

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23600

研究課題名（和文）精緻かつ実用的な腎組織再構築のためのストローマ前駆細胞の誘導・維持・増殖法の開発

研究課題名（英文）Development of optimal culture condition for renal stromal progenitor cells towards kidney tissue engineering

研究代表者

西川 昌輝（Nishikawa, Masaki）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・講師

研究者番号：40843149

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：腎前駆細胞のin vitroでの維持・増殖法に関する知識の獲得は、腎臓の再生医療にとって重要である。本研究では、腎ストローマ前駆細胞の拡大培養を可能にする培養システムの構築を目指した。我々は、ある複数の増殖因子と小分子化合物からなる組合せが前駆細胞の未分化状態の維持および増殖に適していることを見出した。また、この培養系で培養された細胞と、単離直後の細胞を比較し、遺伝子発現パターンが非常に似通っていることを確かめた。さらに、培養条件を最適化することで、腎オルガノイド中での腎ストローマ前駆細胞の分化を観測することに成功した。これらの結果を基盤とした後継プロジェクトも現在進行中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓は20種類以上の細胞からなる非常に複雑な構造を持ち、その構造と機能は密接に関連している。ゆえに再生医療などを目指した成体の腎組織の直接的な再構築は困難である。しかしその発生過程に着目すると、主に3種類の前駆細胞からなる単純な構造に始まり、それらの細胞間の相互作用を通じて複雑化していく。つまり、この3種類の前駆細胞を準備し、初期の単純な構造を再構築することが、複雑な成体の腎臓を再構築する端緒となると考えられる。本研究は、その3種類の前駆細胞のうち腎ストローマ前駆細胞に着目し、その適切な拡大培養法を開発することで再生医療などを視野に入れた腎組織の再構築に資することを目的として行った。

研究成果の概要（英文）：Knowledge on how to maintain and expand renal progenitor cells in vitro could provide a useful tool for kidney regeneration and replacement therapies. We aimed in this study to establish a culture system that enables the expansion of renal stromal progenitor cells. We found that certain combinations of growth factors and small molecules were suitable for maintenance of the progenitor state as well as the growth of cells. We confirmed very similar gene expression patterns of cultured cells with freshly isolated renal stroma cells. By optimizing culture condition, we also succeeded to observe differentiation of renal stromal cells in kidney organoids in vitro. The results of this project became the basis of the successive on-going project.

研究分野：細胞工学

キーワード：細胞工学 再生医療 オルガノイド 動物実験代替

1. 研究開始当初の背景

腎臓は、20種類以上の細胞からなる複雑な構造を持つため、直接的な組織構築は困難である。しかし発生過程に着目すると、ネフロン、尿管芽、ストローマのわずか3種類の前駆細胞からなるシンプルな構造から始まり、相互に増殖と分化を制御しながら3次的に自己組織化する (Figure 1)。

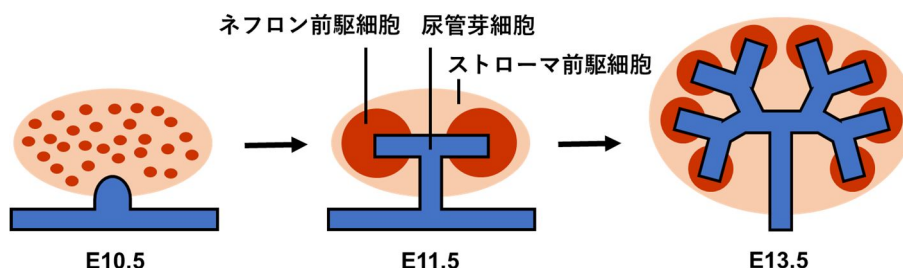


Figure 1. 3種類の前駆細胞の自己組織化による腎臓の発生過程 (マウス)

したがって、腎臓の再生や精緻なオルガノイド構築を目指すには、この3種類の前駆細胞を準備し、適切な自己組織化を促すことが重要となる。ネフロン前駆細胞や尿管芽細胞に関しては、分化誘導法だけでなく維持・増殖法についても、申請者らを含むグループによって近年確立されつつある (Morizane et al., Nat. Biotechnol., 2015; Taguchi and Nishinakamura, Cell Stem Cell, 2017; Yuri et al., Stem Cell Reports, 2017)。しかし、ストローマ前駆細胞に着目したものは未報告である。

腎臓におけるストローマ細胞は、発生過程においてネフロン前駆細胞や尿管芽細胞の増殖・構造化の制御などを行いつつ増殖し、傍系球体細胞や平滑筋細胞など特定の機能を持った細胞に分化する。このように終末分化した細胞は、iPS細胞から誘導された腎臓様アグリゲート中に存在することが Takasato らによって示されている (Takasato et al., Nature, 2015)。しかしながら、ストローマ前駆細胞は、詳細な発生経路が未解明で、細胞純化に適する表面マーカーが特定されていないなどの理由から、分化誘導・維持・増殖法は未報告である。このことから、既報の腎臓オルガノイドは、腎臓以外の雑多な細胞も混入したものであり、局所的かつ不完全な腎臓構造の再現に止まる (Fig. 2)。

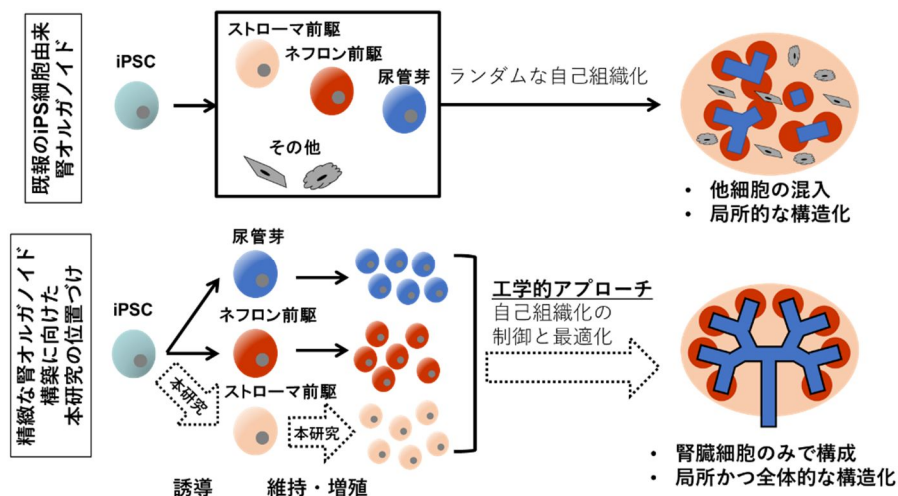


Figure 2. 既報の腎臓オルガノイドの問題点とその解決に資する本研究の位置づけ、及び将来構想 (工学的アプローチとの融合による精緻な腎臓オルガノイド構築)

2. 研究の目的

本研究は、腎臓の再生や精緻なオルガノイド構築に不可欠な基礎技術である、幹細胞からの腎ストローマ前駆細胞の誘導法、及び前駆細胞の状態での維持・増殖法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

マウス胎児から分取直後の腎ストローマ前駆細胞（フレッシュサンプル）と、分取後に数日間、我々の検討により現時点で最適と考えている条件（コントロール条件）で培養した腎ストローマ前駆細胞（培養サンプル）を準備した。両サンプルから精製したRNAをもとに次世代RNAシーケンス（RNA-seq）解析を行った。

RNA-seqの結果を正規化し、遺伝子IDと対応付けて解析ツールであるGSEAやDAVIDにインプットした。フレッシュと培養サンプル間での発現変動遺伝子を特定し、様々な遺伝子間の相互作用や生体への作用などを可視化したパスウェイ上にマッピングした。

4. 研究成果

脂質代謝系のパスウェイ、アミノ酸・糖代謝系のパスウェイ、細胞死などを制御するp53シグナルのパスウェイがおもに発現変動遺伝子と対応していた。その中でも培養した細胞の方で発現量が多かった、脂質代謝系の中心となるPPARシグナルのパスウェイ（Fig. 3）と、p53シグナルのパスウェイ（Fig. 4）の結果を示す。

発現量の多い遺伝子（赤い星印）は、PPARの中でもPPAR γ の経路に多く存在していることがわかった。

今後は、この結果をもとに新たな培地添加因子を探索し、培養条件の最適化を試みる。

培養条件の最適化によって腎ストローマ前駆細胞の拡大培養法が開発できれば、腎オルガノイドを利用した薬剤スクリーニング系の開発や腎再生医療につながると期待される。

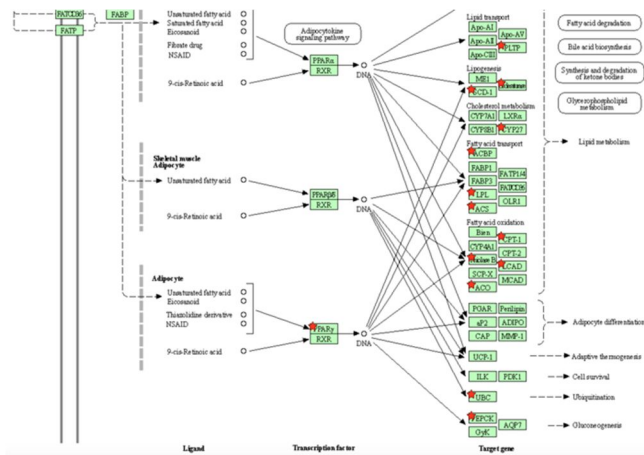


Figure 3. PPARシグナルパスウェイでの発現変動遺伝子（赤い星印）

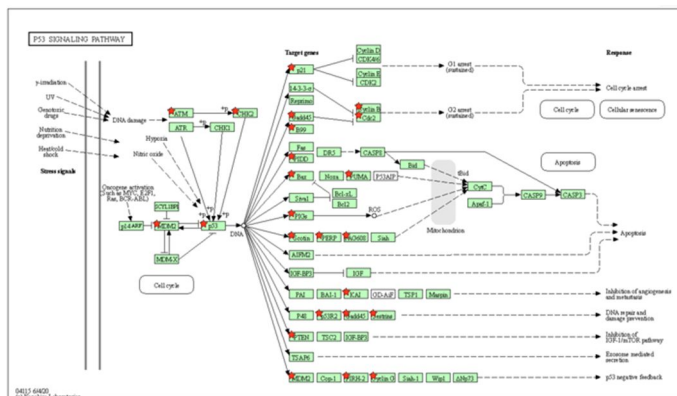


Figure 4. p53シグナルパスウェイでの発現変動遺伝子（赤い星印）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishikawa, M., Sakai, Y. & Yanagawa, N.	4. 巻 3
2. 論文標題 Design and strategy for manufacturing kidney organoids.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bio-Design and Manufacturing	6. 最初と最後の頁 7-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s42242-020-00060-0	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 該当する

1. 著者名 Vadivelu Raja, Kashaninejad Navid, Nikmaneshi Mohammad Reza, Khadim Rubina Rahaman, Salehi Seyedeh Sarah, Ramulu Naveen Chintala, Sakai Yasuyuki, Nishikawa Masaki, Firoozabadi Bahar, Nguyen Nam Trung	4. 巻 5
2. 論文標題 Sessile Liquid Marbles: Sessile Liquid Marbles with Embedded Hydrogels as Bioreactors for Three Dimensional Cell Culture (Adv. Biology 2/2021)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Biology	6. 最初と最後の頁 2170022 ~ 2170022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adbi.202170022	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	酒井 康行 (Sakai Yasuyuki)	東京大学・工学系研究科・教授 (12601)	
研究協力者	新宅 博文 (Shintaku Hirofumi)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	バディベル ラジャ (Vadivelu Raja)		

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		
米国	University of California at Los Angeles	GLAVAHS at Sepulveda	
オーストラリア	Griffith University		