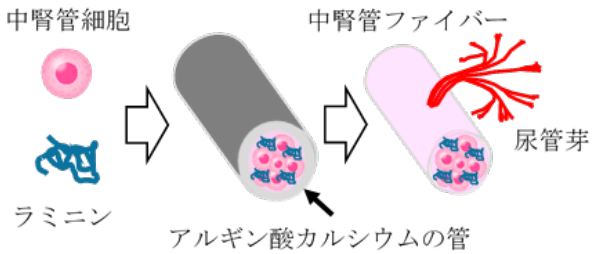
202　中腎管ファイバーを用いた尿管芽オルガノイドの作製	前　伸一

【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ン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



202. 中腎管ファイバーを用いた尿管芽オルガノイドの作製

前　伸一

京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門

Key words：中腎管，尿管芽，iPS 細胞，細胞外基質，オルガノイド

緒　言

先天性腎尿路異常（Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract：CAKUT）の大半は、集合管および下部尿路系に分化する尿管芽の形態形成異常により嚢胞を生じることが知られている。CAKUT によ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、予防および根治的な治療方法は確立されていないのが現状である。

近年、中腎管および尿管芽組織を作製するための有効なツールとして、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）が注目されている。これまでに我々は、国内外のグループに先駆け、腎臓発生過程を段階的に模倣することによってヒト iPS 細胞から中腎管細胞を平面培養によって作製し、単層連続上皮組織の尿管芽オルガノイドを作製することにも成功している。作製した尿管芽オルガノイドは、頂底極性を有し、幾度も分岐する生体内と同様の性質を有していた［1］（論文投稿中）。しかしこの方法では、中腎管細胞から中腎管組織を誘導し、尿管芽オルガノイドの形成が起こる過程を、自己組織化に頼っているため、オルガノイドの大きさや形は不均一であるため、CAKUT によって起こる変化を定量することが困難である。

胚発生において、中腎管は体の左右に 1 本ずつ存在する基底膜で裏打ちされた単層上皮の管組織である。また近年、細胞とコラーゲンなどの混合溶液を微小な管に流しながら固めて培養することで、ファイバー形状の細胞組織を人工的に構築する方法が開発されている［2］。そこで我々は、太さの統一された 1 本の中腎管ファイバーを作製することで、中腎管から発芽する尿管芽に規則性を持たせることができるのではないかと考えた。これらの知見を基に、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。

方法および結果

1.　ヒト iPS 細胞から高効率な中腎管細胞の作製

ヒト iPS 細胞から中腎管細胞を分化誘導する過程における最初の形態変化は、上皮－間葉転換であると考えられる。上皮細胞同士は密着結合や接着結合などにより頂底極性や細胞骨格の極性が保たれているが、上皮－間葉転換でそれらの機能が失われると上皮細胞は遊走能を獲得し間葉細胞へと変化する［3］。したがって、細胞骨格の安定性の阻害が、iPS 細胞から原始線条の分化に関わるのではないかと考えた。そこで、細胞骨格の維持に関わる ROCK の阻害剤である Y-27632 を iPS 細胞から原始線条への分化誘導過程に加えたところ、ROCK の下流である非筋ミオシンⅡおよび上皮マーカーである E-CADHERIN の量が低下することが分かった。さらに、未分化細胞および外胚葉マーカーである SOX2 の陽性細胞はほとんど認められなくなった。

生体内において中胚葉は 3 種類の組織に大別され、その中の 1 つである中間中胚葉から中腎管が派生する［4］。そこで、中間中胚葉マーカーである OSR1 の発現を GFP 発現によってモニタリングすることができる細胞株［4］とフローサイトメーターを用いることで、中間中胚葉を単離し、純化した。我々はこれまでに、中間中胚葉をマトリゲル上で培養することにより中腎管細胞を分化誘導することに成功している。マウスの腫瘍から抽出した細胞外基質である

マトリゲルは、細胞培養において有用な生体材料であるが、ロット間差や、異種動物由来であることなど、医療応用に対して懸念事項が多い。そこで、マトリゲルの主成分がラミニンであることに着目し、中腎管を作製するために、22 種類のヒトラミニンタンパク質を代替品として検討した。中間中胚葉細胞は、検討したヒトラミニンタンパク質をコーティングしたプレートに良好に接着したが、マトリゲルに比べ細胞増殖が抑えられる傾向があることが分かった。一方、乳酸脱水素酵素上昇ウイルスを含まないように改良された生成法で作られたマウス腫瘍由来の細胞外基質である Geltrex は、マトリゲルと同等の細胞接着と細胞増殖を認めた。

2. 尿管芽オルガノイドの作製

中腎管上皮細胞から成る細胞塊は、マトリゲルと増殖因子などを含む培地を用いて浮遊培養することにより自己組織化し、尿管芽オルガノイドを構築する［1］。そこで、22 種類のヒトラミニンタンパク質をマトリゲルと同じタンパク質濃度となるように培地中に添加することで尿管芽オルガノイドを作製可能か検討したが、有効なヒトラミニンタンパク質を同定できなかった（図 1）。その原因を調べるために、ラミニン抗体を用いて免疫染色を行ったところ、マトリゲルを培地中に添加した条件でのみ中腎管上皮細胞塊の周囲がラミニンで覆われていることが分かった。

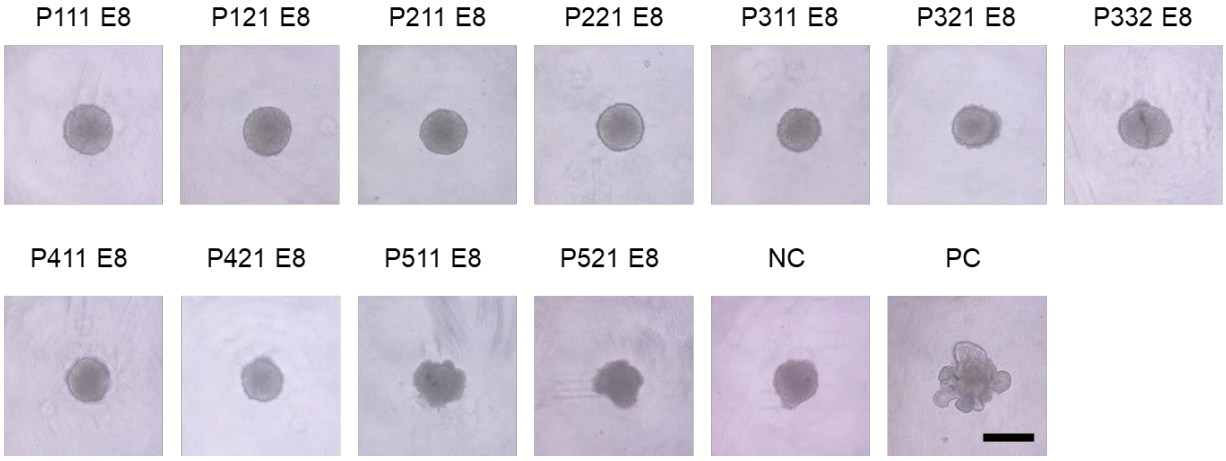


図 1. 尿管芽オルガノイドを作製可能なヒトラミニンタンパク質の探索

各種ヒトラミニンタンパク質を添加して 3 日間培養した中腎管上皮細胞塊の形態写真（スケールバー：300 μm）。P111 E8：パールカン結合ラミニン 111 E8 フラグメント、P121 E8：パールカン結合ラミニン 121 E8 フラグメント、P211 E8：パールカン結合ラミニン 211 E8 フラグメント、P221 E8：パールカン結合ラミニン 221 E8 フラグメント、P311 E8：パールカン結合ラミニン 311 E8 フラグメント、P321 E8：パールカン結合ラミニン 321 E8 フラグメント、P332 E8：パールカン結合ラミニン 332 E8 フラグメント、P411 E8：パールカン結合ラミニン 411 E8 フラグメント、P421 E8：パールカン結合ラミニン 421 E8 フラグメント、P511 E8：パールカン結合ラミニン 511 E8 フラグメント、P521 E8：パールカン結合ラミニン 521 E8 フラグメント、NC：ネガティブコントロール、PC：ポジティブコントロール（マトリゲル）。

3. 中腎管ファイバーの作製と尿管芽の誘導

マトリゲルを代替可能なヒトラミニンタンパク質の同定には至っていないため、マトリゲルと中腎管上皮細胞塊を適切な比率で混合した溶液を調製し、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ファイバーを作製した。作製した中腎管ファイバーを GDNF（グリア細胞株由来神経栄養因子）などの尿管芽誘導因子を含む培養液で培養したところ、ファイバー内での細胞増殖が確認された。免疫染色を行ったところ、一部に尿管芽マーカーである GATA3 および RET 陽性の組織の形成が認められたが、大半は GATA3 陰性の中腎管以外によって占められていることが分かった（図 2）。その原因として、充填した中腎管上皮細胞塊には中腎管細胞に分化していない OSR1 陽性中間中胚葉様細胞が含まれることを確認した。

(a)　　(b)

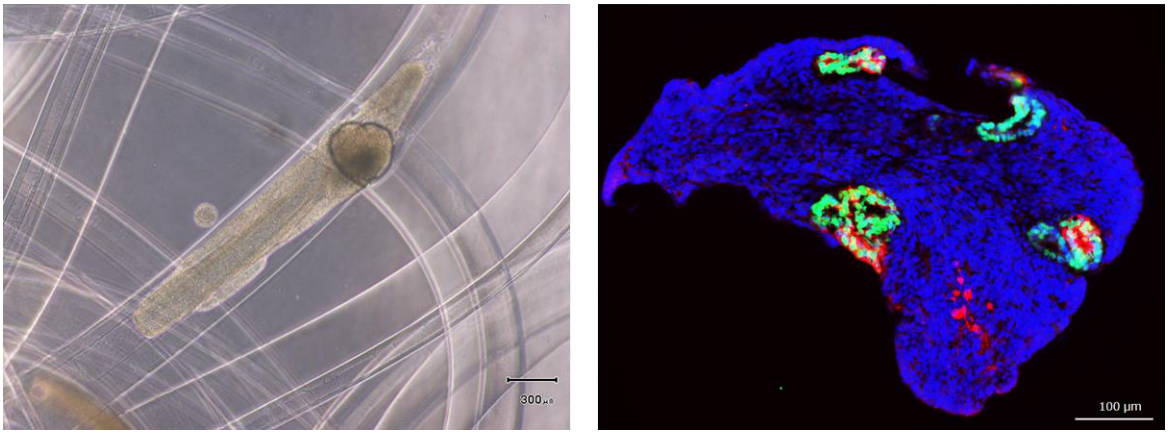


図 2.　中腎管ファイバーの作製

a)　7 日間培養した中腎管ファイバーの明視野像（スケールバー : 300 μ m）。透明なアルギン酸カルシウムの微小な管の中で細胞が増殖している。

b)　a）の切片の免疫染色写真（スケールバー : 100 μ m）。青 : 核、緑 : GATA3、赤 : RET。GATA3 および RET 両陽性の尿管芽様組織の形成が認められる。

考　察

ヒト iPS 細胞からの分化誘導において、Y-27632 は細胞骨格の安定性を阻害することで上皮－間葉転換の起こる原始線条への分化誘導効率を向上させることが示唆された。また、マトリゲルに含まれるラミニン以外の細胞外基質成分が中腎管細胞の増殖を促していることも示唆された。Geltrex ではマトリゲルの欠点であった安全性と各ロット間のタンパク質濃度のばらつきが改善されているため、中間中胚葉から中腎管細胞を分化誘導するための細胞外基質として有用であると考えられた。

研究期間内には、中腎管上皮細胞の自己組織化を促すために有効であり、マトリゲルに代わるヒトラミニンタンパク質を同定することができなかった。ヒトラミニンタンパク質は培地中に添加するだけでは中腎管上皮細胞塊周囲でゲル化することができないため、マトリゲルとヒトラミニンタンパク質の比率を変えて混合することで、自己組織化に有効なヒトラミニンタンパク質を探索する方法の確立が必要である。

さらに、作製した中腎管ファイバー内では中腎管細胞以外が混在した場合、ファイバー内でそれらの細胞が優位に増殖してしまうため、今後は中腎管細胞まで効率良く分化誘導後にもフローサイトメーターなどを用いて中腎管細胞を選択的に単離してからファイバー作製を行わなければならない。そして、作製する中腎管ファイバーの鋳型となるアルギン酸カルシウムの管を、アルギン酸分解酵素を用いて除去し、尿管芽の発芽を制御する方法の開発へと応用する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学 iPS 細胞研究所増殖分化機構研究部門応用再生医学研究分野の長船健二教授、および大阪大学蛋白質研究所の関口清俊教授である。株式会社セルファイバには中腎管ファイバーの作製にご尽力いただいき、心から感謝いたします。

文　献

1) Mae SI, Ryosaka M, Toyoda T, Matsuse K, Oshima Y, Tsujimoto H, Okumura S, Shibasaki A, Osafune K. Generation of branching ureteric bud tissues from human pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2018 Jan 1;495(1):954-961. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29158085 DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.105

2) Onoe H, Okitsu T, Itou A, Kato-Negishi M, Gojo R, Kiriya D, Sato K, Miura S, Iwanaga S, Kuribayashi-Shigetomi K, Matsunaga YT, Shimoyama Y, Takeuchi S. Metre-long cell-laden microfibres exhibit tissue morphologies and functions. Nat Mater. 2013 Jun;12(6):584-90. Epub 2013 Mar 31. PMID: 23542870 DOI: 10.1038/nmat3606

3) Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Feb;7(2):131-42. PMID: 16493418 DOI: 10.1038/nrm1835

4) Mae SI, Shono A, Shiota F, Yasuno T, Kajiwara M, Gotoda-Nishimura N, Arai S, Sato-Otubo A, Toyoda T, Takahashi K, Nakayama N, Cowan CA, Aoi T, Ogawa S, McMahon AP, Yamanaka S, Osafune K. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. Nat Commun. 2013;4:1367. PMID: 23340407 PMCID: PMC4447148 DOI: 10.1038/ncomms2378