

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253051

研究課題名(和文) 幹細胞からの腎臓3次元構造の再構築

研究課題名(英文) Reconstitution of three-dimensional kidney structures from stem cells

研究代表者

西中村 隆一 (Nishinakamura, Ryuichi)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：70291309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,900,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓はネフロン前駆細胞、尿管芽、間質前駆細胞という3つの前駆細胞集団の相互作用によって形成される。本計画は、幹細胞からこの3系統を誘導し、腎臓の3次元構造を再構築することを目的とした。マウスを用いて尿管芽の発生過程で働く遺伝子群を明らかにし、3系統の前駆細胞を混合して腎臓の3次元構造を再構築する検定系を構築した。またヒトiPS細胞由来のネフロン前駆細胞をマウスに移植することによって、ヒト糸球体がホストの血管とつながることを示した。

研究成果の概要(英文)：The kidney develops through mutual interactions between three precursor tissues: namely nephron progenitors, ureteric buds, and the stroma. The purpose of this project is to induce the three lineages from pluripotent stem cells and reconstitute the three-dimensional kidney structures. We identified genes expressed during the ureteric bud development in mice, and established a method to re-aggregate the three lineages to form the kidney structures. In addition, we transplanted the human iPS cell-derived nephron progenitors into the mice, and found that human glomeruli were connected with the host vasculature.

研究分野：腎臓発生

キーワード：腎臓発生 ネフロン iPS細胞 糸球体

1. 研究開始当初の背景

Sall1 は我々が単離した核内因子であり、そのノックアウトマウスは腎臓を欠損する (Nishinakamura et al., *Development* 2001)。この遺伝子座に GFP を導入したマウス (Takasato et al., *Mech. Dev.* 2004) から Wnt4 存在下にコロニーを作らせることにより、Sall1 が高発現する後腎間葉中に、1 個の細胞から糸球体、近位尿細管、遠位尿細管という多系統のネフロンに分化する前駆細胞が存在することを証明した (Osafune et al., *Development* 2006)。このネフロン前駆細胞を含めて腎臓はすべて、Sall1 上流に位置する転写因子 Osr1 陽性の中間中胚葉から発生するとされていた (Mugford et al., *Dev. Biol.* 2008)。そこで Osr1 の GFP ノックインマウスと ES 細胞を作成し、解析を進める過程で、ネフロン前駆細胞は実は別の細胞群から派生することを見いだした。その知見をもとに、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞の試験管内誘導に成功し、そこから糸球体と尿細管を効率よく作成することができるようになった (Taguchi et al., *Cell Stem Cell* 2014)、とはいえ、現時点ではあと 2 つの重要な細胞群、間質と尿管芽がないために、糸球体から集合管に至る一つながりのネフロンが形成されておらず、その配置もランダムである。そこで本計画では、幹細胞から間質と尿管芽の誘導法を開発し、誘導したネフロン前駆細胞と組み合わせることで、腎臓の真の 3 次元構造を試験管内で再構築することを目指した。

2. 研究の目的

腎臓は、ネフロン前駆細胞 (後腎間葉)、尿管芽、間質前駆細胞という 3 つの細胞集団の相互作用によって形成される。我々は長年蓄積してきた発生学の知見と技術をもとに、発生過程を完全に模倣した 5 ステップの処理によって、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞を誘導し、そこから立体構造をもった糸球体と尿細管を誘導することに成功した。本計画は、幹細胞からさらに間質と尿管芽を誘導し、ネフロン前駆細胞と組みあわせて、腎臓の 3 次元構造を試験管内で再構築することを目的とする。これが実現すれば、試験管内で腎臓を創るという人類の夢に向けて大きな前進となることが期待される。

3. 研究の方法

1) 腎臓を構成する前駆細胞の誘導と 3 次元構造の再構築

マウス胎仔由来のネフロン前駆細胞、間質、尿管芽をそれぞれトランスジェニックマウスから採取して凝集し、腎臓の 3 次元構造を再構築する方法を開発する。そして、ネフロン前駆細胞をマウス ES 細胞から誘導し、胎仔由来の他の 2 系統 (間質及び尿管芽) と組み合わせる器官培養し、3 次元構築を検討する。尿管芽はトランスジェニックマウスから各発生段階の細胞を単離し、遺伝子発現を解析する。このデータと上記の再構築法を使って、マウス胎児細胞から尿管芽の誘導を検討する。その後マウス ES 細胞から尿管芽を誘導し、他の 2 系統と合わせて再構築を試みる。間質も含めて 3 つの系統の最適の誘導条件が整ったところで、すべてをマウス ES 細胞から誘導して組み合わせ、試験管内での 3 次元構造再構築を成功させる。

2) ヒト iPS 細胞を用いた糸球体の解析

本計画ではあくまでもマウスを先行させて誘導法の開発と 3 次元構造構築を目指す。それは 3 つの細胞群の positive control がマウスから採取できるため、それと比較して条件を最適化できるからである。さらにネフロン前駆細胞の発生過程はマウスとヒトで類似しており、誘導法もほぼ同じであるため、他の 2 系統も同様であることが想定される。とはいえ、ヒト iPS 細胞を使った道具立ては進めておく。TALEN を使った相同組換えによるノックイン法がヒト iPS 細胞に応用できるようになったため、糸球体ポドサイトで発現するネフリン遺伝子座に緑色蛍光タンパク (GFP) をノックインしたヒト iPS 細胞を樹立する。それを誘導してポドサイトが光るヒト腎臓を作成する。これによってヒトポドサイトの遺伝子発現を解析する。3 次元構造の再構築法が完成した場合には、糸球体形成を判定する有用なツールになることが期待される。

4. 研究成果

1) 腎臓を構成する前駆細胞の誘導と 3 次元構造の再構築

腎臓を構成する前駆細胞の一つである尿管芽の発生過程をマウスにおいて時間を追って追跡し、各発生段階で働く遺伝子群を明らかにした。またマウス胎児由来の 3 系統の前駆細胞を混合して腎臓の 3 次元構造を再構築

築する検定系を構築した。これらを指標にして、胎生初期の細胞集団を尿管芽まで誘導する条件を決定した。現在マウス ES 細胞から尿管芽に向けた誘導法を構築中である。また間質に関しても、遺伝子発現と再構成系を使って誘導を進めている。その過程で核内因子 Sall1 が間質前駆細胞においても重要な働きをすることを見出し、報告した (Ohmori et al. **Sci Rep** 2015)。最終的には3系統すべてをマウス ES 細胞から誘導し、腎臓の高次構造を再構築することを目指している。

2) ヒト iPS 細胞を用いた糸球体の解析

糸球体ポドサイトで発現するネフリン遺伝子座に GFP をノックインしたヒト iPS 細胞を樹立した。これを誘導すると糸球体が蛍光発色するヒト腎臓組織が得られ、その発生過程は生体と類似していた。誘導したヒトポドサイトを FACS で単離しマイクロアレイ解析したところ、ネフローゼ症候群の原因遺伝子など生体のポドサイトに特徴的な遺伝子群を発現していた。さらにヒト iPS 細胞由来のネフロン前駆細胞を免疫不全マウスに移植すると、ホストであるマウス血管がヒト糸球体に進入し、ボーマン腔内に濾過を示唆する物質が認められた。マウス血管内皮と隣接するヒトポドサイトの突起は複雑化し(足突起の形成)、スリット膜様構造も認められた。iPS 細胞由来の腎臓組織が生体の血管系と接続した初めての報告であり、血管内皮との相互作用でヒト腎臓細胞がさらに成熟したことになる。この成果はアメリカ腎臓学会誌に発表され、巻頭でも紹介された (Sharmin et al. **J Am Soc Nephrol** 2016)。

3) ネフロン前駆細胞の増幅法の開発

ネフロン前駆細胞の移植や糸球体への誘導を効率化するために、前駆細胞を未分化に保ったまま増幅する方法も探索した。Six2GFP トランスジェニックマウスからネフロン前駆細胞を単離し、LIF, FGF, Wnt, BMP7 を至適濃度で加えたところ、3週間維持することができ、糸球体と尿管への分化能も保たれていた。生体内では10日で消失するネフロン前駆細胞の生理的限界を越えて増幅できたことになる。同様の方法をヒト iPS 細胞に適用したところ、1週間ではあるが増幅することができた。今後の条件改善が必要だが、糸球体への分化能を保ちながらヒトネフロン前駆細胞を維持できた初めての報告である (Tanigawa et al. **Cell Rep** 2016)。より長期かつ増幅率の高い培養法と凍結保存法が実現

すれば、毎回 iPS 細胞から始める必要がなくなり腎臓誘導までの時間が短縮される。また大量の細胞を必要とする再生医療への基盤にもなると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Tanigawa S and Nishinakamura R. Expanding nephron progenitors in vitro: a step toward regenerative medicine in nephrology. **Kidney Int** 90: 925-927, 2016.

doi: 10.1016/j.kint.2016.08.014.

Tanigawa S, Taguchi A, Sharma N, Perantoni AO, and Nishinakamura R. Selective in vitro propagation of nephron progenitors from embryos and pluripotent stem cells. **Cell Rep** 15: 801-813, 2016.

doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.076.

Sharmin S, Taguchi A, Kaku Y, Yoshimura Y, Ohmori T, Sakuma T, Mukoyama M, Yamamoto T, Kurihara H and Nishinakamura R. Human induced pluripotent stem cell-derived podocytes mature into vascularized glomeruli upon experimental transplantation. **J Am Soc Nephrol** 27: 1778-1791, 2016.

doi: 10.1681/ASN.2015010096.

Ohmori T, Tanigawa S, Kaku Y, Fujimura S, and Nishinakamura R. Sall1 in renal stromal progenitors non-cell autonomously restricts the excessive expansion of nephron progenitors. **Sci Rep** 5: 15676, 2015.

doi: 10.1038/srep15676.

Tanigawa S, Sharma N, Hall MD, Nishinakamura R, Perantoni AO. Preferential propagation of competent SIX2+ nephronic progenitors by LIF/ROCKi treatment of the metanephric mesenchyme. **Stem Cell Reports** 5: 435-447, 2015.

doi: 10.1016/j.stemcr.2015.07.015.

Taguchi A and Nishinakamura R. Nephron reconstitution from pluripotent stem cells. **Kidney Int** 87: 894-900, 2015.

doi: 10.1038/ki.2014.358.

〔学会発表〕(計 6 件)

Nishinakamura R. Building the kidney from

pluripotent stem cells. CDB Symposium 2017.
2017.3.28, 理化学研究所 (神戸)

Nishinakamura R. Complex 3D Kidney Structures from Pluripotent Stem Cells. Kidney Week 2016 (American Society of Nephrology). 2016.11.18, Chicago (米国)

Nishinakamura R. Creating the kidney based on its developmental origin. EMBO/EMBL symposium: Organoids: Modeling organ development and disease in 3D culture. 2016.10.14, Heidelberg (ドイツ)

Nishinakamura R. Recreating the kidney. Santa Cruz Developmental Biology Meeting, 2016.8.15, Santa Cruz (米国)

Nishinakamura R. Programming stem cells toward the kidney
CiRA/ISSCR international symposium
Pluripotency: From basic science to clinical applications. 2016.3.23, 京都大学 (京都)

Nishinakamura R. Programming stem cells toward the kidney. 13th International Workshop on Developmental Nephrology. 2015.7.15, Auckland (ニュージーランド)

〔図書〕(計 3 件)

Nishinakamura R and Taguchi A. From development to regeneration: Kidney reconstitution in vitro and in vivo. (Chapter 34)
In: Kidney development, disease, repair, and regeneration (edited by Melissa H Little)
Academic Press 2015: 463-472 (Book Chapter)

腎臓のサイエンス (企画: 西中村隆一) 実験医学 (羊土社) 34(8), 2016.

腎臓発生学と再生医学への応用 (企画: 西中村隆一) 医学のあゆみ (医歯薬出版) 257(11), 2016.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ネフロン形成能を有するネフロン前駆細胞の増幅培養方法
発明者: 西中村隆一、谷川俊祐

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-076839

出願年月日: 平成 28 年 4 月 6 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学発生医学研究所腎臓発生分野

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/kidney_development/

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西中村 隆一 (NISHINAKAMURA, Ryuichi)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号: 70291309