

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461231

研究課題名(和文) ヒトES・iPS細胞から腎尿管細胞への分化誘導技術の確立および医薬応用

研究課題名(英文) Generation of kidney tubular cells from human pluripotent stem cells

研究代表者

本間 康一郎 (Homma, Koichiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：10383762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：3日間GSK3 阻害剤を用いて、hPSCを中胚葉細胞に分化させ、次に、これらの細胞を腎上皮増殖培地で培養し、KSP+細胞を誘導した。抗KSP抗体によるフローサイトメトリーによりKSP+細胞を純化すると、それらの細胞は腎尿管細胞のあらゆるセグメントの特徴を示し、またKSP+細胞を3Dマトリゲルで培養するとin vitroで尿管オルガノイドを形成した。KSP+細胞による尿管オルガノイドの形成は機能的な腎尿管の獲得を誘導した。また、KSP+細胞は、マウス胚性腎臓細胞とともに培養すると、3D尿管構造内で自己組み立てを行うので、ヒトとマウスのキメラ腎臓培養物の作製が可能であった。

研究成果の概要(英文)：We report a simple two-step differentiation protocol to generate kidney tubular organoids from hPSCs with direct purification of KSP (kidney specific protein)-positive cells using anti-KSP antibody.

We first differentiated hPSCs into mesoderm cells using a glycogen synthase kinase-3 inhibitor for 3 days, then cultured cells in renal epithelial growth medium to induce KSP+ cells. We purified KSP+ cells using flow cytometry with anti-KSP antibody, which exhibited characteristics of all segments of kidney tubular cells and cultured KSP+ cells in 3D Matrigel, which formed tubular organoids in vitro. The formation of tubular organoids by KSP+ cells induced the acquisition of functional kidney tubules. KSP+ cells also allowed for the generation of chimeric kidney cultures in which human cells self-assembled into 3D tubular structures in combination with mouse embryonic kidney cells.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ヒトES細胞 尿管上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト多能性幹細胞から腎尿管細胞への分化誘導および純化について十分な検討がされていない。

2. 研究の目的

ヒト多機能幹細胞から腎尿管細胞への分化誘導および純化を行い、医薬応用へ展開する。

3. 研究の方法

(1) ヒト多能性幹細胞から KSP 陽性細胞への分化誘導法を確立する。

腎尿管上皮細胞に特異的に発現しているタンパクである kidney-specific protein(KSP)に着目し、KSP 陽性細胞へ分化誘導するプロトコルを検討した。私たちは以前に、ヒト多能性幹細胞より内皮細胞への分化誘導法を報告しており(Homma K et al. Atherosclerosis 2010)、共に中胚葉由来の細胞であるためにこの方法を基盤とし応用することで検討を行った。

(2)KSP 陽性細胞の純化

当教室で独自に開発された抗 KSP 抗体を利用し、未分化のマーカである TRA1-60 陰性かつ KSP 陽性細胞をフローサイトメトリーより分取する。

(3)KSP 陽性細胞の解析

上記(2)で得られた細胞の尿管マーカ発現について qRT-PCR 法で検討を行った。

(4)尿管オルガノイドの形成

上記(2)で得られた細胞の尿管管腔構造を再現するためにマトリゲルおよび NIH3T3-Wnt4 を用いて 3 次元培養を行った。さらに、細胞機能を評価するためにマウス胎児腎由来細胞と共培養する organ culture を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト多能性幹細胞から KSP 陽性細胞への分化誘導

誘導期間が 10 日間の簡単な 2 段階プロトコルを考案した(図 1)。1 段階目として、コラーゲン 1 でコートした dish にヒト ES 細胞 (kh-ES1 株) を播種し、GSK3 阻害薬(WNT activator)入りの培養液で 3 日間培養した。2 段階目として、培養液を renal epithelial growth factor 液に置換し、7 日間(計 10 日)

間)培養した。これにより、Kidney specific protein(KSP)の発現が増加した(図 2)。

(2) KSP 陽性細胞の純化

抗 KSP 抗体を使用し、未分化のマーカである TRA1-60 陰性かつ KSP 陽性細胞をフローサイトメトリーを用いて分取した。分取した細胞は分取前の細胞と比較し KSP の遺伝子発現が増加していることを確認した。

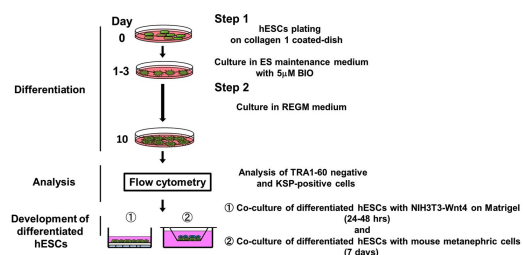
(3) KSP 陽性細胞の解析

(2)で得られた細胞の尿管マーカ発現について qRT-PCR 法で検討を行った。分取前の細胞と比較したところ、MEGALIN, AQP1, AQP2 といった尿管マーカの発現が上昇しているのを確認した(図 3)。さらに、ヒト近位尿管上皮細胞である RPTEC と比較したところ、UROMEDULIN, SLC12A3, AQP2 の発現が増加していた(図 4)。このことから、ヒト多能性幹細胞由来 KSP 陽性細胞は近位尿管、ヘンレループ、遠位尿管、集合管すべてのセグメントの性格を持つ可能性が示唆された。

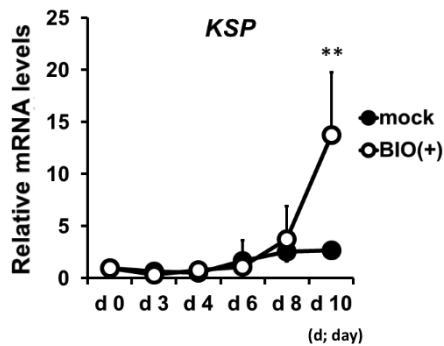
(4) 尿管オルガノイドの形成

マトリゲルおよび NIH3T3-Wnt4 を用いた 3 次元培養では管腔構造が形成された。さらに organ culture においてヒト由来の細胞についてヒトミトコンドリア(hmito)を染色することで識別したところ、尿管腔様の構造内での存在を確認した。その細胞は KSP も陽性であり、管腔内に尿管のマーカである lotus tetragonolobus lectin (LTL)を認めることより、ヒト多能性幹細胞由来 KSP 陽性細胞が尿管の形態や機能にコミットしている細胞であることが明らかになった(図 5, scale bar 20 μm)。今後の医薬応用への展開が期待される。

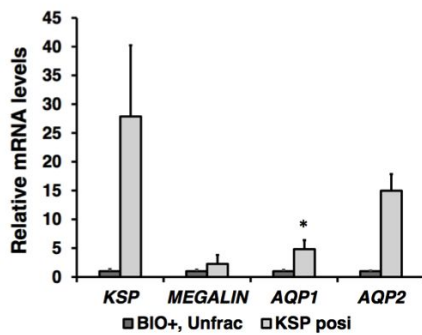
【図 1】



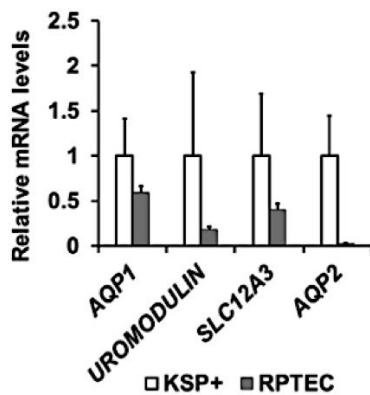
【図 2】



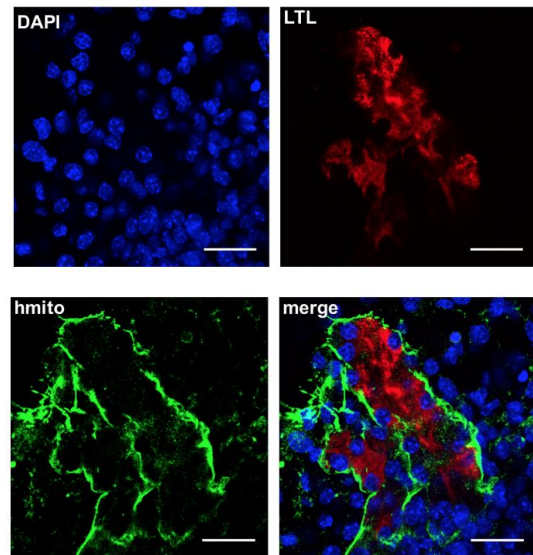
【図 3】



【図 4】



【図 5】



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamaguchi S, Morizane R, Homma K, Monkawa T, Suzuki S, Fujii S, Koda M, Hiratsuka K, Yamashita M, Yoshida T, Wakino S, Hayashi K, Sasaki J, Hori S, Itoh H. Generation of kidney tubular organoids from human pluripotent stem cells. Sci Rep. 2016 Dec 16;6:38353.

corresponding author

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 康一郎 (HOMMA Koichiro)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10383762

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

山口 慎太郎 (YAMAGUCHI Shintaro)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：50464855