

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08703

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞に由来する尿管芽オルガノイドの拡大培養法の開発

研究課題名(英文) Expansion of human iPS cell-derived ureteric bud organoids

研究代表者

前 伸一 (Mae, Shin-Ichi)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：50749801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、胎生期の腎前駆組織である尿管芽をヒトiPS細胞(人工多能性幹細胞)から選択的に作製する方法を開発し、幾度も繰り返される分枝形態形成を行うことにも成功している。本研究では、分枝形態形成における組織幹細胞である尿管芽先端部(tip)細胞を選択的に誘導し、拡大培養する方法を開発した。そして、拡大培養した尿管芽tip細胞から大量の尿管芽オルガノイドを再生する方法を確立した。また、拡大培養にはNFκBシグナルが重要であり、拡大培養によって腎発生分化段階が進むことも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのところ、尿管芽の分枝形態形成における組織幹細胞である尿管芽tip細胞を選択的に拡大培養し、大量の尿管芽オルガノイドを作製する方法は確立されていない。したがって、本研究の成果は新規性および進歩性に優れている。さらに、拡大培養によって発生分化段階が進んだ腎組織を作製可能になることで、腎臓発生機序の解明が進展し、iPS細胞を用いた先天性腎尿路異常の病態解明に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We previously established the induction method for branching ureteric bud, one of the renal progenitors, from human induced pluripotent stem cells. In the current study, we have developed a novel expansion culture method for ureteric bud tip cells while maintaining the reconstitution ability of ureteric bud organoids. Moreover, we have clarified that NFκB pathway is crucial for the proliferation of ureteric bud tip cells and found that the long-term expansion culture advances the renal developmental stage to the late branching phase.

研究分野：再生医学

キーワード：iPS細胞 尿管芽 腎臓 拡大培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎臓は、糸球体や尿管で構成されるネフロンから集合管までつながる一連の管腔上皮構造から成る臓器である。現時点までに、ヒトのすべての体細胞に分化可能な iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) から、ネフロンオルガノイドを作製することが可能となっている。一方、集合管に分化しうる尿管芽に関しては、我々がすでに、腎臓発生過程を段階的に模倣することによって選択的に作製する独自の方法を開発している (Mae S., 2018)。しかし、我々が作製した尿管芽は、その特徴である分枝がほとんど認められないため、その問題点を解決しうる方法を開発することが急務である。

多能性幹細胞の自己組織化を促すことで組織構築を行う浮遊培養法が確立されており、組織構築には連続上皮構造の形成が重要な過程であることが報告されている (Eiraku M., 2011)。また、低濃度のマトリゲルを含む培養液を用いて浮遊培養することで、連続上皮組織の形成が促されることも報告されている (Koehler KR., 2013)。そこで、尿管芽の発生過程で最も早期に形成される連続上皮構造は中腎管であること (Costantini F., 2010) に着目し、我々は iPS 細胞より作製した中腎管上皮から成る細胞塊を、低濃度のマトリゲルを含む培養液を用いて浮遊培養することによって、単層連続上皮組織の尿管芽オルガノイドを作製することに成功した。そして、作製できた尿管芽オルガノイドは、これまで認められなかった幾度も繰り返される分枝を行った。したがって、我々は世界中の多くのグループに先駆けて、ヒト iPS 細胞から分枝形態形成を繰り返す尿管芽オルガノイドの作製法を確立している (Mae S., 2020)。

尿管芽の分枝構造における幹部 (trunk) が集合管に分化し、先端部 (tip) では非対称分裂により自己複製もしくは trunk に分化する 2 種類の細胞系譜が産生される (Shakya R., 2005)。したがって、分枝形態形成の過程において、尿管芽 tip が幹細胞の役割を担っていると考えられている。実際、我々は分枝した尿管芽オルガノイドの tip 部分を機械的に分離し、そこから分枝する尿管芽オルガノイドの再構築に成功している (Mae S., 2020)。これらのことから、ヒト iPS 細胞から作製される尿管芽 tip 細胞の拡大培養法を確立すれば、そこから大量の分枝する尿管芽オルガノイドの供給が可能になると予想される。

2. 研究の目的

近年、単一のマウス尿管芽細胞から分枝する尿管芽組織を構築する培養法が報告されている (Yuri S., 2017)。また、in vitro では trunk は可塑性を有しており、trunk から tip を誘導可能であることが知られている (Sweeney D., 2008)。これらの知見は、尿管芽 tip および trunk に由来する単一の細胞は、in vitro において組織幹細胞の役割を担っている尿管芽 tip に変化し、分枝形態形成を行うことができることを示唆している。そこで本研究では、我々が作製したヒト iPS 細胞に由来する尿管芽オルガノイドを単一の尿管芽細胞にまで解離し、そこから選択的に尿管芽 tip 細胞を誘導することを目指す。そして、作製した尿管芽 tip 細胞から分枝する尿管芽オルガノイドの再構築を試みる。これまでに、ヒトネフロン前駆細胞を in vitro において 100 回以上継代培養可能な方法は既に開発されているが (Li Z., 2016)、ヒト尿管芽 tip 細胞を拡大培養する方法は未だ確立されていない。その問題を解決するために、独自の尿管芽 tip 細胞の長期拡大培養法を開発し、先天性腎尿路異常の病態モデル作製研究に用いる尿管芽オルガノイドを大量に作製することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 尿管芽 tip 細胞の単離およびモニタリング方法の確立

マウス腎発生において、超低密度リポタンパク質受容体 (very low-density lipoprotein receptor; Vldlr) は、尿管芽 tip 領域でのみ発現していることが報告されている (Rutledge EA., 2017)。そこで、確立済の独自の方法で作製される尿管芽オルガノイドにおいて VLDLR が発現し、DiI で標識した VLDL が VLDLR を介して細胞内に取り込まれることを確認する。そして、フローサイトメーターを用いて DiI 陽性および陰性の細胞を分取し、遺伝子発現解析により DiI 陽性細胞が尿管芽 tip 細胞であるか否かを明らかにする。

(2) 尿管芽オルガノイドから尿管芽 tip 細胞を選択的に誘導する方法の開発

まず、ヒト iPS 細胞から作製される尿管芽オルガノイドを、高い生存率を保ったまま単一の細胞にまで解離する方法を確立する。

尿管芽 tip 領域では、細胞の形状や密度を感知して細胞増殖を制御する転写活性化因子である YAP/TAZ が細胞質に局在していることが報告されている (Reginensi A., 2016)。そこで、YAP/TAZ の細胞質への移行を促進する Verteporfin などの化合物を用いることで、tip への変化が促されるか否かを検証する。また、YAP/TAZ の局在は細胞外基質の硬さと密接に関連しているため、細胞培養器材の硬さを調節することで tip への誘導効率の向上を図る。これまでに、分枝

した尿管芽オルガノイドの tip 部分を機械的に切離し、そこから分枝する尿管芽オルガノイドの再生に成功しているため、その方法を踏襲して尿管芽 tip 細胞から尿管芽オルガノイドを再生することを試みる。

(3) 尿管芽 tip 細胞の拡大培養法の開発

まず、尿管芽 tip 細胞を選択的に誘導する条件のまま継代培養を繰り返しても、尿管芽オルガノイドを再生することが可能であるか検証する。尿管芽オルガノイドを再生することができず、尿管芽 tip 細胞としての性質が失われる場合、マウスなどのモデル動物における腎臓発生生物学の知見を基に、尿管芽 tip 細胞を長期に渡って拡大培養することを可能にする因子を探索する。

(4) 尿管芽 tip 細胞の拡大培養を可能とする機序の解明

尿管芽 tip 細胞の増殖に関するシグナルを突き止めるため、RNA シークエンス解析を行う。さらに、拡大培養過程における尿管芽 tip 細胞の遺伝子発現パターンの変化についても検証する。

4. 研究成果

(1) 尿管芽 tip 細胞の単離およびモニタリング方法の確立

まず、我々が確立済の独自の方法で作製される尿管芽オルガノイドにおいて、尿管芽 tip 領域で特異的に VLDLR が発現することを免疫染色法により明らかにした。次に、DiI で標識した VLDL が VLDLR を介して細胞内に取り込まれることを蛍光顕微鏡で確認後、フローサイトメーターを用いて DiI 陽性および陰性の細胞を分取した。RNA シークエンス解析により遺伝子発現を比較したところ、DiI 陽性細胞において尿管芽 tip 細胞マーカー (*RET*, *WNT11*, *ETV5*) が強く発現していた。一方、DiI 陰性細胞では尿管芽 trunk 細胞マーカー発現 (*KRT19*, *CDH1*, *AQP2*) が亢進していた。これらの結果から、DiI で標識した VLDL の取り込みにより尿管芽 tip 細胞をモニタリングする方法を開発できたと考えられる。

(2) 尿管芽オルガノイドから尿管芽 tip 細胞を選択的に誘導する方法の開発

ヒト iPS 細胞から作製される尿管芽オルガノイドは Accutase を用いることで、高い生存率を保ったまま単一の細胞にまで解離することが可能であった。次に、フローサイトメーターで分取した DiI で標識した VLDL を取り込まない尿管芽 trunk 細胞を、YAP/TAZ の細胞質への移行を促進する化合物である Thiazovivin を添加して培養したところ、DiI で標識した VLDL を取り込む尿管芽 tip 様細胞に変化することを見出した。また、単一の尿管芽構成細胞をマトリゲルから成る軟らかいハイドロゲル上に播種したところ、尿管芽構成細胞はコロニーを形成し、尿管芽 tip 細胞マーカーである *RET* 発現が維持されることが分かった。そこで、それらの方法を組み合わせたと、ほぼすべての尿管芽構成細胞から DiI で標識した VLDL を取り込む尿管芽 tip 細胞コロニーを作製する方法を確立することができた。

これまでに、分枝した尿管芽オルガノイドの tip 部分を機械的に切離し、そこから分枝する尿管芽オルガノイドの再生に成功しているため、その方法を踏襲して尿管芽 tip 細胞コロニーから尿管芽オルガノイドを再生することを試みたが、分枝形態形成を行う変化は認められなかった。

単一の腸幹細胞から腸オルガノイドが再生される過程において、一過性の YAP1 活性化によって惹起される NOTCH シグナルが重要であることが知られている (Serra D., 2019)。YAP/TAZ を不活性化することにより尿管芽 tip 細胞を選択的に増殖させることが可能となっていることから、YAP/TAZ の活性化が尿管芽オルガノイドの再生にも有効ではないかと考えた。そこで、GSK3b 阻害によって Wnt/b-catenin シグナルを活性化する化合物である CHIR99021 の代わりに Afamin/Wnt3a conditioned medium を用いたところ、YAP/TAZ が活性化され、tip 細胞コロニーから尿管芽オルガノイドの再生が可能となることが分かった。したがって、尿管芽オルガノイドから機械的に切離することなく、選択的に誘導した尿管芽 tip 細胞から尿管芽オルガノイドを再生する独自の培養法を開発することに成功した (図 1)。

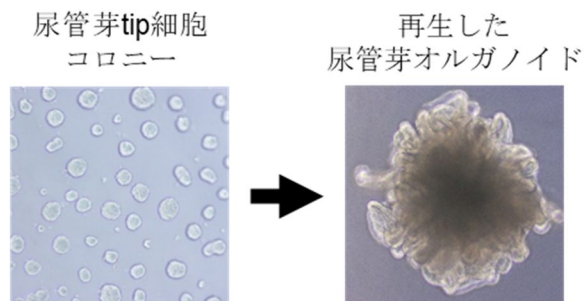


図1. 尿管芽tip細胞とオルガノイド再生

(3) 尿管芽 tip 細胞の拡大培養法の開発

尿管芽構成細胞から誘導した尿管芽 tip 細胞コロニーの継代培養を繰り返したところ、尿管芽 tip 細胞マーカーである *WNT11* 発現が著しく減少し、細胞増殖速度も徐々に低下することが

分かった。さらに、尿管芽オルガノイドを再生する組織幹細胞としての性質が失われたことから、拡大培養するためには培養条件を検討する必要があることが示唆された。これまでに、TGF β シグナルは尿管芽分枝を抑制することが報告されており (Bush KT., 2004) 我々が誘導した iPS 細胞由来尿管芽 tip 細胞は TGF β 2 を発現していた。そこで、尿管芽オルガノイドを TGF β シグナル阻害剤である A83-01 を添加して培養したところ、DiI で標識した VLDL を取り込む尿管芽 tip 細胞の割合が増加することが分かった。そして、A83-01 を添加して尿管芽 tip 細胞の拡大培養を試みたところ、*WNT11* 発現が維持され、細胞増殖の促進効果を認めた。さらに、10 週間以上もの長期間に渡る拡大培養を行っても、尿管芽オルガノイドを再生する能力が保たれることも分かった。これらのことから、TGF β シグナル阻害によって尿管芽 tip 細胞の拡大培養が可能となることを見出した。

(4) 尿管芽 tip 細胞の拡大培養を可能とする機序の解明

まず、A83-01 の有無で 4 週間培養した尿管芽 tip 細胞における遺伝子発現を RNA シークエンス解析により比較したところ、A83-01 を用いることによって NF κ B シグナルが亢進することを突き止めた。そこで、A83-01 と NF κ B シグナル阻害剤である BAY 11-7082 を共に添加して尿管芽 tip 細胞を培養したところ、細胞増殖が著しく抑えられた。したがって、尿管芽 tip 細胞の増殖には NF κ B シグナルが関与していると考えられる。

次に、拡大培養を 2 週間もしくは 6 週間行った尿管芽 tip 細胞の違いを RNA シークエンス解析で検証した。腎発生早期の尿管芽 tip 細胞マーカーである *SALL4* および *KIT* 発現は拡大培養を継続することで低下した一方、後期の尿管芽 tip 細胞マーカーである *LCN2* 発現が経時的に増加したことから、拡大培養によって尿管芽 tip 細胞の発生分化段階が進むことが示唆された (図 2)。

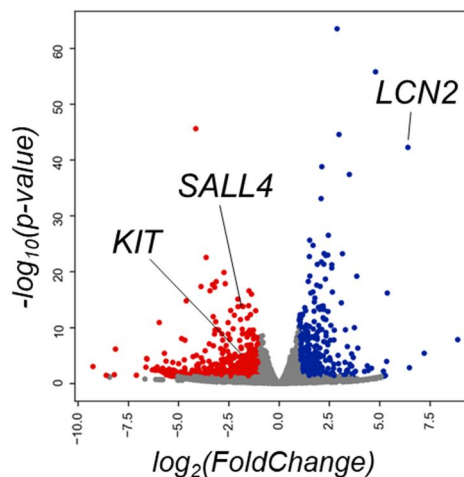


図2. 拡大培養により発現変動する遺伝子

これまでのところ、尿管芽 tip 細胞を選択的に拡大培養する方法は確立されていないことから、本研究成果は新規性と進歩性に優れている。さらに、拡大培養によって発生分化段階が進んだ腎組織を作製可能になることで、腎臓発生機序の解明が進展し、iPS 細胞を用いた先天性腎尿路異常の病態解明に発展することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mae Shin-Ichi, Ryosaka Makoto, Sakamoto Satoko, Matsuse Kyoko, Nozaki Aya, Igami Maiko, Kabai Ryotaro, Watanabe Akira, Osafune Kenji	4. 巻 32
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 ~ 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shin-Ichi Mae, Makoto Ryosaka, Kenji Osafune
2. 発表標題 Expansion of human iPSC-derived ureteric bud organoids with repeated branching potential.
3. 学会等名 ISSCR 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前伸一、兩坂誠、長船健二
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた分枝形態形成を行う集合管系譜オルガノイドの作製と再生
3. 学会等名 第11回分子腎臓フォーラム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1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 同左
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

〔取得〕 計0件

〔その他〕

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------