

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02826

研究課題名(和文) 単一細胞解析を用いた成体腎細胞分化機構の解明とヒトiPS細胞からの選択的分化誘導

研究課題名(英文) Selective differentiation of adult renal cell types from human iPS cells using single cell analyses of the differentiation mechanisms

研究代表者

長船 健二 (Osafune, Kenji)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：80502947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトiPS細胞由来の胎生期腎前駆細胞であるネフロン前駆細胞と尿管芽細胞から糸球体と尿細管を含むネフロン様組織と集合管様組織への各分化系において、シングルセル遺伝子発現解析と主要なシグナル経路を網羅する成長因子と低分子化合物のスクリーニングを実施した。そして、腎前駆細胞から糸球体、尿細管、集合管を形成する成体腎構成細胞への分化機序の解明を行い、その情報をもとにヒトiPS細胞から成体腎細胞の選択的分化誘導法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、ヒトの成体腎細胞の分化機構が解明され、発生生物学の進展に寄与する。また、ヒトiPS細胞から糸球体、尿細管、集合管などの成体腎細胞を選択的に作製する方法を開発することにより、腎疾患に対する再生医療、腎疾患モデル作製と創薬、薬剤の腎毒性評価系の開発などに貢献する。そして、根治的治療法の少ない腎疾患に対する新規治療法が開発され、患者さんのQOL向上と新規医療技術の開発により我が国の医薬品・医療産業界の発展に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the differentiation mechanisms of adult renal cell types, such as the epithelial cells constituting glomeruli, renal tubules and collecting ducts, by single cell RNA sequencing analyses on the in vitro differentiation culture systems from human iPS cell-derived nephron progenitor cells and ureteric bud cells into nephron and collecting duct organoids, respectively. In addition, we performed an unbiased screening of growth factors and chemical compounds to find the factors that regulate the selective differentiation into the adult renal cell types in the organoid culture systems. Based on the findings obtained from these two analyses, we developed the directed differentiation methods from human iPS cells into the adult renal cell types, which will contribute to the development of iPS cell-based regenerative therapies, disease modeling, drug discovery and toxicology screening for kidney diseases.

研究分野：再生医学

キーワード：ヒトiPS細胞 単一細胞解析 分化機構 分化誘導 腎臓

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、マウスなどの実験動物を用いた発生生物学の進展により、腎臓発生機構の解明が進んでいる。哺乳類の腎臓は、胎生組織である中間中胚葉に由来する後腎間葉と尿管芽の2つの腎前駆組織の相互作用で発生し、後腎間葉はネフロンと間質に尿管芽は集合管から膀胱の一部までの下部尿路に分化する。申請者は、新規の培養系を開発することによって、マウス胎仔後腎間葉の中に糸球体上皮や複数種の尿細管上皮を派生させるネフロン前駆細胞を初めて同定した(Osafune K, 2006)。そのネフロン前駆細胞を細胞塊とし上皮化刺激を与えることにより、内部に3次元の糸球体や尿細管構造を形成するが、ネフロン前駆細胞から糸球体足細胞、近位から遠位までの尿細管上皮へ運命決定する分子機構の多くは不明のままである。また、尿管芽から集合管と下部尿路上皮への分化機構も未解明である。さらに、上述の知見は、マウスなどの実験動物から得られたものであり、ヒトにおける腎前駆細胞から成体腎細胞への分化機序の詳細は全く不明である。

一方、近年、無限の増殖能と腎臓を含む全身の臓器の細胞種に分化可能なヒト iPS 細胞(人工多能性幹細胞)から様々な細胞種を分化誘導する研究が盛んに行われている。他の臓器と比較し遅れを取っていたが、腎臓再生研究も近年著しく進捗し、ヒト iPS 細胞から中間中胚葉を経て分化誘導したネフロン前駆細胞を細胞塊にすることによって、糸球体や尿細管を含むネフロン様組織を作製した報告がいくつか存在する (Taguchi A, 2014; Takasato M, 2015; Morizane R, 2015)。申請者も独自の2次元培養法を開発し、80%以上の高効率にてヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞を分化誘導し、その細胞塊の培養によって糸球体や尿細管を含むネフロン様組織(腎臓オルガノイド)の作製に成功した(Tsujimoto H, 2020; WO 2018/216743)。また、独自の分化誘導法を開発し、ヒト iPS 細胞から尿管芽組織の分化誘導にも成功している(Mae SI, 2018, 2020; 特許出願済)。しかし、ネフロン前駆細胞や尿管芽などの腎前駆細胞から糸球体、尿細管、集合管などの成体腎構成細胞への運命決定機序がほぼ未解明であることより、ヒト iPS 細胞からそれらの成体腎細胞を選択的に作製することは可能となっていない。

2. 研究の目的

本研究ではヒト iPS 細胞から腎前駆細胞を経た腎組織への分化系におけるシングルセル RNA-sequencing と成長因子・低分子化合物の網羅的スクリーニングを組み合わせ、未解明である成体腎構成細胞の分化機構を特にヒトにおいて解明する。そして、その情報をもとにヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞や尿管芽を経て選択的に成体腎細胞を分化誘導する方法を開発し、作製された細胞の機能を明らかにすることを目的とする。

また、本研究の成果をもとに、ヒト iPS 細胞から作製される成体腎構成細胞を用いて先天性ネフローゼ症候群や多発性嚢胞腎などの遺伝性腎疾患に対する疾患モデルを作製し、病態解析や治療薬開発を行う研究や organ-on-a-chip を用いた薬剤腎毒性評価系を構築する研究などへの発展を目指す。

3. 研究の方法

(1) シングルセル遺伝子発現解析による成体腎構成細胞の分化機構の探索

ヒト iPS 細胞由来ネフロン前駆細胞を細胞塊とし、器官培養の系で8日間培養すると内部に PODXL(+)糸球体、*Lotus tetragonolobus lectin* (LTL) (+)近位尿細管、BRN1(+)/ヘンレのループ、CDH1(+)/遠位尿細管様の構造が形成される。8日間のうち組織学的に大きく形態が変化する時点

のサンプルを回収し、シングルセル RNA-sequencing によって分化の遷移状態における遺伝子発現変化をリアルタイムに近い解像度で観察する。そして、細胞分化の分岐点と細胞分化を制御するシグナル経路を探索する。また、ヒト iPS 細胞由来の尿管芽組織の培養を続けると AQP2(+)集合管主細胞と p63(+)集合管介在細胞が出現する。その途中時点のサンプルを回収し、同様にシングルセル RNA-sequencing を行い、シグナル経路を探索する。

(2) 成長因子・低分子化合物のスクリーニングによる成体腎構成細胞の分化機構の探索

当研究室および京都大学 iPS 細胞研究所創薬技術開発室が保有する主要なシグナル経路の活性化剤または阻害剤である成長因子と低分子化合物のヒト iPS 細胞から腎組織の形成に対する影響を検証する。ヒト iPS 細胞由来ネフロン前駆細胞塊からネフロン様組織への分化系とヒト iPS 細胞由来尿管芽組織から集合管組織への分化系において、分化の途上に成長因子や化合物を添加し、腎構成細胞の分化に対する影響を検証する。

(3) ヒト iPS 細胞から成体腎構成細胞への選択的分化誘導法の開発

(1)、(2)の結果をもとに、成体腎構成細胞の細胞運命を制御する分化誘導系を確立する。分化誘導された各腎細胞種のマーカー遺伝子発現、生理機能(糸球体足細胞; angiotensin II に対する収縮反応, 近位尿細管; アルブミン取り込み, PTH に対する反応, 集合管細胞; vasopressin に対する反応など)を検証する。さらに、ヒト腎組織由来のそれらの細胞種との遺伝子および蛋白質発現などの比較解析を行う。

4. 研究成果

(1) シングルセル遺伝子発現解析および成長因子・低分子化合物のスクリーニングによる成体腎構成細胞の分化機構の探索

ヒト iPS 細胞由来ネフロン前駆細胞から糸球体と尿細管を含むネフロン様組織への分化系とヒト iPS 細胞由来尿管芽組織から集合管様組織への分化系の両方でシングルセル RNA-sequencing を実施し、発現変動する遺伝子群の同定と分化過程における途中段階の細胞分画を決定、さらに、細胞分化の分岐点と細胞分化を制御する転写因子群、新規の細胞系譜マーカー遺伝子候補などの抽出を行った(Tsujimoto H, 2020; Mae SI, 2020)。また、ヒト iPS 細胞由来のネフロン前駆細胞からネフロン様組織への分化系において、低分子化合物を添加するスクリーニングを実施し、特定の成体腎構成細胞種を選択的に誘導する約 5 種類の化合物を同定し、その再現性と有効性を確認した。また、それらを用いた分化に関するシグナル経路の解析を実施した(Araoka T, 未発表)。

(2) ヒト iPS 細胞から成体腎構成細胞への選択的分化誘導法の開発

ヒト iPS 細胞由来ネフロン前駆細胞からネフロン様組織への分化過程におけるスクリーニングによって同定されたヒット化合物の組み合わせや処理濃度、処理期間の最適化を完了し、ヒト iPS 細胞から選択的に糸球体組織を作製する分化誘導系を開発した (Araoka T, 未発表)。また、ヒト iPS 細胞由来尿管芽組織から集合管様組織への分化過程におけるシングルセル RNA-sequencing の結果をもとに、増殖因子と化合物の組み合わせ処理にて、ヒト iPS 細胞から選択的に成熟集合管細胞を分化誘導する方法を確立した(Ryosaka M. 投稿準備中; 出願準備中)。現在、作製されたヒト iPS 細胞由来の糸球体と集合管細胞のマーカー遺伝子発現、生理機能などの検証を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計46件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Osafune K	4. 巻 -
2. 論文標題 iPSC technology-based regenerative medicine for kidney diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02030-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 長船健二	4. 巻 109(12)
2. 論文標題 iPS細胞を用いた腎疾患に対する再生医療の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本内科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 2553-2561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 長船健二	4. 巻 -
2. 論文標題 個別に分化させた複数種の細胞を組み合わせて、腎臓オルガノイドをつくる	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ニュートン別冊 最新ES細胞iPS細胞	6. 最初と最後の頁 158-159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mae SI, Ryosaka M, Sakamoto S, Matsuse K, Nozaki A, Igami M, Kabai R, Watanabe A, Osafune K.	4. 巻 32(4)
2. 論文標題 Expansion of Human iPSC-Derived Ureteric Bud Organoids with Repeated Branching Potential	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107963	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsujimoto H, Kasahara T, Sueta SI, Araoka T, Sakamoto S, Okada C, Mae SI, Nakajima T, Okamoto N, Taura D, Nasu M, Shimizu T, Ryosaka M, Li Z, Sone M, Ikeya M, Watanabe A, Osafune K.	4. 巻 31(1)
2. 論文標題 A Modular Differentiation System Maps Multiple Human Kidney Lineages from Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.03.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計52件 (うち招待講演 26件 / うち国際学会 12件)

1. 発表者名 長船健二
2. 発表標題 尿細管再生の最新知見とiPS細胞による治療の可能性
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長船健二
2. 発表標題 iPS細胞を用いた腎疾患に対する再生医療開発と創薬の取り組み
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenji Osafune
2. 発表標題 iPS cells and renal pharmacological target
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

〔出願〕 計8件

産業財産権の名称 尿管芽先端部細胞の単離方法	発明者 長船健二、前伸一、 兩坂誠	権利者 国立大学法人京 都大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/037329	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 ネフロン前駆細胞の製造方法	発明者 前伸一、長船健二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-080272	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>研究活動</p> <p>https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/osafune_summary.html 京都大学大学院医学研究科応用再生医学研究 分野紹介 http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral_course/r-179/ Expansion of Human iPSC-Derived Ureteric Bud Organoids with Repeated Branching Potential http://hdl.handle.net/2433/253549 A Modular Differentiation System Maps Multiple Human Kidney Lineages from Pluripotent Stem Cells http://hdl.handle.net/2433/250216 腎臓オルガノイド技術を用いた遺伝性腎疾患の新たな病態モデルの開発 https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/200805-150000.html 腎集合管のもとになる組織を大量に作製することに成功 http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2020/200729_2.html 腎集合管のもとになる組織を大量に作製することに成功 https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/200729-000000.html ヒトiPS細胞から別個に分化させた複数の腎前駆細胞から腎組織を再生することに成功 http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2020/200408_1.html ヒトiPS細胞から別個に分化させた複数の腎前駆細胞から腎組織を再生する https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/200408-010000.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	渡辺 亮 (Watanabe Akira) (60506765)	京都大学・医学研究科・特定准教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------