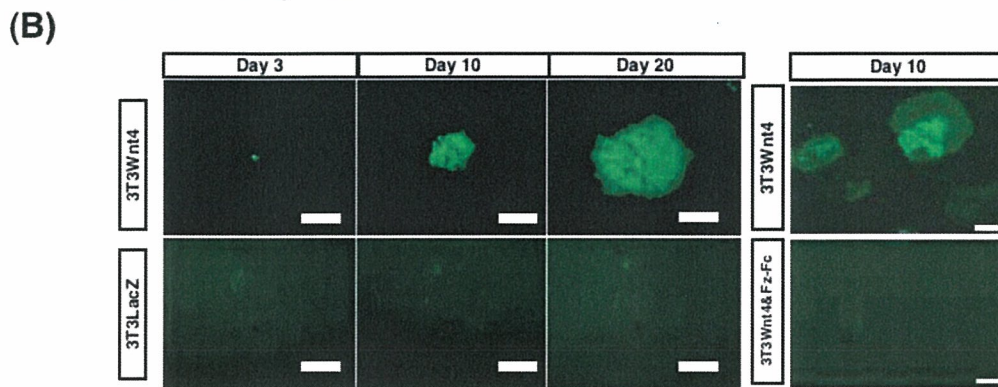
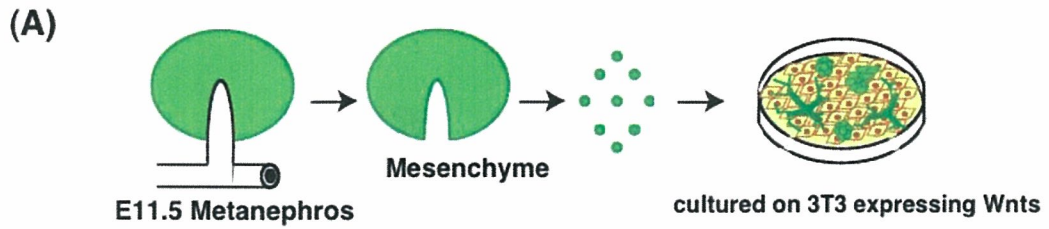


図2. 3次元構造の再構築

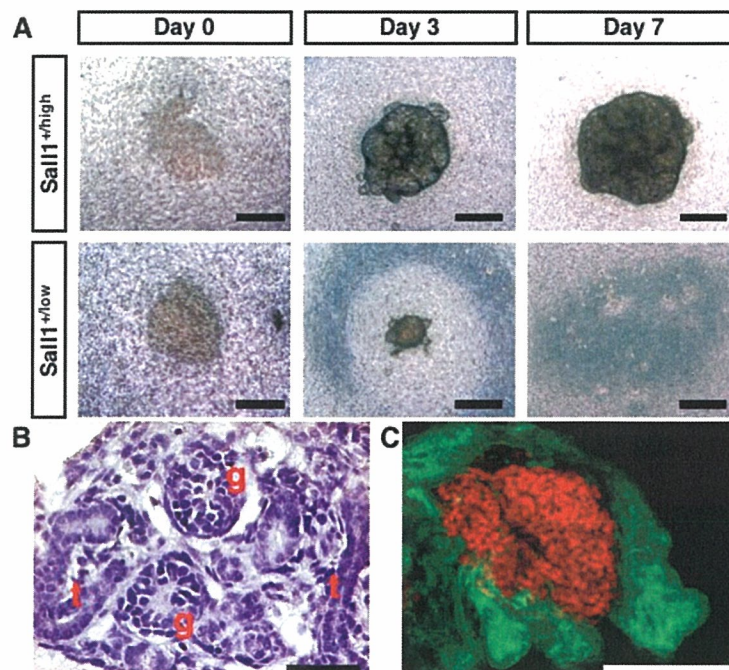


図3. ES分化誘導による
発生期遺伝子の発現増強

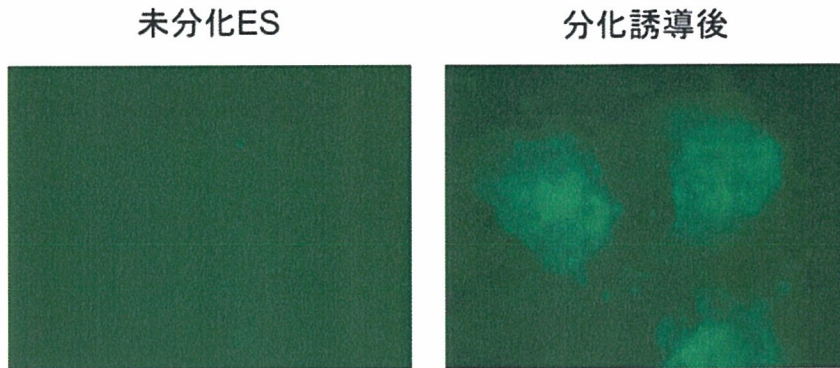
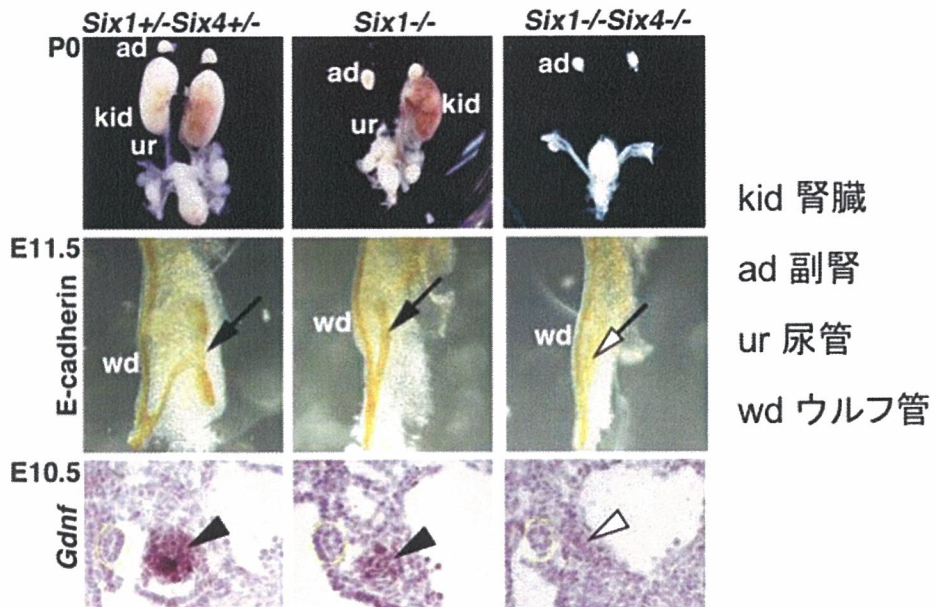


図4. Six1/Six4による腎臓形成



ES 細胞と腎臓に共通する分子機構の解明

分担研究者 小林 千余子 熊本大学発生医学研究センター 助手

研究要旨

Sall1 はショウジョウバエからヒトまで保存された zinc フィンガー蛋白で、哺乳類では 4 種類(Sall1-4) 存在する。マウス Sall1 は腎臓発生に必須であり、Sall1 を欠失する後腎間葉の前駆細胞は増殖が低下している。これに対して Sall4 のノックアウトは子宮着床直後に死亡し、胚盤胞の内部細胞塊からの増殖障害が観察された。胚性幹細胞 (ES 細胞) は内部細胞塊から由来するため、Sall4 を欠損する ES 細胞を作製したところ、同様に増殖異常が認められた。これらの結果から、腎臓と ES 細胞に Sall ファミリー遺伝子を介する共通の機構が存在することが示唆された。さらに Sall4 欠失 ES 細胞の詳細な解析によって、増殖低下だけではなく、胎盤方向への異常な分化が認められることが判明し、Sall4 が幹細胞の未分化維持に働いていることが示唆された。

A. 研究目的

日本で腎不全により人工透析を受ける人はこの 10 年で 2 倍となり、そのコストは 1 兆円と医療費の 3% を占めるに至っている。にもかかわらず、腎機能を回復させる画期的な治療法はいまだ存在せず、最終的には透析導入となる。腎臓の再生は確かに困難な課題であるが、そのヒントはその発生機構にあると考え、我々は腎臓発生の分子機構解明に取り組んでいる。

本計画は、Sall1 ファミリー遺伝子を中心として、ES 細胞と腎臓に共通の機構を解明することによって、腎臓再生への足がかりを得ることを目的とする。Sall1 はショウジョウバエからヒトまで保存された zinc フィンガー蛋白で、哺乳類では 4 種類(Sall1-4) 存在する。我々は以前マウス Sall1 を発生期腎臓から単離し、このノックアウトマウスは腎臓を欠損するこ

とを見いだした。腎臓の形成不全を伴うヒト SALL1 の変異も報告されており、種を越えた Sall1 の機能が提唱されている。しかしその分子機構は、発生期腎臓の小ささによる生化学的解析の困難さから解明が進んでいない。一方 Sall4 のノックアウトマウスを作成したところ、胎生 5.5 日という極めて初期に死亡し、胚盤胞の内部細胞塊からの増殖障害が観察された。胚性幹細胞 (ES 細胞) は内部細胞塊から由来するため、Sall4 を欠損する ES 細胞を作製することができれば、ES 細胞は試験管内で無限に増殖するため、生化学的にその詳細な機能が解明できると考えた。そしてその知見を腎臓形成にフィードバックすることを目的とした。

B. 研究方法

- 1) ES 細胞における Sall4 の機能解明
Sall4 のノックアウトを作成したとこ

ろ、胎生 5.5 日という極めて初期に死亡し、胚盤胞の内部細胞塊からの増殖障害が観察された。胚性幹細胞 (ES 細胞) は内部細胞塊から由来するため、Sal14 の ES 細胞における機能を解析するために、Sal14 を欠損する ES 細胞を作製した。通常の方法では非常に低頻度でしか単離できず、Sal14 が ES 細胞に必須であることが疑われた。そこで条件付きノックアウト作成の技法で、loxP 配列で Sal14 のエクソンをはさんだ ES 細胞を一旦作成し、そこに Cre を導入することで、Sal14 欠失 ES 細胞を単離した。得られた ES 細胞について、増殖、分化の検討を行った。

2) Sal11 と Sal14 の相互作用

Sal11 と Sal14 のヘテロマウスを交配して、二重ヘテロマウスを作成し、その表現型を調べた。また ES 細胞を用いてこの二つの遺伝子の相互作用を検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物は、麻酔下での手術を行い、検体採取時には安楽死させ、無用な苦痛を与えないようガイドラインに従って取り扱った。

C. 研究結果

1) ES細胞におけるSal14の機能解明

条件付きノックアウト作成の技法で、loxP 配列で Sal14 のエクソンをはさんだ ES 細胞を一旦作成し、そこに Cre を導入することで、Sal14 欠失 ES 細胞を単離することに成功した。この細胞は非常に増殖が遅く、Sal14 が ES 細胞の増殖に必須であることが明らかになった。これに対して未分化能や形態は保たれており、増

殖低下が異常な分化のためではないことが示された (図 5) (Sakaki-Yumoto et al. 2006)。

これらはフィーダー上で培養した所見であるが、フィーダーを外した場合、Sal14 欠失 ES 細胞では、増殖低下とともに自発的分化傾向がみられ、少数ながら Cdx2 陽性細胞が出現した (図 6)。胚様体を形成させても Cdx2 や他の胎盤マーカーが上昇していた。これらの結果は、ES 細胞及びさらに発生の進んだ段階であるエピプラストを未分化な状態で維持することに Sal14 が必須である可能性を示唆する。ES 細胞から Sal14 を含む蛋白複合体を同定したところ、Sal14 は Mi2/NuRD という HDAC を含む複合体に結合しており、Sal14 がヒストンのアセチル化やメチル化を変えて標的遺伝子を制御している機構が考えられた。また生体内でも同様の現象が見られるかを検討するために、エピプラスト特異的 Sal14 ノックアウトも作成した。通常のノックアウトより症状が軽症化されるものの、E8.5 において allantois や somite の形成不全等の顕著な形態異常が認められた。

2) Sal11とSal14の相互作用

Sal11 と Sal14 の二重ヘテロマウスを作成したところ、全例が生直後に死亡し、外脳症や鎖肛等の症状とともに、腎臓形成異常が認められた (図 7)。両側腎臓を欠損するもの、片腎を欠損するもの、両側とも正常なもの、と多様な症状であった。これは遺伝学的にこの二つの遺伝子が相互作用することを意味するので、ES 細胞においてその局在を調べたところ、

Sall1 と Sall14 が共局在することが判明した。さらに免疫沈降法によって、内在性の蛋白同士が結合することが示され、これが二重ヘテロマウスの症状を説明する機構ではないかと考えられた。

D. 考察

Sall14 欠失 ES 細胞の作成、解析によって、Sall14 が ES 細胞の増殖に必須であることが明らかになった。一方 Sall11 は腎臓前駆細胞の増殖に必須である可能性が高くなっており、ES 細胞と腎臓という2つの細胞系に Sall1 を介した共通の機構が存在する可能性が示唆された。ES 細胞は遺伝子導入などが容易でかつ大量に増やせるので、遺伝学的生化学的解析に適している。Sall14 の ES 細胞における分子機構を解明し、それを腎臓に応用することによって、Sall11 の腎臓における機構を解明できるのではと考えている。他グループから Sall14 に Nanog や Oct3/4 といった ES 細胞必須遺伝子が結合するという報告もあり、ES 細胞とエピブラストという未分化な細胞群の維持に Sall14 がどのような機構で関わっているのかを解析していきたい。

Sall11 と Sall14 の二量体形成仮説は単純でわかりやすい。実際、外脳症や鎖肛等の症状はそれで説明できると考えている。しかし発生期腎臓において Sall11 と Sall14 は共局在は認められず、Sall14 はむしろ中腎管や尿管芽に発現している。よって尿管芽特異的 Sall14 ノックアウトを作成する計画である。

E. 結論

Sall11 は腎臓前駆細胞の増殖に、Sall14 は ES 細胞の増殖に、必須であることが明らかになった。さらに Sall14 は ES 細胞の未分化性を維持している可能性があり、Sall14 の ES 細胞における分子機構を解明し、それを腎臓に応用することによって、Sall11 の腎臓における機構を解明していきたい。本研究全体の目標である ES 細胞からの腎臓前駆細胞誘導法の開発に対しては、Sall11 と Sall14 の機能的違いを明らかにしたい。これは Sall14 に依存する ES 細胞が、Sall11 に制御される腎臓前駆細胞にどのように変化していくかののヒントになると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakaki-Yumoto M, Kobayashi C, Sato A, Fujimura S, Matsumoto Y, Takasato M, Kodama T, Aburatani H, Asashima M, Yoshida N, Nishinakamura R. The murine homolog of *Sall4*, a causative gene in Okhiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with *Sall1* in anorectal, heart, brain and kidney development. *Development* (2006) 133(15): 3005-3013.

2. 学会発表

1. 榎 真代、小林 千余子、西中村 隆一 Zinc finger 蛋白 Sall14 は ES 細胞増殖に必須である 第4回幹細胞シンポジウム 2006年5月20日、東京

2. Kobayashi C, Sakaki-Yumoto M, Fujimura S, Takasato M, Nishinakamura R. The murine homolog of Sall4 is essential

for inner cell mass and embryonic stem cell proliferation. (口頭発表) 第 39 回日本発生学会 2006 年 6 月 1 日、広島

3. Nishinakamura R, Sakaki M, Yoshida N, Kobayashi C. Murine homologue of *Sall4*, a causative gene for Okhiro syndrome, is essential for early embryogenesis and proliferation of embryonic stem cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Jun. 22, 2006, Kyoto.
4. Nishinakamura R, Kobayashi C, Yuri S, Yamaguchi Y. Essential roles of *Sall4* in embryonic stem cells and primordial germ cells. CDB symposium 2007; Germ Line versus Soma: Towards Generating Totipotency. Mar. 28, 2007. Kobe.

3. その他
特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

図5. *Sall4* 欠失 ES細胞の未分化能維持
(フィーダー存在時)

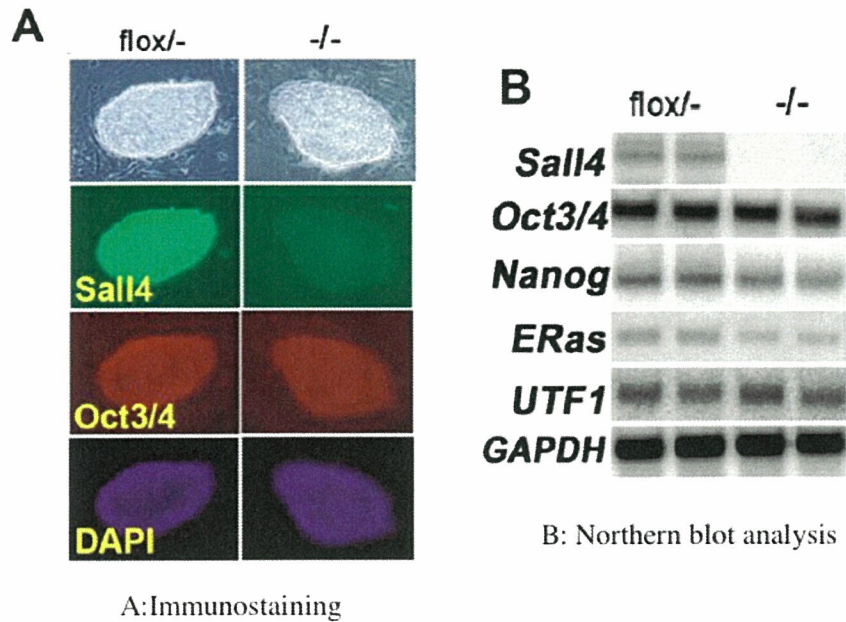


図6. *Sall4* 欠失ES細胞の分化
(フィーダー非存在時)

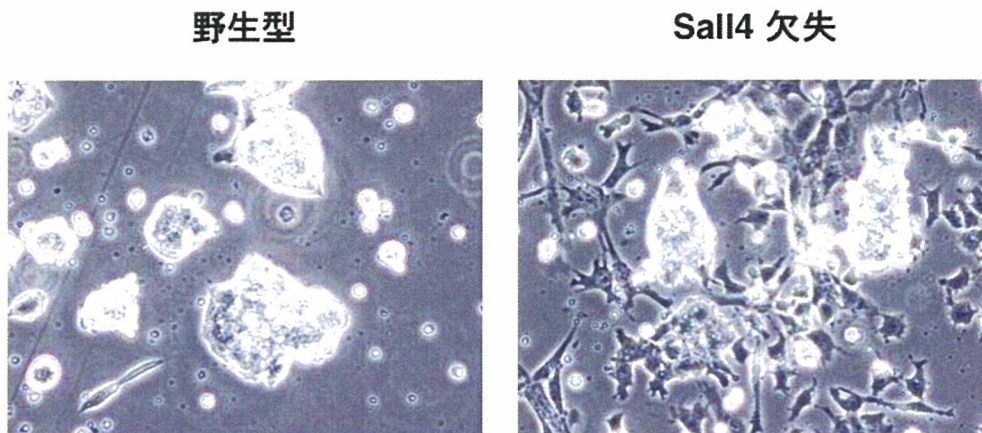
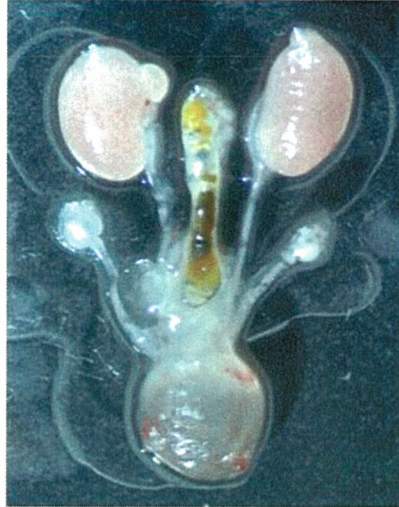


図7. Sall1/4 ダブルヘテロの 腎臓欠損

WT, Sall1 hetero, Sall4 hetero
Sall1/2, Sall2/3, Sall1/3, Sall2/4 het



Sall1/4 hetero



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakaki-Yumoto M, <u>Kobayashi C</u> , Sato A, Fujimura S, Matsumoto Y, Takasato M, Kodama T, Aburatani H, Asashima M, Yoshida N, <u>Nishinakamura R</u> .	The murine homolog of <i>Sall4</i> , a causative gene in Okhiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with <i>Sall1</i> in anorectal, heart, brain and kidney development.	Development	133 (15)	3005-3013	2006
<u>Nishinakamura R</u> and Osafune K.	Essential roles of Sall family genes in kidney development.	The Journal of Physiological Sciences	56 (2)	131-136	2006
Yamashita K, Sato A, Asashima M, Wang PC, <u>Nishinakamura R</u>	Mouse homolog of SALL1, a causative gene for Townes-Brocks syndrome, binds to A/T-rich sequences in pericentric heterochromatin via its C-terminal zinc finger domains.	Genes to Cells	12 (2)	171-182	2007
Kobayashi H, Kawakami K, Asashima M, <u>Nishinakamura R</u>	<i>Six1</i> and <i>Six4</i> are essential for <i>Gdnf</i> expression in the metanephric mesenchyme and ureteric bud formation, while <i>Six1</i> deficiency alone causes mesonephric tubule defects.	Mechanisms of Development	124 (4)	290-303	2007
井上秀二、 <u>西中村隆一</u>	Sall family と腎の発生・幹細胞	医学のあゆみ	220 (6)	477-480	2007

Development 133, 3005-3013 (2006) doi:10.1242/dev.02457

The murine homolog of *SALL4*, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with *Sall1* in anorectal, heart, brain and kidney development

Masayo Sakaki-Yumoto^{1,*}, Chiyoko Kobayashi^{1,*}, Akira Sato², Sayoko Fujimura¹, Yuko Matsumoto², Minoru Takasato³, Tatsuhiro Kodama⁴, Hiroyuki Aburatani⁴, Makoto Asashima³, Nobuaki Yoshida⁵ and Ryuichi Nishinakamura^{1,2,6,*†}

Mutations in *SALL4*, the human homolog of the *Drosophila* homeotic gene *spalt* (*sal*), cause the autosomal dominant disorder known as Okihiro syndrome. In this study, we show that a targeted null mutation in the mouse *Sall4* gene leads to lethality during peri-implantation. Growth of the inner cell mass from the knockout blastocysts was reduced, and *Sall4*-null embryonic stem (ES) cells proliferated poorly with no aberrant differentiation. Furthermore, we demonstrated that anorectal and heart anomalies in Okihiro syndrome are caused by *Sall4* haploinsufficiency and that *Sall4/Sall1* heterozygotes exhibited an increased incidence of anorectal and heart anomalies, exencephaly and kidney agenesis. *Sall4* and *Sall1* formed heterodimers, and a truncated *Sall1* caused mislocalization of *Sall4* in the heterochromatin; thus, some symptoms of Townes-Brocks syndrome caused by *SALL1* truncations could result from *SALL4* inhibition.

KEY WORDS: *Sall4*, *spalt*, Embryonic stem cells, Okihiro syndrome, Townes-Brocks syndrome, Organogenesis, Mouse

INTRODUCTION

Early differentiation of the mammalian embryo leads to the development of two distinct lineages – the inner cell mass (ICM) and the trophectoderm. Cells of the ICM are pluripotent and give rise to the epiblast and eventually to all the fetal tissues, while trophectoderm cells have restricted potential and give rise to the trophoblast cell layers of the placenta. Embryonic stem (ES) cells are established from the ICM and have the potential to generate chimeric mice when introduced into a blastocyst. When cultured in vitro, ES cells differentiate into a variety of cell lineages; thus, human ES cells are possible candidates for cell therapies, although there are some ethical issues to overcome. Maintenance of mouse ES cell pluripotency requires constant suppression of their differentiation by both extrinsic and intrinsic factors. Leukemia inhibitory factor (LIF) and bone morphogenetic protein 4 (BMP4) are the two major extrinsic signals (Niwa et al., 1998; Matsuda et al., 1999; Ying et al., 2003). LIF induces phosphorylation and nuclear localization of STAT3, a transcription factor essential for the LIF-dependent pathway for self-renewal. BMP4 induces phosphorylation and nuclear localization of Smad1, and the subsequent upregulation of Id helix-loop-helix proteins that block neural differentiation and maintain the pluripotency of ES cells in

the presence of the LIF signal. Intrinsic factors include *Oct3/4*, *Nanog* and *Eras*. *Oct3/4* and *Nanog* are expressed at high levels in ES cells and have been shown to be essential for maintaining pluripotency in ES cells (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003; Nichols et al., 1998). *Eras* and *Utf1* are also expressed abundantly in ES cells, and they play crucial roles in the proliferation of stem cells (Takahashi et al., 2003; Nishimoto et al., 2005).

The *spalt* (*sal*) gene was first isolated from *Drosophila* and it encodes a protein characterized by multiple double zinc-finger motifs of the C2H2 type. *sal* acts as a region-specific homeotic gene, and is required for the specification of the head and tail regions during early development (Jurgens, 1988; Kuhnlein et al., 1994). During the later stages of development, *sal* regulates pattern formation and cell fate decisions in the wing disc (de Celis et al., 1996; Nellen et al., 1996), trachea (Kuhnlein and Schuh, 1996) and sensory organ development (de Celis et al., 1999). *sal* is expressed at the anteroposterior boundary of the wing imaginal discs, and its expression is controlled by the *dpp* (decapentaplegic) gene (de Celis et al., 1996; Nellen et al., 1996).

Humans and mice each have four known *Sal*-related genes (known as *SALL1-SALL4* in humans and *Sall1-Sall4* in mice). Mutations in *SALL1* on chromosome 16q12.1 have been associated with Townes-Brocks syndrome, an autosomal dominant disease characterized by dysplastic ears, a preaxial polydactyly, imperforate anus and, less commonly, kidney and heart anomalies (Kohlhase et al., 1998). Mice deficient in *Sall1* show kidney agenesis or severe dysgenesis, but other phenotypes observed in the human disease are not apparent (Nishinakamura et al., 2001). This discrepancy could be explained by the formation of truncated *SALL1* proteins as a result of mutations in *SALL1*, as comparison with *Sall1*-null mice showed that mutant mice producing a truncated *Sall1* protein exhibited more severe defects, including renal agenesis, exencephaly, as well as limb and anal deformities (Kiefer et al., 2003). It has been reported that *Sall1* also functions as a

¹Division of Integrative Cell Biology, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, Kumamoto 860-0811, Japan. ²Division of Stem Cell Regulation, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan. ³Graduate School of Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8654, Japan. ⁴Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Tokyo 153-8904, Japan. ⁵Laboratory of Gene Expression and Regulation, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan. ⁶PRESTO, JST, Saitama 332-0012, Japan.

*These authors contributed equally to this work

†Author for correspondence (e-mail: ruyichi@kaiju.medic.kumamoto-u.ac.jp)

transcriptional repressor by localizing in the heterochromatin and interacting with components of chromatin remodeling complexes such as histone deacetylase (HDAC)1, HDAC2, retinoblastoma-associated protein 46/48 (RbAp46/48), metastasis-associated protein (MTA)1 and MTA2 (Kiefer et al., 2002).

It is still unclear if *SALL2* is associated with human disease; however, it has been reported that *Sall2* functions as a tumor suppressor (Li et al., 2001; Li et al., 2004). *Sall2*-deficient mice show no apparent phenotype, and mice lacking both *Sall1* and *Sall2* show kidney phenotypes comparable with those of *Sall1* knockout mice (Sato et al., 2003). Although no diseases are thus far directly linked to *SALL3*, this gene is located in a region that is commonly deleted in cases of 18q deletion syndrome (Kohlhase et al., 1999). Individuals with this deletion exhibit hearing loss, cardiac problems, mental retardation, midfacial hypoplasia, delayed growth and limb abnormalities (Strathdee et al., 1997). *Sall3*-null mice die on the first postnatal day and deficiencies in the cranial nerves and abnormalities in the oral structures are present (Parrish et al., 2004). Mutations in *SALL4* cause an autosomal dominant disorder known as Okinohiro syndrome, which is characterized by limb deformity, eye movement deficits and, less commonly, anorectal, ear, heart and kidney anomalies (Al-Baradie et al., 2002; Kohlhase et al., 2002).

To investigate the roles of *Sall* family genes and their functional redundancy in organogenesis, we generated *Sall4*-deficient mice. In this study, we report that the mouse *Sall4* gene was found to be unexpectedly essential for early embryogenesis, and for the proliferation of ES cells. We further reveal the importance of the heterodimerization of *Sall4* and *Sall1* in vivo, which could explain the underlying genetic mechanisms involved in Townes-Brocks syndrome that is caused by truncations of *SALL1*.

MATERIALS AND METHODS

Generation of *Sall4*-deficient mice (*Sall4*-del)

A *Sall4*-targeting vector was constructed by incorporating the 5' *Aor5* *HindIII*-*EcoRI* 8.2-kb *Sall4* fragment and the 3' *BamHI*-*EcoRV* 2.3 kb fragment into a vector that contained the β -galactosidase gene (*lacZ*), the neomycin resistance (*Neo*^r) gene (pGK-*Neo*) and the diphtheria toxin A subunit

(pMC1DTA) in tandem. This construct deletes all the eight zinc-finger domains of *Sall4* and β -galactosidase (Fig. 1A). This strategy is identical to the one we used to delete *Sall1* (Nishinakamura et al., 2001). Five out of 114 G418-resistant E14.1 ES clones were correctly targeted and two were used to generate germline chimeras that were bred with C57BL/6J females. E14.1 ES cells were maintained on mitomycin C-treated primary embryonic fibroblasts in the presence of LIF (10^3 U/ml) and serum in all the procedures and experiments described in this paper. The primer sequences used for genotyping were as follows: 5'-GAGGACTCCATACCGGTGAA-3', 5'-GTGCCAGCTTCTTCAAGTC-3' and 5'-CCTCTTCGCTATTACGCCAG-3' (the length of the amplified segment was 272 bp in the wild-type allele and 379 bp in the mutated allele). As the *Sall4*-deficient mice (*Sall4*-del) lacked proper *lacZ* expression, we also generated mice using the *Sall4*-*IRES*- β -*geo* vector described below.

Targeted disruption of both alleles of *Sall4*

The *Sall4*-*IRES*- β -*geo* vector was constructed by incorporating the 5' *PacI*-*EcoRI* 4.2 kb fragment, the *EcoRI*-*Sall1* 6.0 kb *IRES*- β -*geo* fragment and the 3' *ApaLI*-*EcoRV* 6.0 kb fragment into a vector that contained pMC1DTA (see Fig. S1 in the supplementary material). The *Sall4*-*IRES*-*Hyg* vector was generated by a similar method. These vectors confer drug resistance only when they are incorporated into the promoter regions of genes that are expressed in ES cells, including *Sall4* (thus facilitating the isolation of homologous recombinants). Indeed, when tested in wild-type ES cells, homologous recombinants were obtained at a frequency of 68.8% (11/16) by using the *Sall4*-*IRES*- β -*geo* vector and at 66.7% (8/12) with the *Sall4*-*IRES*-*Hyg* vector. The *Sall4*-*IRES*- β -*geo* clones were used to generate another strain of mice (*Sall4*- β -*geo*) for monitoring *Sall4* expression, as shown in Fig. 4D,E. This strain showed phenotypes identical to the original *Sall4*-deficient mice (*Sall4*-del).

Generation of a *Sall4* floxed allele

The *Sall4*-floxed vector was constructed by incorporating the 5' *HindIII*-*HindIII* 3.5 kb fragment, the *HindIII*-*ApaLI* 4.7 kb fragment and the 3' *ApaLI*-*EcoRV* 6.0 kb fragment into a vector that contained pGK-*Neo* flanked by *Frt* and *loxP* sequences and pMC1DTA (see Fig. S1 in the supplementary material). *LoxP* sequences were placed so that exon 2 and 3 were excised upon Cre treatment, resulting in disruption of all zinc-finger motifs. Five out of 170 clones were correctly targeted (floxed/+) and one of them was further transfected with the *Sall4*-*IRES*-*Hyg* vector. Both resulting

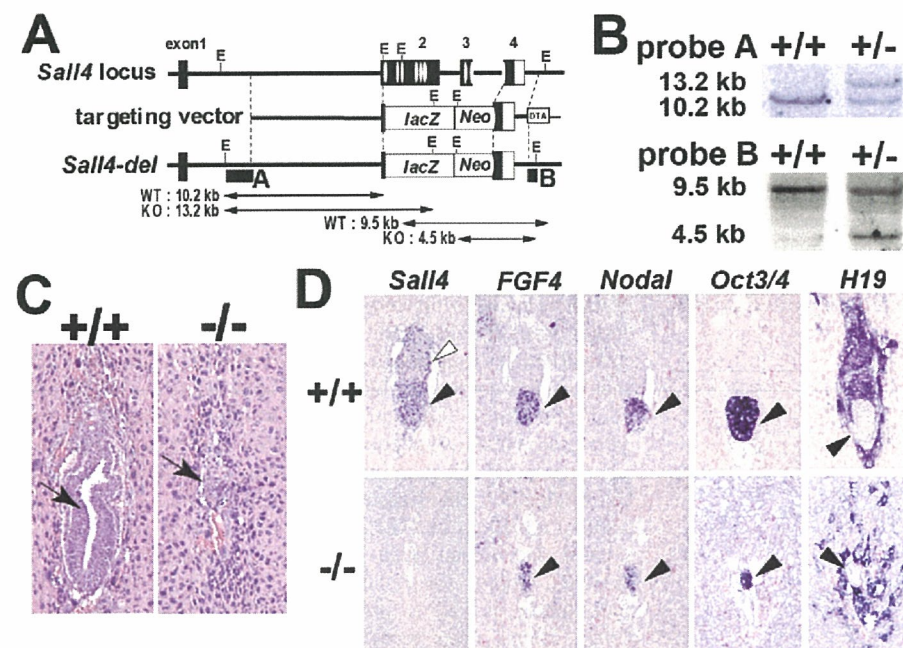


Fig. 1. Embryonic lethality of *Sall4*-deficient mice. (A) Targeting strategy of *Sall4*. Ovals represent the zinc-finger domains. E, *EcoRI*. (B) Southern blot analysis using the probes described in Fig. 1A. (C) Hematoxylin and Eosin staining of wild-type (+/+) and *Sall4*-deficient (-/-) embryos at E6.5. Arrow indicates epiblast. (D) In situ hybridization of *Sall4*, epiblast markers (*Fgf4*, *Nodal* and *Oct3/4*), and a marker for trophoblast and extra-embryonic ectoderm (*H19*) in wild-type (+/+) and *Sall4*-deficient (-/-) embryos at E5.8. *H19* signal is absent in the epiblast of both +/+ and -/- embryos. Black arrowhead, epiblast; white arrowhead, extra-embryonic ectoderm. Serial sections from two wild-type and two *Sall4*-deficient embryos are shown. Left three columns and right two columns are from different embryos.

clones, flox⁻ and +/-, proliferated normally. Neo^r placed in intron 2 did not affect Sall4 expression as shown in Fig. 3C. These ES cells were infected with adenovirus expressing Cre under the CAG promoter (AxCANCre provided by RIKEN Bioresource Center) (Niwa et al., 1991; Kim et al., 2002) at a m.o.i (multiplicity of infection) of 50. After incubation for 1 hour, cells were diluted and plated onto 6-well plates coated with mitomycin C-treated embryonic fibroblasts.

Histology and blastocyst culture

Histological examination was performed as described earlier (Nishinakamura et al., 2001). In situ hybridization was performed using the AmpMap Kit and an automated Discovery System (Ventana) according to the manufacturer's protocols. Blastocyst culture and immunosurgery were also performed as described earlier (Nichols et al., 1998). cDNA was synthesized using SuperScript III CellsDirect cDNA Synthesis System (Invitrogen). Primer sequences used for RT-PCR are available upon request. 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) labeling and detection kit I (Roche) was used to examine proliferation of the blastocysts upon 30 minutes of BrdU incorporation.

Chimera formation

Two independent Sall4-deficient clones were transfected with pCAG-GFP-IRES-puro and selected on puromycin-resistant embryonic fibroblasts (Tucker et al., 1997). Cells retaining ubiquitous green fluorescent protein (GFP) expression from each Sall4-deficient clone were injected into blastocysts, and consistent results were obtained. Frozen sections of the chimeras were stained by an anti-GFP antibody (Molecular Probes) and detected using ImmunoPure metal enhanced DAB substrate kit (Pierce).

Proliferation and rescue analysis of ES cells

For the proliferation assay, 1×10⁴ cells were plated per well in 24-well plates in triplicate on mitomycin C-treated primary embryonic fibroblasts in media containing LIF and serum, and passaged at the same density every 4 days for 16 days to determine the cumulative cell number. A BrdU Flow Kit (BD Biosciences) was used for cell cycle analysis of ES cells after 2 hour incorporation of BrdU. For rescue analysis, the Sall4 expression vector (Sall4 in pCAG-IRES-puro) or GFP expression vector (negative control) was introduced into Sall4-deficient cells by electroporation. Multiple clones were selected on puromycin-resistant embryonic fibroblasts and expanded.

siRNA transfection

The siRNA duplexes were designed to target the coding region of mouse Sall4 cDNA at nucleotide 2761-2785 and synthesized by Invitrogen. Sall4-siRNA or control siRNA containing the same GC content was transfected into D3 embryonic stem cells using Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction, except for the maintenance of D3 cells, which were cultured on gelatin-coated plates in the presence of LIF. D3 cells at a density of 1×10⁴ cells per well in 24-well plates were transfected in triplicate with 25 pmol siRNA, and counted every day. The negative control siRNA showed no growth or morphological impairment compared with the mock-transfected or the non-transfected cells.

Immunocytochemistry and confocal microscopy

The anti-Sall1 monoclonal antibody (Sato et al., 2004) and an anti-Sall4 polyclonal antibody raised against polypeptide (MAKHQFPHFLEENKI) corresponding to amino acids 1050-1064 were used. A monoclonal anti-Sall4 antibody was generated using Sall4 cDNA encoding amino acids 95-216. The following additional antibodies were used for staining blastocysts and ES cells: monoclonal anti-Oct3/4 (Santa Cruz), rabbit antisera against Oct3/4 (Niwa et al., 2005) and monoclonal anti-Cdx2 (BioGenex). GFP-fused Sall4 and Sall1 zinc-finger mutants in which the cysteine residues were replaced by glycine were produced using PCR. NIH 3T3 cells were plated onto six-well plates at a density of 1×10⁵ cells per well 1 day prior to transfection. The cells were transfected with 3 μg of the plasmids using FuGENE 6 (Roche) and cultured for 48 hours prior to analysis by confocal microscopy. Construction of Sall1-GFP and Sall1¹⁻⁴³⁵-DsRed, immunoprecipitation, immunocytochemistry and confocal microscopy were performed as described previously (Sato et al., 2004).

RESULTS

Sall4-deficient mice die shortly after implantation

Fig. 1A,B depict the strategy used to delete all the eight zinc-finger domains of Sall4. As Sall4-null mice did not survive beyond embryonic day (E) 6.5 (Table 1), the embryos were examined at E5.5-6.5 (Fig. 1C,D). Although wild-type embryos developed an egg cylinder with a central proamniotic cavity, seven out of the 26 embryos (26.9%) derived from the heterozygous intercross barely retained a structure that resembled the epiblast. These embryos were identified as Sall4-null by in situ hybridization, while Sall4 expression was observed in the epiblast, and less abundantly in visceral endoderm and extra-embryonic ectoderm in the wild-type embryos (Fig. 1D). Though the areas occupied by the epiblast markers (Oct3/4, Fgf4 and Nodal), the trophoctoderm and extra-embryonic ectoderm marker (H19), and the extra-embryonic ectoderm marker (Bmp4) were significantly reduced, they were still present in Sall4-null embryos (Fig. 1D and data not shown). These data demonstrate that Sall4 is essential for embryonic development during the peri-implantation period, but not for commitment to the epiblast or extra-embryonic lineages.

Sall4 is required for inner cell mass proliferation in blastocysts in vitro

As the drastic impairment of Sall4^{-/-} embryos hindered further examination, blastocysts from Sall4^{+/-} intercrosses (E3.5) were examined. At this stage, the Sall4 protein was expressed both in the inner cell mass (ICM) and trophoctoderm in the wild-type (Fig. 2A). Homozygotes were, however, indistinguishable from wild-type or heterozygotes, and expression of Oct3/4 (ICM marker) and Cdx2 (trophoctoderm marker) was not altered (Fig. 2A), indicating that lineage commitment between these two lineages occurs normally. Next, cultured blastocysts were investigated for phenotypic changes. The embryos hatched from their zonae and attached to the plates, and the trophoctoderm grew in an identical manner. By day 5 in culture, all homozygotes (n=14) showed significantly reduced outgrowth of ICM compared with wild-type and heterozygote (n=43) (Fig. 2B). At day 3 of culture, when the phenotype was becoming apparent, Sall4-deficient ICM was positive for Oct3/4, as determined by immunostaining (Fig. 2B), and expression of the lineage markers examined by RT-PCR was not impaired: Oct3/4 (ICM), Gata6 and Gata4 (primitive endoderm), eomesodermin and H19 (trophoctoderm) (Fig. 2C). These results suggest that lineage commitment does occur in the absence of Sall4. By contrast, at day 3 of culture, BrdU incorporation was significantly reduced in Sall4-deficient ICM when compared with wild type or heterozygote, while an apparent increase in apoptosis, as determined by TUNEL assay, was not detectable (Fig. 2D; data not shown), indicating that Sall4 is required for ICM proliferation. Next, the trophoctoderm was removed by immunosurgery to rule out secondary effects of trophoctoderm abnormality. Of 54 ICMs, 41 (76%) grew into a spheroid structure with a primitive endoderm surrounding it, and all

Table 1. Genotyping of heterozygous crosses

Stage	+/+	+/-	-/-	n.d.	Total
E3.5	10	16	8	2	36
E6.5-7.5	7	16	0	5	28
E8.5-10.5	5	10	0	9	24
E11.5-13.5	10	14	0	3	27
E14.5-15.5	10	12	0	4	26
PO	80	86	0	0	166

n.d., not determined. Only implantation sites were detected.