

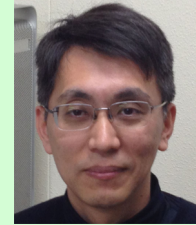
試験管内ネフロン誘導法に基づくヒト腎臓の病態解明と再構築

Kidney reconstitution and disease modeling based on nephron induction methods in vitro

課題番号：17H06177

西中村 隆一（NISHINAKAMURA, RYUICHI）

熊本大学・発生医学研究所・教授



研究の概要（4行以内）

腎臓は、ネフロン前駆細胞、尿管芽、間質前駆細胞という3つの前駆組織の相互作用によって形成される。本計画は、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞から、以前に報告したネフロン前駆細胞に加えて尿管芽の誘導法を開発し、これを基盤にヒト遺伝性腎臓疾患の初期病態を解明するとともに、間質前駆細胞をも誘導して3次元腎臓組織を再構築することを目指す。

研究分野：腎臓学、発生生物学

キーワード：腎臓発生、iPS 細胞、ネフロン前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

腎不全による人工透析患者数は増加の一途で33万人となり、年間1.5兆円の医療費がかかっている。一方で腎移植はドナー数の不足に悩まされている。そのため腎臓の再生医療が期待されるが、この複雑な臓器を作成することは極めて困難とされてきた。申請者は Sall1 遺伝子の単離を発端に、糸球体と尿管への分化能をもつネフロン前駆細胞が胎児期に存在することを証明した。そしてその起源が胎生8.5日のマウス胎仔後端部にあることを見出し、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞を経由して3次元の糸球体と尿管を誘導することに成功した (Taguchi et al. Cell Stem Cell 2014)。さらにこれを免疫不全マウスに移植することによって、ヒト糸球体と血管が繋がることも報告した (Sharmin et al. J Am Soc Nephrol 2016)。これらは世界に先駆けた画期的成果である。とはいえ現時点で誘導できる腎臓組織は小さく、尿を作らない。これは腎臓を構成するもう一つの前駆組織である尿管芽がないからである。尿管芽はその周囲でネフロン前駆細胞を自己複製させつつ分化を促すことによって、大きくかつバランスのとれた腎臓組織を誘導する。同時に自らは複雑に分岐して集合管・尿管を形成することによって、尿の排出路を形成する。よって尿を産生・排出する腎臓を作るには、尿管芽が必要不可欠である。

2. 研究の目的

腎臓は、ネフロン前駆細胞、尿管芽、間質前駆細胞という3つの前駆組織の相互作用によって形成される。我々は以前に多能性幹細胞からネフロン前駆細胞を試験管内で誘導できることを報告した。そこで本計画は、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞から、ネフロン前駆細胞に加えて尿管芽の誘導法を開発し、これを基盤にヒト遺伝性腎臓疾患の初期病態を解明するとともに、第3の前駆組織である間質前駆細胞も誘導して3次元腎臓組織を再構築することを目的とする。これらによってヒト腎臓発生学と呼ぶべき領域を開拓し、病態解明とともに、移植治療を視野に入れた腎臓作成に向けて大きく前進したい。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞からのネフロン前駆細胞誘導法を用いて糸球体を作成し、その成熟機構を明らかにするとともに、糸球体が障害される遺伝性腎臓疾患由来の iPS 細胞を使って病態を再現し、そのメカニズムを解明する。

尿管芽に関しては、マウス ES 細胞を使って誘導法を開発し、それをヒト iPS 細胞に応用して誘導法を確立する。それを遺伝性腎臓疾患に適用することで、病態を再現し、メカニズムを解明する。

さらにマウス ES 細胞から間質前駆細胞の誘導法を開発し、ネフロン前駆細胞、尿管芽との組み合わせ法を検討して、生体に近い腎臓構造を再構築する。これらの知見をヒトに応用して、3次元のヒト腎臓組織を作成することを目指す。

4. これまでの成果

糸球体濾過膜の構成分子に点変異をもつ先天性ネフローゼ症候群の患者から樹立した iPS 細胞を、糸球体を含む腎臓組織に誘導することによって、この先天性腎疾患の初期病態を再現することに成功した。患者 iPS 細胞からは濾過膜前駆体の形成が見られず、細胞膜に移行すべき構成分子の発現は減弱し細胞質内に留まっていた。さらに変異をゲノム編集によって矯正したところこれらの症状が消失したため、この変異が疾患の原因であることが確定した。つまり、変異によって構成分子が糸球体ポドサイトの膜上まで移行できないため、濾過膜が形成されず蛋白尿を発症することが明らかになった。並行して、iPS 細胞から誘導したネフロン前駆細胞を高純度で増幅し、凍結できる方法及び選択的糸球体誘導法を開発した。これらの方法は患者由来 iPS 細胞への応用が期待される。

一方、胎児期の発生を遡ることで、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞から尿管芽を誘導する方法を開発した。尿管芽の誘導法は、ネフロン前駆細胞のそれと最初のステップから異なっており、尿管芽とネフロン前駆細胞が発生の極めて初期に系譜分離していることが示唆された。さらにマウス ES 細胞由来の尿管芽とネフロン前駆細胞にマウス胎仔由来の間質前駆細胞を凝集させると、分岐する尿管芽の周囲にネフロンが配置された腎臓の高次構造が再現できた。単一のプロトコルではなく、別々の方法で誘導した複数の前駆細胞を組み合わせることで臓器本来の構造が再現できるというコンセプトを提唱したものである。一方で、腎臓の高次構造はネフロン前駆細胞と尿管芽を組み合わせるだけでは形成されず、第3の前駆細胞である間質前駆細胞も必須であることが明らかになった。

5. 今後の計画

iPS 細胞を用いた糸球体疾患の再現に成功したので、より詳細なメカニズムを解析するとともに、尿管芽誘導法を用いたヒト遺伝性腎疾患の再現を試みる。また間質細胞の多様性と起源を解析し、マウス ES 細胞から間質前駆細胞への誘導法を開発する。それをネフロン前駆細胞、尿管芽と組み合わせることで、全て ES 細胞由来の腎臓の高次構造を再構築する。得られた方法・知見をヒト iPS 細胞に展開して、ヒト間質前駆細胞の誘導法を開発し、最終的には高次構造をもったヒトの腎臓組織を作製することを目指している。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Yoshimura Y and Nishinakamura R. Podocyte development, disease, and stem cell research. **Kidney Int** 96, 1077-1082, 2019. Review
2. Nishinakamura R. Human kidney organoids: progress and remaining challenges. **Nat Rev Nephrol** 15, 613-624, 2019. Review
3. Tanigawa S, Naganuma H, Kaku Y, Era T, Sakuma T, Yamamoto T, Taguchi A, and Nishinakamura R. Activin is superior to BMP7 for efficient maintenance of human iPSC-derived nephron progenitors. **Stem Cell Reports** 13: 322-337, 2019.
4. Yoshimura Y, Taguchi A, Tanigawa S, Yatsuda J, Kamba T, Takahashi S, Kurihara H, Mukoyama M, and Nishinakamura R. Manipulation of nephron-patterning signals enables selective induction of podocytes from human pluripotent stem cells. **J Am Soc Nephrol** 30:304-321, 2019.
5. Tanigawa S, Islam M, Sharmin S, Naganuma H, Yoshimura Y, Haque F, Era T, Nakazato H, Nakanishi K, Sakuma T, Yamamoto T, Kurihara H, Taguchi A, and Nishinakamura R. Organoids from nephrotic disease-derived iPSCs identify impaired NEPHRIN localization and slit diaphragm formation in kidney podocytes. **Stem Cell Reports** 11: 727-740, 2018.
6. Taguchi A and Nishinakamura R. Higher-order kidney organogenesis from pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell** 21:730-746, 2017.

7. 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/