

第4回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

YIA 受賞講演

多能性幹細胞から尿管芽の誘導法の確立と 胎児腎臓の高次構造の再現

The establishment of functional ureteric bud induction method enables the recapitulation of higher-order kidney organogenesis from pluripotent stem cells

太口敦博

Atsuhiko TAGUCHI

近年, ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞から任意の臓器組織を誘導する研究は飛躍的な進歩を遂げており, その誘導立体組織は「オルガノイド」と呼ばれている。腎臓領域においては, 2014 年にわれわれのグループが世界に先駆けて胎児期のネフロン前駆細胞を経たポドサイトと尿管芽の両方を含んだ腎臓組織の分化誘導法を, 同時期にオーストラリアのグループが尿管芽様立体組織の誘導法を報告している。その後も, ネフロン前駆細胞誘導の高効率化や, 血管内皮・間質細胞の同時誘導を行ったとする報告が次々になされており, 最近では, さらにこれらのオルガノイドを用いて先天性腎疾患の試験管内再現を試みた報告も増加している。

ネフロン前駆細胞およびネフロン上皮組織の誘導法については大きく研究が進んできた一方で, これまでの腎臓オルガノイドには集合管・尿管系組織が含まれていないために, 個々のネフロンが組織中に散在しており, すべてのネフロンが集合管に接続した腎臓本来の高次構造は再現されていなかった(図1)。このことは, 将来的に「機能する腎臓」を作製することを考えた際に, ネフロンで産生された尿を排泄できる出口がないことを意味しており, 解決すべき重要課題であった。このような, オルガノイドで臓器本来の高次構造が再現されていないという問題は, 再生医学領域で先行する心臓や肝臓, 膵臓など他の臓器でも共通する課題となっている。つまり, 心筋シートは作製できても

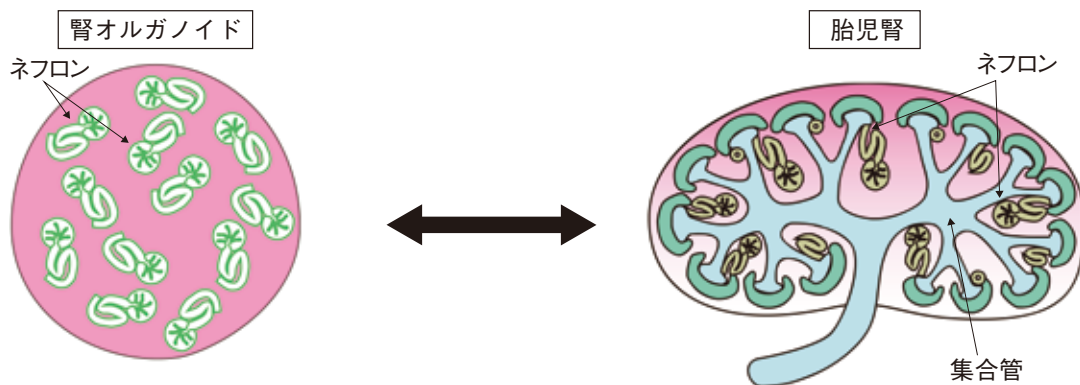


図1 これまでの腎オルガノイドと生体の胎児腎との比較

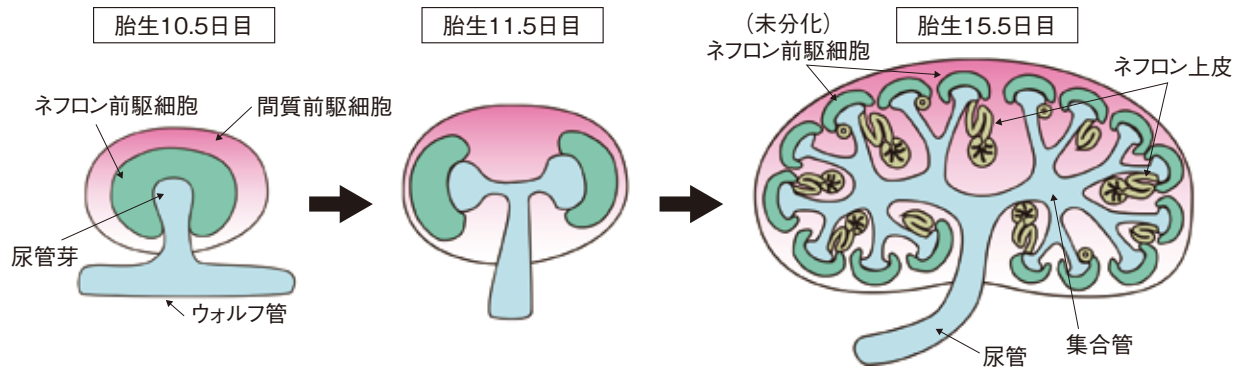


図2 胎児腎臓の形態形成過程

心臓の三次元構造は再現されておらず、肝臓オルガノイドでは肝細胞は存在するが、胆管組織はなく、誘導腺臓組織に膵島はあっても膵管や腺房を含む外分泌組織はできていない。つまり、臓器全体の高次構造を再現することはいまだきわめて困難であるといえる。

そこでわれわれは、腎臓の高次構造の形成過程を再現するために、腎臓の発生過程に着目し、その仕組みを正確に理解することを目指した。マウスでは胎生10.5日目頃に成体の腎臓のもとになる「後腎」が明らかになる。図2に後腎の発生過程の模式図を示す。胎児の腎臓は、将来のネフロン上皮のもととなるネフロン前駆細胞(緑色の細胞)、その周囲に存在して将来のメサンギウム細胞や間質系細胞のもとになる間質前駆細胞(ピンク色の細胞)、将来の集合管、尿管のもとになる尿管芽(青色の部分)という大きく分けて3つの前駆細胞集団から構成される。このなかで、尿管芽はその前駆体であるウォルフ管から出芽した上皮組織であるのに対し、ネフロン前駆細胞と間質前駆細胞は間葉細胞であることから、後者2つを合わせて後腎間葉とも呼ぶ。3種類の前駆細胞の相互作用は胎生10.5日目頃より出生直後まで継続し、その間、図2に青色で示される尿管芽組織は先端で樹状分岐と呼ばれる分岐を繰り返して1つの「幹」、つまり尿管へと連続する多数の集合管へと分化する。この尿管芽のいわば「枝振り」が腎臓の全体的な形を決めていることから、尿管芽は腎臓の高次構造形成におけるオーガナイザーの役割を果たしているともいえる。また、尿管芽の分岐の先端部からは液性の成長因子であるWntが分泌され、周囲の間質前駆細胞からの分化因子とともに近傍の未分化なネフロン前駆細胞の一部を上皮化したネフロンへと分化させる。さらに、尿管芽の先端から分泌されるFgfはネフロン前駆細胞の維持・増殖に働き、ネフロン前駆細胞から分泌されるGdnfが尿管芽の増殖を促す。この

ように発生過程を通じて胎児の腎臓の表層部で「前駆細胞ニッチ」を維持しながらその一部をネフロンへと分化させる仕組みを持つことで、ヒトでは100万個にも及ぶネフロンを作ることが可能になっている(図2)。すなわち、腎臓の形成過程において尿管芽は、樹状分岐形成、ネフロン前駆細胞からネフロンへの分化、未分化ネフロン前駆細胞の増殖・維持という3つの重要な働きを持つことがわかる。

では、どのようにすればこのような機能特性を持つ尿管芽を作ることができるのだろうか。以前の報告で、われわれはマウスの胎生6.5日目から11.5日目における細胞系譜追跡実験を行い、尿管芽とネフロン前駆細胞が発生の初期(7.5日目から9.5日目の間)に前方中間中胚葉と後方中間中胚葉という異なる起源を経て分化するというを示している(図3)。したがって、理論的にはネフロン前駆細胞と尿管芽をこの系譜の分離過程に従って“別々”に誘導する方法の確立が必要だろうと考えた。尿管芽の生体における初期発生過程を詳細に調べるために、Hoxb7-GFPという尿管芽系譜特異的にGFPを発現する遺伝子改変マウスを導入し、GFP陽性細胞の生体内での挙動を確認した。その結果、GFP陽性の尿管芽の前駆体、「ウォルフ管前駆細胞」は胎生8.75日目頃に初めてマウス胎仔体幹の頭側に出現し、その後、胎生9.5日目にかけて胎児尾部の総排泄腔まで伸長することが観察された(図3)。続いて、胎生10.5日目になると、後肢レベルのウォルフ管から隣接する後腎間葉に向かって尿管芽が出芽し、11日目には後腎間葉内に侵入し、11.5日目には最初の2分岐を形成することが確認できた。

次に、尿管芽特有の樹状分岐能がどの発生段階から獲得されるのか(機能的成熟過程)を調べるために、尿管芽と後腎間葉を手動的に単離し、*in vitro*で再凝集して樹状分岐を起こさせる腎組織の再構成アッセイ系を確立した(図4)。ポジティブコントロールとなる胎生11.5日目の成熟尿管芽

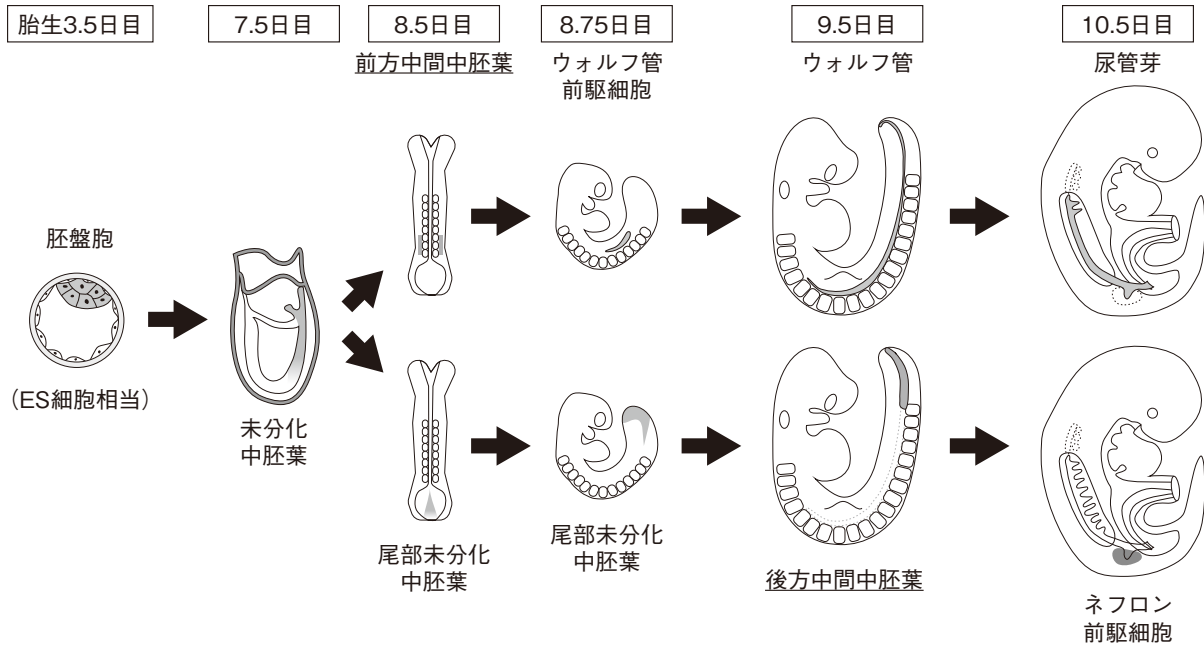


図3 発生の初期段階におけるネフロン前駆細胞と尿管芽の系譜分離モデル

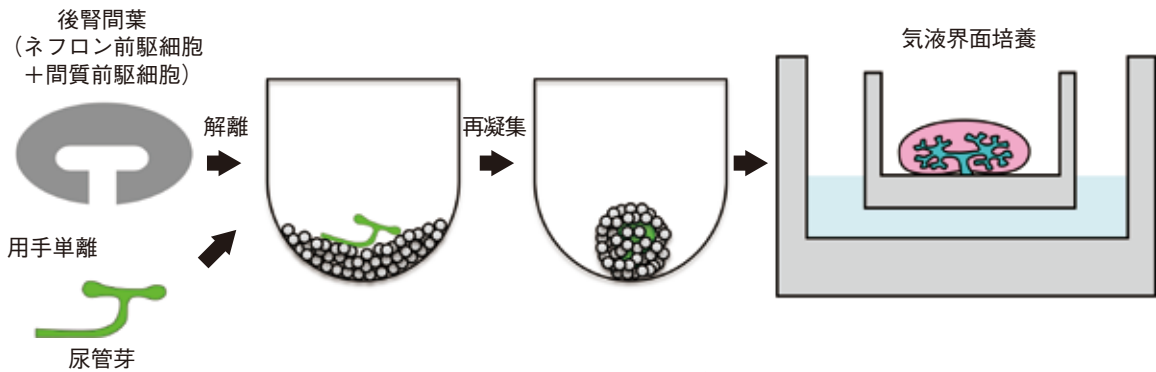


図4 11.5日目の胎児腎臓を用いた腎組織再構成法

は、後腎間葉とともに凝集すると樹状分岐構造を形成できる。そこで、胎生9.5日目、10.5日目、11.5日目のウォルフ管および尿管芽をそれぞれ用手的に単離して、11.5日目の後腎間葉と再構成アッセイを行い、樹状分岐能力を確認した。その結果、胎生9.5日目、10.5日目、11.5日目と発生が進行するにしたがって、分岐能力が獲得される、つまり機能的に成熟することが明らかになった。また、同じ発生段階のウォルフ管組織は、頭・尾側の位置によらず、同等の分岐能を持つことも確認できた。

さらに、この尿管芽の前駆細胞の成熟過程をモニタリングしうるマーカー遺伝子を見出すために、胎生8.75日目から11.5日目の尿管芽および尿管芽前駆細胞をフローサイトメトリーで回収し、遺伝子発現アレイ解析を行った。その

結果、これまで尿管芽マーカーとして知られていた遺伝子は発生過程を通じてほぼ一定量で発現していたのに対して、*Hnf1b*, *Wnt9b*, *E-Cadherin*, *Calbindin1* といった遺伝子は発生の進行とともに発現量が増加することが判明し、分化・成熟マーカーとして有用であることが示唆された。また、アレイ結果を解析したところ、尿管芽系譜細胞では、後腎間葉系譜の前駆細胞に比して *Wnt*, *Fgf*, レチノイン酸のシグナル関連遺伝子が強く発現していたことから、これらを分化誘導の候補因子と推定した。実際に、これらの候補因子の濃度と組み合わせを検討し、最適化したところ、8.75日目胚から分取したウォルフ管前駆細胞から、3日間、3ステップの誘導条件によって *in vitro* で11.5日目相当の尿管芽様組織へと誘導することができた。さらに、この分化

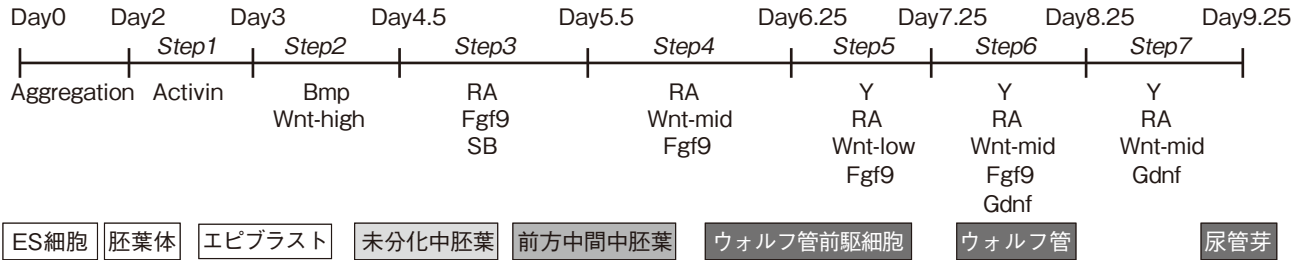
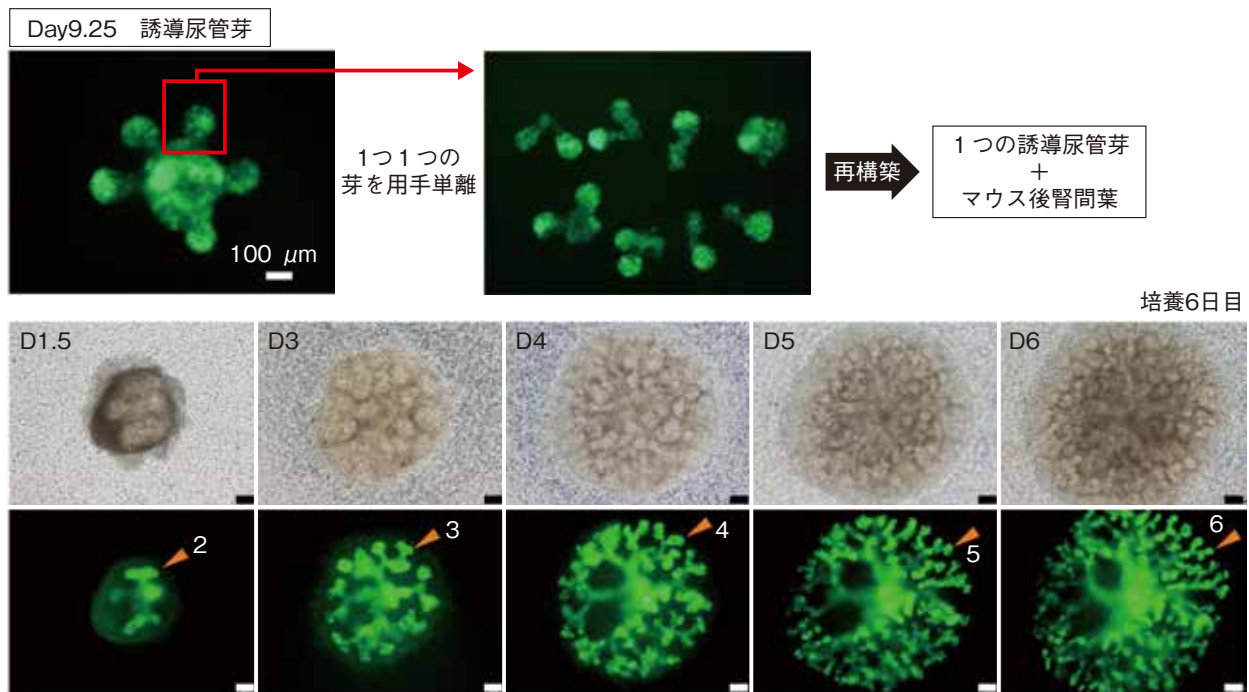


図5 マウス尿管芽誘導プロトコル

Bmp : bone morphogenetic protein, Wnt : wingless-type MMTV integration site family (Wnt-high : 高濃度, Wnt-mid : 中濃度, Wnt-low : 低濃度), RA : retinoic acid, Fgf : fibroblast growth factors, Gdnf : glial-cell derived neurotrophic factor, Y : Y-27632 : rock pathway inhibitor



※橙色の矢頭は尿管芽の分岐世代を示す

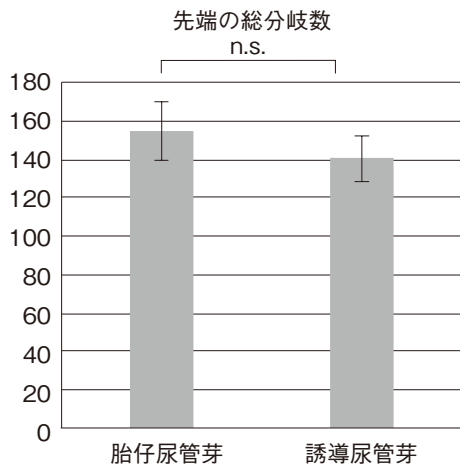


図6 再構成・腎組織における誘導尿管芽の分岐の進行の様子と胎仔尿管芽との定量的比較

過程を前述の分化マーカーでモニタリングしたところ、生体で起こるのと同様の遺伝子発現変化を観察することができた。すなわち、マウス 8.75 日目胚のウォルフ管前駆細胞を用いた実験系により、11.5 日目の尿管芽相当細胞までの誘導条件が確立できた。

次にマウス ES 細胞(胎生 3.5 日目相当)を用いて、胎生 8.75 日目のウォルフ管前駆細胞の誘導条件を検討した。今回の発表では、時間の都合上詳細を割愛したが、最終的に4つの分化ステップを含むウォルフ管前駆細胞の誘導条件を確立し、前述の胎仔細胞を用いて確立した3ステップを後半に加えた計7段階の誘導条件でマウス ES 細胞から尿管芽組織を誘導するプロトコルを決定した(図5)。この誘導法では確かに図6に示すような尿管芽の出芽を誘導 9.25

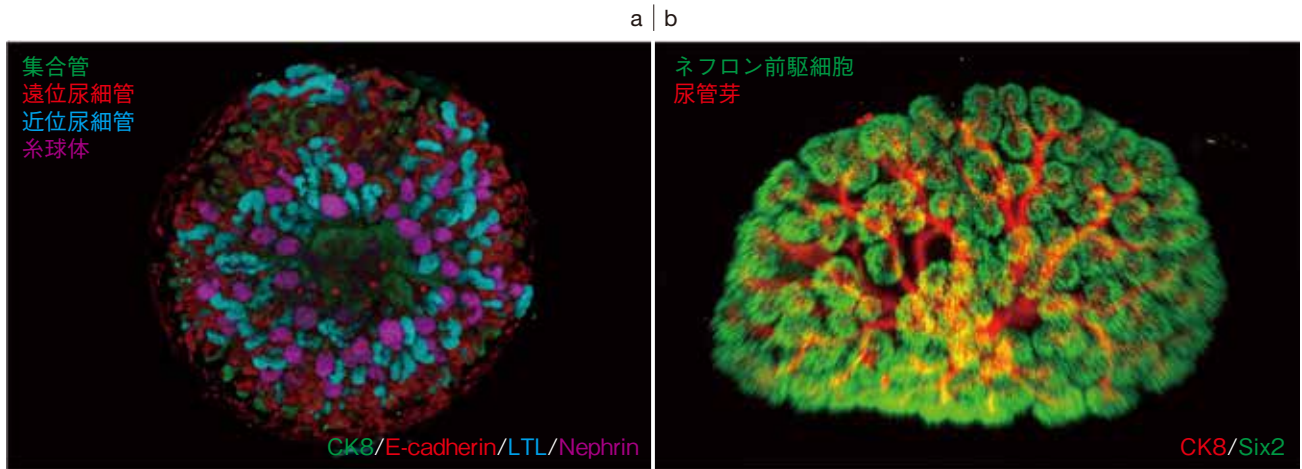


図7 再構成・腎組織におけるネフロンとネフロン前駆細胞の三次元像

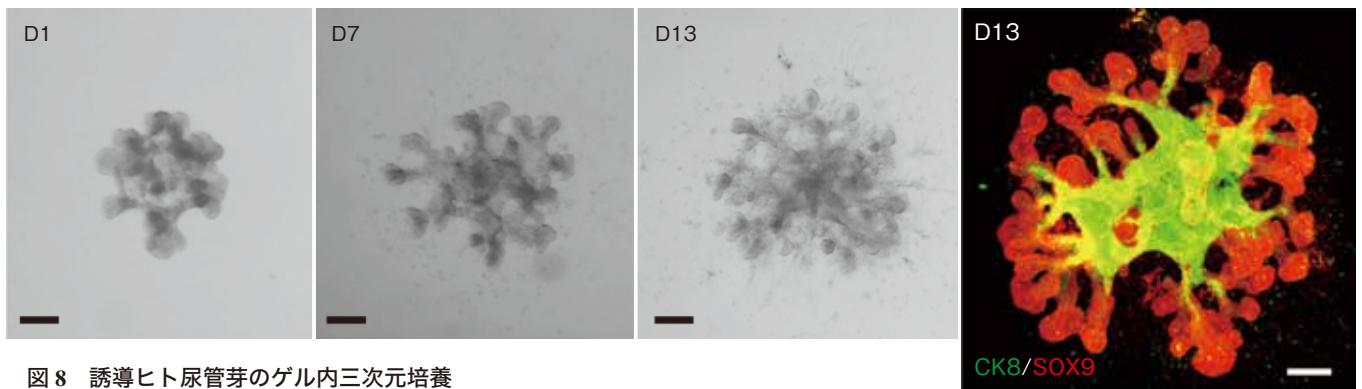


図8 誘導ヒト尿管芽のゲル内三次元培養

日目に観察することができた。

そこで、ES細胞から誘導した尿管芽が前述の3つの機能特性を持ち合わせているかを検証した。生体の腎臓では1つの尿管芽からすべての集合管系組織が分岐するため、誘導尿管芽組織から1つの芽を人工的に単離し、マウス後腎間葉との再構成培養を行った。その結果、再構成体のなかで、誘導尿管芽は1日1分岐のペースで分岐を繰り返し、約1週間で6世代以上、140前後の分岐を形成し、胎仔から採取した尿管芽と統計学的に差のない分岐能力を有することが確認できた(図6)。次に、尿管芽のネフロン分化能力を確認するために、培養7日目のオルガノイドをネフロンの分化マーカーで染色して観察した。その結果、尿管芽由来の組織であるCytokeratin8(CK8)陽性の集合管の内側に、E-cadherin陽性の遠位尿細管、さらに内側にLTL陽性の近位尿細管、その先にNephhrin陽性の糸球体が確認できた(図7a)。このことから、尿管芽が後腎間葉内のネフロン前駆細胞から上皮化したネフロンを分化誘導する能力を持

つことが示された。さらに、オルガノイドを未分化なネフロン前駆細胞マーカーであるSix2で染色したところ、尿管芽の先端、オルガノイドの表層部でSix2陽性の未分化なネフロン前駆細胞が存在したことから、尿管芽のネフロン前駆細胞の維持能も確認することができた(図7b)。

次に、マウス胎仔由来のネフロン前駆細胞の代わりに、われわれが以前確立した方法でES細胞から誘導したネフロン前駆細胞と組み合わせても同様のことが再現できるのかを確認した。マウスES細胞からネフロン前駆細胞と尿管芽を各々のプロトコルに従って別々に誘導し、マウス胎仔からフローサイトメトリーで純化・採取した間質前駆細胞と混合して腎オルガノイドを構築した。その結果、マウスES細胞由来のネフロン前駆細胞と尿管芽を組み合わせても腎臓の高次構造が再現できることが示された。

さらに、マウス尿管芽の誘導因子および誘導期間を一部調整することで、ヒトiPS細胞からも尿管芽組織を誘導できることを確認した。ヒトの場合にはマウスに比べて発生

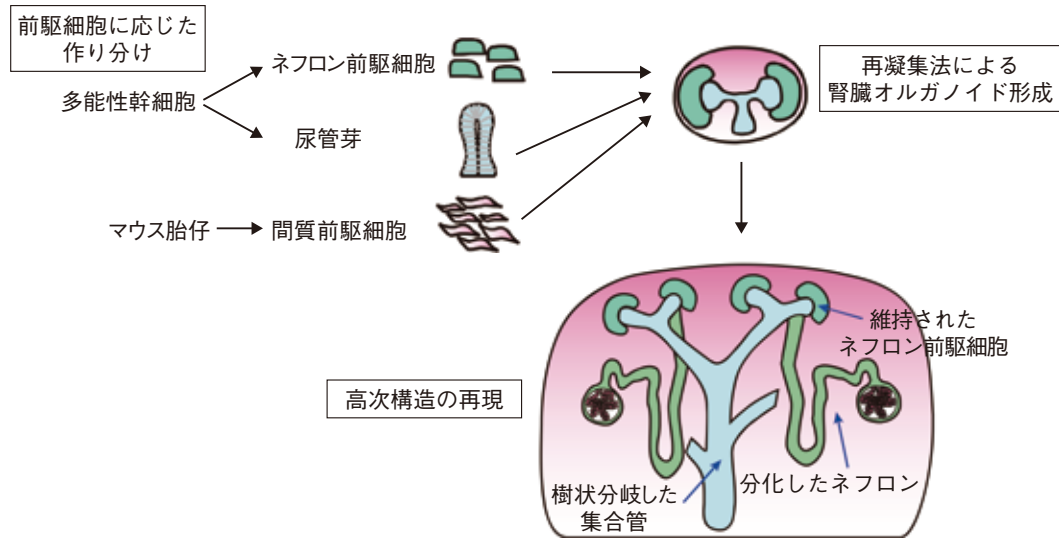


図9 多能性幹細胞を用いた胎児腎臓の高次構造再現法の概略

がゆっくり進行することから、約1週間で1世代の分岐が観察され、約2週間で2世代の樹状分岐が観察できた(図8)。ただし、ヒトでは胎児から間質前駆細胞を得ることは難しいため、ヒト胎児腎臓の高次構造を再現するためには、今後さらに、間質前駆細胞の誘導法も確立する必要がある。

本研究の内容を要約する。マウスES細胞およびヒトiPS細胞から尿管芽の分化誘導法を確立した。マウス誘導尿管芽は、樹状分岐能力、ネフロン分化能力、未分化ネフロン前駆細胞の維持能力を持つ。ネフロン前駆細胞と尿管芽を起源の違いに応じて別々に誘導し、マウス間質前駆細胞と

組み合わせることで胎児腎臓の高次構造を再現することができた(図9)。ヒト腎臓オルガノイドで高次構造を再現するためには、今後、ヒト間質前駆細胞の誘導法を確立することが必要である。

謝辞

本研究は熊本大学発生医学研究所腎臓発生分野で行いました。本研究を遂行するにあたり多大なご指導、ご助力をいただきました西中村隆一教授をはじめ、腎臓発生分野の皆様ここに深く感謝いたします。

利益相反自己申告：申告すべきものなし