

185. iPS 細胞由来腎臓細胞の成熟法の開発

西中村 隆一

熊本大学 発生医学研究所 腎臓発生分野

Key words : 腎臓発生, iPS 細胞, 糸球体, ポドサイト

緒言

慢性腎不全による国内の人工透析患者は 32 万人を越えており、医療費は年間 1.5 兆円に達する。腎機能を完全に回復させる内科的治療は存在せず、腎移植が唯一の根治療法であるが、ドナーは決定的に不足している。このような状況の中、我々は腎臓発生機構を解明することによって、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞から糸球体と尿細管という腎臓の 3 次元構造を試験管内で効率よく誘導することに成功した [1]。糸球体は血液を濾過して原尿を作る装置である。試験管内で誘導された腎臓組織には当然濾過能はないものの、球状の糸球体構造が多数形成された。しかしその細胞形態は依然未熟であった。そこで、本計画ではこの腎臓組織、特に糸球体をさらに成熟させる方法を *in vitro* 及び *in vivo* で開発することを目的とした。

方法

ヒト iPS 細胞は 201B7 株、あるいはネフリン遺伝子座に GFP を挿入した株を用いた。後者は TALEN 及びノックインベクターを electroporation で 201B7 株に導入し、相同組換え体（ヘテロ接合体）を単離した。確認は genomic PCR 及び Southern blot で行った。これらを我々が開発した方法 [1] によって 14 日かけてネフロン前駆細胞に誘導した後、マウス胎仔脊髄と共培養した（脊髄は Wnt の供給源であり、ネフロン前駆細胞から分化を開始させるために使用される）。培養液にフィルターを浮かべて気相・液相界面での器官培養を 9 日間行った。形成された腎臓組織をトリプシンで解離し、GFP あるいはネフリン抗体による FACS でポドサイトを単離した。それをラミニンあるいはコラーゲンコートしたプレートに播種し、様々な培地で培養を行った。

移植に関しては、誘導したネフロン前駆細胞をマウス脊髄と共培養して 1 日後（つまり分化を開始させた後）、免疫不全マウス（NOD/SCID/JAK3 欠損マウス）の腎臓皮膜下に移植した。移植に際しては、直径 1 mm のアガロースロッドを作成して 2 本を皮膜下に挿入し、皮膜下のスペースを広げた後、V 字型に配置して固定した。2 本のロッドの間にできたスペースに上記の誘導組織を移植し、10 日後及び 20 日後に解析した。

結果

1. 腎臓糸球体の *in vitro* での成熟法

腎臓に流れてきた血液は、毛細血管が糸玉のような糸球体という構造で濾過される（図 1）。糸球体血管周囲にはポドサイトと呼ばれる上皮細胞が張り付いており、血管内皮と接する基底膜側に多数の複雑な突起（足突起）をもち、その間にはスリット膜と呼ばれる分子の篩が存在する。これによって血液中の水分は通り抜けるが血中蛋白質の大部分は尿に漏れないようになっている。濾過された原尿は尿細管へと送られ、塩分、水分、糖分等が再吸収されて、不要な分のみが尿として排出される。糸球体ポドサイトのスリット膜の主な構成分子はネフリンである。そこで我々は、誘導ポドサイトを可視化できるように、ネフリンの遺伝子座に緑色蛍光タンパク（GFP）を挿入したヒト iPS 細胞を作製した [2]。これを腎臓に誘導してポドサイトを単離し、遺伝子発現を解析すると、生体のポドサイトで重要な働きを持つことが知られているネフリン、ポドシン、NEPH1 をはじめ多くの遺伝子が発現していることが判明した。

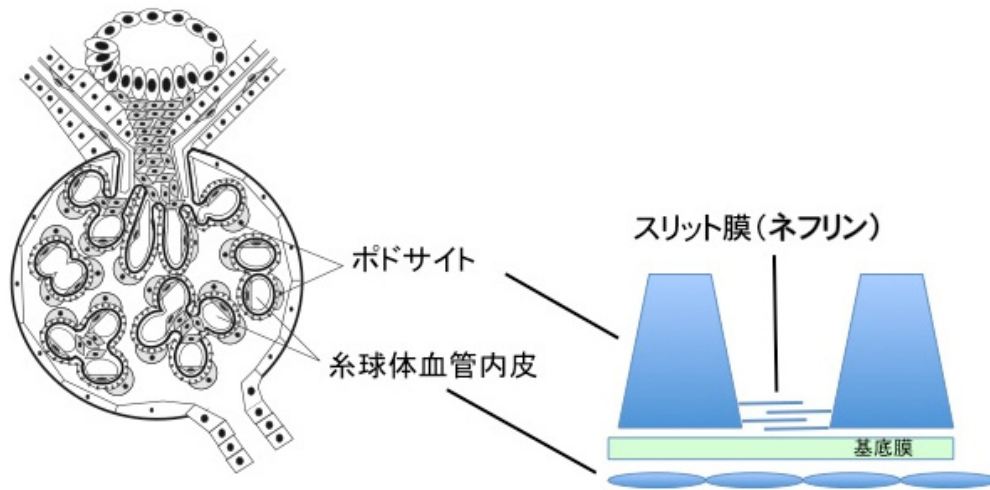


図1. 糸球体とスリット膜の構造

この過程で GFP あるいはネフリン抗体を用いて、ヒトポドサイトを FACS で単離することが可能になった (図2)。そこでこの純化したポドサイトを使って2次元での培養を試みた。ポドサイトがラミニンでコートしたプレートに接着することを見出し、その条件下で各種培地を試したが、いずれも数日で扁平化し、ネフリン等のポドサイト特異的なマーカーが急激に低下した。これは生体のポドサイトを培養する際にも見られることであり、ここがポドサイト研究のボトルネックになっている。スリット膜の形成・成熟機構を再現できれば、スリット膜に異常が起きて蛋白尿を呈する疾患の治療薬開発にもつながる。しかし薬剤スクリーニングには2次元の *in vitro* 系が必須であり、マイクロデバイスも含めた培養法を検討する必要がある。

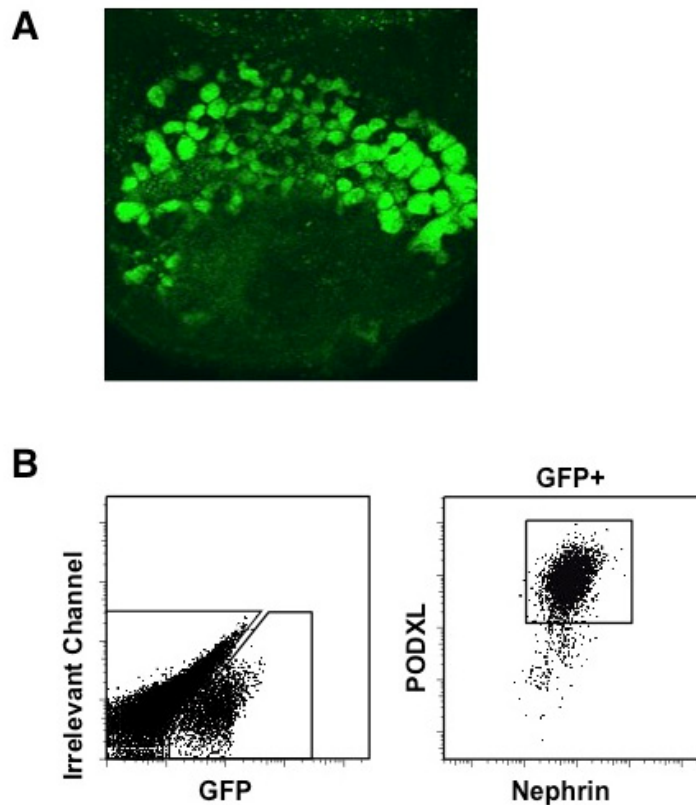


図2. ヒトポドサイトの FACS による単離

A : GFP で糸球体が光るヒト腎臓組織

B : GFP 及びネフリン抗体を使った FACS によるポドサイトの単離

2. 腎臓糸球体の *in vivo* での成熟法

iPS 細胞から誘導した糸球体には血管内皮細胞が存在せず、ポドサイトのみで構成されていた。球状で複雑な構造がポドサイト 1 種で構築できるのは驚きであったものの、糸球体が血液をろ過する装置である以上、血管内皮の存在は必須である。また誘導ポドサイトの突起は生体ほど複雑ではなく、スリット膜も未熟な構造が認められるだけであった。その一つの原因として、ポドサイトが本来相互作用すべき細胞、つまり血管内皮細胞と接していないことが考えられた。生体のポドサイトは血管内皮由来成長因子 (VEGF) 等の分泌によって血管内皮細胞を引きつけることが知られており、実際 iPS 細胞から誘導したポドサイトも VEGF を発現することが我々のマイクロアレイ解析で確認された。そこで、ヒト iPS 細胞由来のネフロン前駆細胞に 1 日だけ分化誘導をかけた後に免疫不全マウスに移植すると、20 日目には、ヒトの糸球体に多数のマウス血管が入り込んだヒト糸球体が観察された [2]。さらにポドサイトの突起 (足突起) は複雑化し、突起間に電子顕微鏡で線状に見えるスリット膜様構造が確認された (図 3)。また、スリット膜の下流にあたる糸球体管腔 (ボーマン嚢) は拡張し、沈殿物の堆積が認められ、血液からのろ過を示唆する所見と考えられた。ヒトポドサイトとマウス血管内皮という異種間ではあるが、血管内皮との相互作用がポドサイトの成熟に寄与する可能性を示唆している。それを司るものには、血管内皮由来の液性因子、酸素、あるいは張力などの候補が考えられ、今後の検討が必要である。

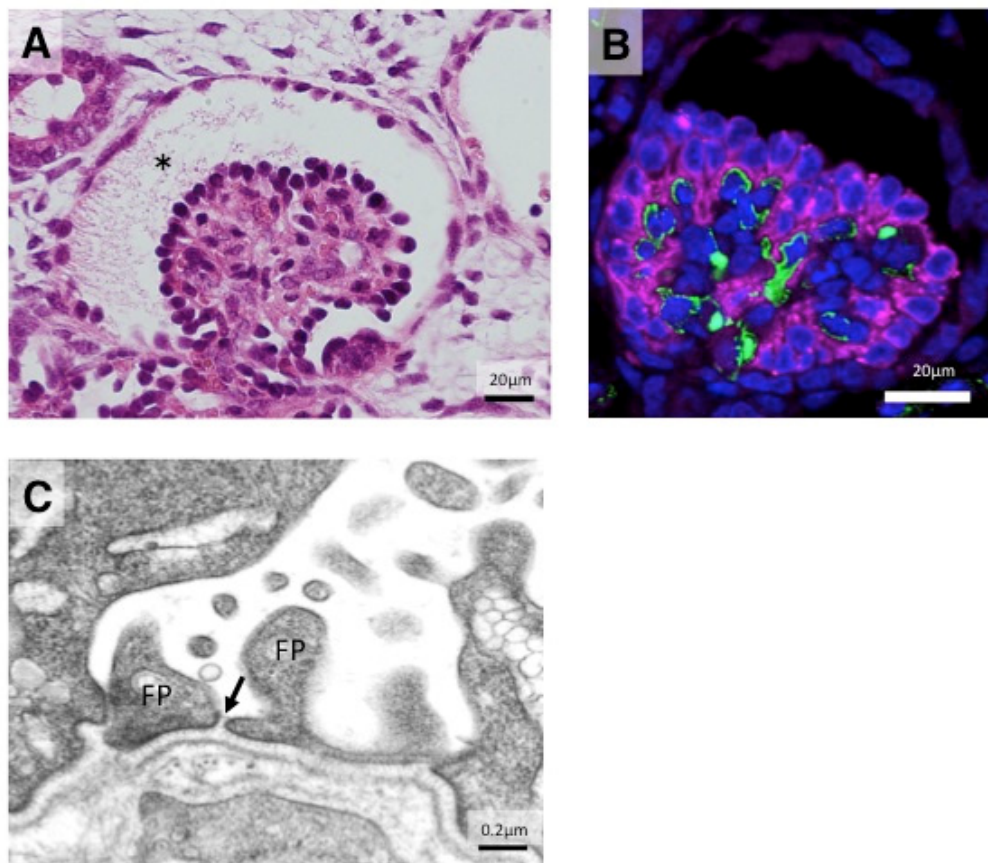


図 3. 移植によるヒト糸球体への血管の取り込みとポドサイトの成熟化
A: ヒト iPS 細胞由来糸球体の HE 染色。ボーマン嚢内に沈殿物 (*) が見られる。
B: 糸球体への血管の取り込み。マゼンタ: ポドサイト、緑: 血管内皮
C: 電子顕微鏡観察によるポドサイトの足突起 (FP) とスリット膜 (矢印)

考 察

ヒト iPS 細胞由来の腎臓糸球体が生体の血管とつながった報告はこれが初めてである。とはいえ、その血管は極めて細い。太い血管が腎動脈から腎門部を経て皮質の糸球体へ入り、さらに尿細管周囲に分布するという複雑な走行を再現することは、現時点では難しい課題である。しかし腎臓の過機能にとって豊富な血流は必須であり、その再構築に挑戦する必要がある。

また近年、患者からの iPS 細胞が比較的容易に樹立できるようになっていることから、疾患を試験管内で再現して病態を解析し、さらには創薬へ応用しようとする試みが盛んにおこなわれている。我々もスリット膜に異常が起きて蛋白尿を呈するネフローゼ症候群の患者から iPS 細胞を樹立し、病態の再現に取り組んでおり、有望な結果を得つつある。しかし、現時点で誘導できる発生段階以上には解析ができない。成熟法がより進化すれば、それが可能になるとともに、より後期に発症する腎疾患の病態再現も視野に入ってくると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は熊本大学発生医学研究所の太口敦博、Sazia Sharmin である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, and Nishinakamura R. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2014 Jan 2;14(1):53-67. DOI: 10.1016/j.stem.2013.11.010.
- 2) 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*. 2016 Jun;27(6):1778-91. DOI: 10.1681/ASN.2015010096.