

【目的】先天性腎尿路異常 (Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract : CAKUT) は、腎尿路におけるさまざまな形態形成異常、奇形、機能異常を伴う病態である。胎生組織である中腎管から派生する尿管芽の形成が障害を受けることによって CAKUT が引き起こされる。腎不全の進行に伴い、保存期腎不全管理、透析療法などの対症療法や腎移植が実施されているが、根治的な治療法は確立されていないのが現状である。したがって、CAKUT に対する予防および治療方法の確立や医薬品の開発が切望されており、そのためには新規病態モデルの開発に応用可能なヒト中腎管および尿管芽組織を確保することが急務である。ヒトのすべての体細胞に分化可能な iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) は、中腎管および尿管芽組織を作製するための有効な手段になりうる。国内外のグループに先駆け、我々はヒト iPS 細胞から中腎管細胞を平面培養によって高効率に分化誘導し、中腎管細胞から成る単層連続上皮組織を誘導することで、生体内と同様に極性を有し、幾度も分岐する尿管芽オルガノイドを作製することにも成功している。しかしこの方法では、自己組織化を促すことで中腎管組織を誘導しているため、尿管芽オルガノイドの大きさや形を調節することが可能となっていない。腎尿路における形態形成の異常や奇形のような変化が生じることを定量的に評価可能なモデルを構築するためには、大きさや形の違いを極力無くした均一なオルガノイドを作製することが必要である。そこで本研究では、中腎管細胞の増殖を促す細胞外基質を探索し、その細胞外基質との混合溶液を微小な管に流し、固定化することによって中腎管ファイバーの作製を試みる。そして、作製する中腎管ファイバーから規則的に尿管芽を発芽させる培養方法の開発を目指す。

【方法】中腎管ファイバーを作製するためには、iPS 細胞から高効率に中腎管細胞を分化誘導することで必要な細胞数を確保することが不可欠である。そこで、iPS 細胞からの分化誘導の最初のステップである原始線条への分化誘導効率を向上させる方法の開発を試みた。次に、中腎管細胞の分化や増殖を促す細胞外基質の探索を行い、尿管芽オルガノイドを作製可能な細胞外基質を検証した。そして、中腎管細胞を多糖類の一種であるアルギン酸カルシウムの微小な管に充填することで中腎管ファイバーの作製を行い、尿管芽誘導因子を含む培地を用いて培養することで尿管芽が形成されるか否かを検証した。

【結果】iPS 細胞から中腎管細胞を効率良く分化誘導するためには、最初のステップである原始線条を高効率で作製することが重要であると考えた。そこで細胞骨格に着目することで、ROCK 阻害剤である Y-27632 を用いる方法を確立した。次に、中腎管細胞の分化や増殖を促す細胞外基質を探索し、マウス腫瘍由来の基底膜成分を含む Geltrex が効果的であることを見出した。さらに、マトリゲルを用いることでのみ中腎管細胞塊から尿管芽オルガノイドを作製することができ、マトリゲルの主成分であるラミニタンパク質では尿管芽オルガノイドを誘導できないことが分かった。そして、中腎管細胞塊とマトリゲルをアルギン酸カルシウムの微小な管に充填して培養したところ、一部に尿管芽の形成を認めた。しかし、細胞塊に含まれる中腎管以外の細胞の増殖も促され、ファイバーの大半はそれらの細胞が占めることが分かった。これらの結果から、今後はフローサイトメーターなどを用いることで単離した中腎管細胞のみから成るファイバーの作製方法の確立を試みる。そして、共培養などにより尿管芽の形成を制御する方法の開発を目指す。

中腎管ファイバー作製の模式図

