

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間：2021～2025
課題番号：21H05050
研究課題名：間質前駆細胞誘導に基づくヒト腎臓高次構造の再構築
研究代表者氏名（ローマ字）：西中村 隆一（NISHINAKAMURA Ryuichi）
所属研究機関・部局・職：熊本大学・発生医学研究所・教授
研究者番号：70291309

研究の概要：

腎臓は、ネフロン前駆細胞、尿管芽、間質前駆細胞という3つの前駆組織の相互作用によって形成される。本研究では、多能性幹細胞から間質前駆細胞の誘導法を開発し、ネフロン前駆細胞及び尿管芽と組み合わせることによって、分岐構造の周囲に機能ユニットが配置された腎臓本来の高次構造を再構築することを目的とする。既にマウスES細胞からは成功しており、今後ヒトで同様な成果を目指す。

研究分野：腎臓内科学、発生生物学

キーワード：腎臓、間質、前駆細胞、ES細胞、iPS細胞、

1. 研究開始当初の背景

腎不全による透析患者数は33万人、医療費は年間1.5兆円に上る一方で、根治的治療法は存在せず腎移植のドナーも圧倒的に不足している。腎臓は、胎児期に存在する3つの前駆細胞、ネフロン前駆細胞、尿管芽、間質前駆細胞から形成される。ネフロン前駆細胞は腎臓の最小機能単位であるネフロン、つまり糸球体や尿管に分化する。一方、尿管芽は尿路の下半分である集合管と尿管に、間質前駆細胞は間質に分化する。我々はこれまでに、マウスES細胞及びヒトiPS細胞からネフロン前駆細胞と尿管芽の試験管内誘導法（腎オルガノイド作製法）を報告してきた（Cell Stem Cell 2014, Cell Stem Cell 2017）。しかし、分岐する集合管の周囲に機能ユニットであるネフロンが接続した腎臓本来の高次構造を作るには、第3の前駆細胞である間質前駆細胞をマウス胎仔から採取して混ぜることが必須であった。よって、多能性幹細胞のみから腎臓の高次構造を作成するには、間質前駆細胞を誘導しなければならない。

2. 研究の目的

本計画では、間質前駆細胞の誘導法を開発し、ネフロン前駆細胞及び尿管芽と組み合わせることによって、分岐する集合管の周囲に機能ユニットであるネフロンが配置された腎臓本来の高次構造を再構築することを目的とする。これに際してマウスとヒトの種差を解明することによって、ヒトでもこれを達成する。

3. 研究の方法

- マウス間質前駆細胞の誘導と全てマウスES細胞由来の腎臓高次構造の作製
CreERマウスを用いた間質細胞の系譜解析や、発生時期を追ったsingle cell RNA シークエンス（scRNA-seq）を行い、各段階で間質系譜に発現するマーカーやシグナル分子を同定する。これらの情報を元に、マウスES細胞からの間質前駆細胞誘導法を開発する。そして、ES細胞由来のネフロン前駆細胞、尿管芽と組み合わせることによって、全てES細胞由来の腎臓高次構造を作製する。
- ヒト間質前駆細胞の誘導とヒトiPS細胞からの腎臓高次構造の作製
次いでヒトiPS細胞からの間質前駆細胞誘導を開発する。海外から発表されているヒト胎児腎臓のscRNA-seqデータ等を参考に、ヒト胎児腎臓の初期発生過程の細胞種と遺伝子発現を明らかにする。そしてヒト特有のマーカーを同定して、それを目標に間質前駆細胞を誘導する。さらに、ヒトiPS細胞由来のネフロン前駆細胞及び尿管芽と混合してヒト腎臓の高次構造を作製する。

4. これまでの成果

- マウス間質前駆細胞の誘導と全てマウスES細胞由来の腎臓高次構造の作製
複数のCreERマウスを用いた細胞系譜解析とscRNA-seq解析によって、腎臓の間質前駆細胞には背側と腹側に位置する2種類があり、そこにFGFとBMPの拮抗する濃度勾配が存在すること、そして背側に位置するFoxd1陽性の前駆細胞から腎臓内間質の大部分が由来することを見出した。さ

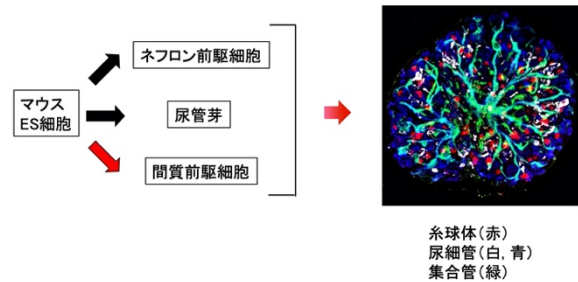
らにこれら間質前駆細胞の起源がネフロン前駆細胞と共通の後方中間中胚葉であり、それがROBO2/PDGFR α 陽性分画としてFACSで単離できることを明らかにした。これらの知見を元に、マウスES細胞から後方中間中胚葉を誘導して単離し、それをFGF high, BMP lowの条件で培養することで、背側間質前駆細胞を誘導する方法を開発した。この間質前駆細胞を、同じくマウスES細胞から誘導したネフロン前駆細胞および尿管芽と組み合わせて培養すると、分岐する集合管の周囲にネフロンが分布する腎臓の高次構造がin vitroで形成された(図)。つまり、完全にマウスES細胞由来の腎臓高次構造を試験管内で構築することに成功した(Tanigawa et al. Nat Commun 2022)。またこれを移植することによって間質前駆細胞から皮質・髄質の間質に加えてメサンギウム細胞やレニン産生細胞など腎臓に特徴的な多様な種類の間質細胞が分化した。この論文はNature社の全雑誌から選ばれるNature Portfolio Selectionにも採択されるとともに、多くの招聘講演や総説依頼に至った。

2. ヒト間質前駆細胞の誘導とヒトiPS細胞からの腎臓高次構造の作製

ヒト間質前駆細胞誘導の問題点は、間質細胞の遺伝子発現に種差が存在することである。マウスと異なり、ヒトFOXD1は間質前駆細胞だけでなくネフロン前駆細胞でも発現する

ため、マーカーとして通用しない。そこでscRNA-seq解析により、ヒト間質前駆細胞に発現する新たなマーカー群を同定した。これらを指標にヒトiPS細胞から間質前駆細胞を誘導している。

間質前駆細胞誘導法を開発し、高次構造を持つマウス腎臓組織をES細胞のみから作製



Tanigawa et al. Nature Communications 2022

5. 今後の計画

1. マウス間質前駆細胞の誘導と全てマウスES細胞由来の腎臓高次構造の作製完了した。

2. ヒト間質前駆細胞の誘導とヒトiPS細胞からの腎臓高次構造の作製

ヒトiPS細胞からの間質前駆細胞誘導法を開発し、同じくiPS細胞由来のネフロン前駆細胞・尿管芽と組み合わせて高次構造を作製する。その検証は組織学的解析とscRNA-seq等で行う。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Ibi Y and [Nishinakamura R.](#) Kidney bioengineering for transplantation. **Transplantation** 2023 On line ahead of print doi: 10.1097/TP.0000000000004526. invited review 査読あり
2. Tanigawa S and [Nishinakamura R.](#) Functional renal collecting ducts from human PSCs. **Cell Stem Cell** 29:1510-1512, 2022. doi: 10.1016/j.stem.2022.10.006. invited review 査読なし
3. Tanigawa S, Tanaka E, Miike K, Ohmori T, Inoue D, Cai CL, Taguchi A, Kobayashi A, [Nishinakamura R.](#) Generation of the organotypic kidney structure by integrating pluripotent stem cell-derived renal stroma. **Nat Commun**, 13:611, 2022. 査読あり Nature Portfolio Collection にも採択

7. ホームページ等

熊本大学発生医学研究所 腎臓発生分野

和文ホームページ https://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/kidney_development/

英文ホームページ https://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/en/bunya_top/kidney_development/