慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ヒトES・iPS細胞由来腎臓・血管前駆細胞と脱細胞化技術の融合による新規腎臓再生
Sub Title	The use of human pluripotent stem-cell-derived renal/vascular precursors and organ decellularization for the generation of a kidney organoid
Author	山口, 慎太郎(Yamaguchi, Shintaro)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	3次元構造を有する腎臓再生を実現するための基盤となる研究を行うため, ヒトES/iPS細胞から尿細管細胞への分化誘導方法の検討をkidney specific protein(KSP)を指標に行った。GSK3β阻害剤および尿細管分化培地を用いた2段階のシンプルな培養方法により尿細管細胞へ分化誘導し, 抗KSPモノクローナル抗体を用いて尿細管細胞の純化を行った。KSP陽性細胞は尿細管細胞の機能を有し, Wnt4およびマウス胎児腎との3次元培養により, 尿細管管腔構造を形成した。これらの結果は, KSP陽性細胞が純化された尿細管細胞であることを示し, 今後の腎臓再生のツールとして期待される。 Methods to purify specific types of cells from differentiated human pluripotent stem cells (hPSCs) would be useful to obtain pure populations of specific types of kidney cells. We report a simple two-step differentiation protocol to generate kidney tubular organoids from hPSCs with direct purification of KSP-positive cells using anti-KSP antibody. We differentiated hPSCs into mesoderm cells using a glycogen synthase kinase-3βinhibitor, subsequently cultured cells in renal epithelial growth medium to induce KSP+ cells. We purified KSP+ cells using flow cytometry with anti-KSP antibody, and cultured KSP+ cells in 3D Matrigel, which formed tubular organoids in vitro. KSP+ cells also allowed for the generation of chimeric kidney cultures in which human cells self-assembled into 3D tubular structures in combination with mouse embryonic kidney cells. This approach is useful for generating cells of kidney tubular lineage cells that would be usable as a source for kidney regeneration.
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2014 ~ 2015 課題番号 : 26860643 研究分野 : 腎臓再生
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26860643seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２８　年　　５　月　３１　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2014～2015
課題番号：　２６８６０６４３

研究課題名（和文）ヒトES・iPS細胞由来腎臓・血管前駆細胞と脱細胞化技術の融合による新規腎臓再生

研究課題名（英文）The use of human pluripotent stem-cell-derived renal/vascular precursors and organ decellularization for the generation of a kidney organoid

研究代表者

山口　慎太郎（Yamaguchi, Shintaro）

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：５０４６４８５５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：3次元構造を有する腎臓再生を実現するための基盤となる研究を行うため、ヒトES/iPS細胞から尿細管細胞への分化誘導方法の検討をkidney specific protein (KSP)を指標に行った。GSK 3β阻害剤および尿細管分化培地を用いた2段階のシンプルな培養方法により尿細管細胞へ分化誘導し、抗KSP モノクローナル抗体を用いて尿細管細胞の純化を行った。KSP陽性細胞は尿細管細胞の機能を有し、Wnt4およびマウス胎児腎との3次元培養により、尿細管管腔構造を形成した。これらの結果は、KSP陽性細胞が純化された尿細管細胞であることを示し、今後の腎臓再生のツールとして期待される。

研究成果の概要（英文）：Methods to purify specific types of cells from differentiated human pluripotent stem cells (hPSCs) would be useful to obtain pure populations of specific types of kidney cells. We report a simple two-step differentiation protocol to generate kidney tubular organoids from hPSCs with direct purification of KSP-positive cells using anti-KSP antibody.
We differentiated hPSCs into mesoderm cells using a glycogen synthase kinase-3β inhibitor, subsequently cultured cells in renal epithelial growth medium to induce KSP+ cells. We purified KSP+ cells using flow cytometry with anti-KSP antibody, and cultured KSP+ cells in 3D Matrigel, which formed tubular organoids in vitro. KSP+ cells also allowed for the generation of chimeric kidney cultures in which human cells self-assembled into 3D tubular structures in combination with mouse embryonic kidney cells. This approach is useful for generating cells of kidney tubular lineage cells that would be usable as a source for kidney regeneration.

研究分野：　腎臓再生

キーワード：　腎臓再生　尿細管　ヒト多能性幹細胞

１．研究開始当初の背景

(1)ヒトES/iPS細胞から尿細管細胞への分化誘導

我々は、マウス ES/iPS 細胞において、独自に作成した抗 Kidney Specific Protein (KSP) モノクローナル抗体を用いて純化したKSP 陽性細胞が、尿細管細胞であることを示した (Morizane, Yamaguchi et al. PLoS ONE 2013)。一方で、ヒトES/iPS 細胞から腎系譜の細胞への分化誘導の報告は限られ(Mae et al. Nature communications 2013)、さらに尿細管細胞の直接的な純化法は報告されていない。

(2)脱細胞化技術を用いた 3 次元構造を有する腎臓再生

腎臓の3次元構造の再現は、腎臓組織の複雑性から難しいと考えられてきた。そのような中、腎臓骨格を保持した状態で細胞成分を取り除いた腎臓 (脱細胞化腎) を 3 次元構造再生の足場として用いる手法が注目されている。実際に、ラット脱細胞化摘出腎にヒト臍帯静脈内皮細胞を播種し血管構造の内皮化を行い、ラット新生児腎細胞を注入したところ、尿生成能を持つ腎臓の再生に成功したことが報告された (Song JJ et al. Nature Medicine 2013)。

２．研究の目的

(1)ヒトES/iPS細胞から尿細管細胞への分化誘導

3 次元構造を有する腎臓再生のツールとして使用するため、ヒト ES/iPS 細胞から尿細管細胞への分化誘導法の検討を行う。

(2)脱細胞化技術を用いた 3 次元構造を有する腎臓再生

これまでに我々が確立したヒト ES/iPS 細胞由来の 2 型 VEGF 受容体 (VEGFR-2) 陽性の血管前駆細胞 (Yamaguchi et al. Atherosclerosis 2011)、および本研究で得られる尿細管細胞と脱細胞化腎を用いて3次元構造を有する腎臓再生を実現するための基盤となる研究を行う。

３．研究の方法

(1)ヒトES/iPS細胞から尿細管細胞への分化誘導

現時点で、短期間に効率よくヒト ES/iPS 細胞から尿細管細胞へ分化誘導する方法は確立していないので、その方法の確立を目指した。マウス ES/iPS 細胞の結果より KSP が尿細管への分化の指標として重要であることを見出しており、KSP を指標に尿細管細胞への効率的な分化培養条件を決定した。KSP 陽性細胞を純化するために、我々の研究室で独自に作成した KSP の細胞外ドメインを認識する抗 KSP モノクローナル抗体を用いて Flow Cytometry を行った。さらに、得られた KSP 陽性細胞のキャラクタライズを行った。

(2)脱細胞化技術を用いた 3 次元構造を有する腎臓再生

腎臓は血流が豊富な臓器であり、3 次元的な血管網の構築が必須である。そこで、腎臓骨格および腎内の血管構造を保持した状態で細胞成分を取り除いた脱細胞化腎を再生の足場とする手法に注目した。細胞を抜き去ることで、異種動物の細胞注入による拒絶の心配も無いため、小動物から摘出した腎臓で脱細胞化腎の作製を行う。同時に、3 次元構造を有する腎臓の初期構造体の構築を目指し、脱細胞化腎に注入可能な腎臓・血管前駆細胞(KSP 陽性細胞、VEGFR-2 陽性細胞)の分化誘導、純化を行う。

４．研究成果

(1) ヒト ES/iPS 細胞から尿細管細胞への分化誘導

ヒトES細胞から腎臓の尿細管細胞への分化誘導方法の検討を行った。尿細管細胞の発生は、中間中胚葉、後腎間葉および上皮化の過程を経るため、GSK-3β阻害剤を用い中胚葉への誘導を行った。具体的には、未分化ヒト ES 細胞株(KhES-1)をコラーゲン I コート dish に展開し、GSK3β阻害薬である BIO を 72 時間作用させた。その後、 Renal Epithelial Growth Medium (REGM)に置換し、7 日間培養を行った(Fig.1)。

GSK3β阻害剤により原条のマーカーである *BRACHURY* の発現が亢進し(誘導 3 日目)、その後 REGM に置換することで中間中胚葉のマーカーである *PAX2*、*OSR1* が上昇した(誘導 4 日目)。誘導 8 日目以降には糸球体のマーカーである *WT-1* および尿細管細胞のマーカーである *KSP* の発現の亢進を認めた(Fig.2)。KSP の発現はウェスタンブロットおよび免疫染色でも確認された(Fig.3,4)。一方で、これらの現象は、BIO を投与しないコントロール群(mock 群)では確認されなかった(Fig.1-4)。

KSP 陽性細胞の比率は FACS において約 5%であり、抗 KSP モノクローナル抗体を用いた Flow Cytometry によって陽性細胞の分取に成功した(Fig.5)。KSP 陽性細胞とソート前の細胞の *KSP* の発現量を PCR で比較したところ、KSP 陽性細胞分画で有意に発現が高値であり、陽性細胞が純化されていることが確認された。さらには尿細管マーカーである、*MEGALIN, AQP1, 2* の発現量が有意に高値であり、KSP 陽性細胞が近位尿細管および集合管細胞の性質を持っていることが示唆された(Fig.6)。

KSP 陽性細胞の尿細管細胞としての機能を検討するために、近位尿細管細胞に発現するγ-glutamyl transferase (*GGT*)の発現量の検討およびその機能アッセイを行った。KSP 陽性細胞では GGT により分泌される p-nitroaniline が検出され、近位尿細管細胞としての機能を有することが示された(Fig.7)。

尿細管管腔構造を *in vitro* で再現するため、Matrigel および NIH3T3-Wnt4 を用いて、KSP 陽性細胞を 3 次元培養でさらに分化誘導することで、MEGALIN, AQP1, AQP2 陽性の尿細管構造を形成し、近位尿細管および集合管に分化することが示された(Fig. 8)。

さらに、KSP 陽性細胞をマウス胎児の腎臓細胞と共培養したところ、腎尿細管のマーカーである LTL (Lotus Tetragonolobus lectin) および尿細管上皮細胞の指標である LAMININ 陽性の管腔構造を構築すること確認した(Fig. 9)。この結果は、KSP 陽性細胞が純化された尿細管細胞であることを示している。

以上の研究成果は、ヒト ES 細胞から短期間(10 日間)で尿細管細胞へ分化誘導し、さらには直接的な尿細管細胞の純化が可能であることを初めて示したものであり、*in vitro* での薬剤スクリーニング、疾患の病態解明、腎臓再生のツールになるものと期待される(論文投稿中)。

(2)脱細胞化技術を用いた 3 次元構造を有する腎臓再生

本研究成果により腎臓再生のツールとなる KSP 陽性細胞および、以前に我々が確立した血管内皮および平滑筋細胞への分化能を持つ VEGFR-2 陽性の血管前駆細胞を得ることに成功した。脱細胞化腎の作製およびこれらの細胞の注入を今後予定している。

Fig. 1

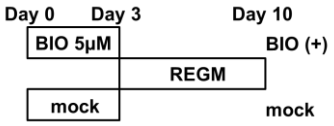


Fig. 2

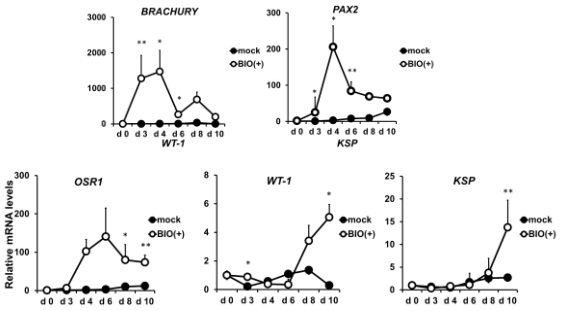


Fig. 3

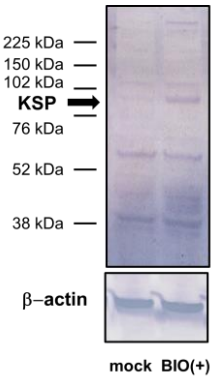


Fig. 4

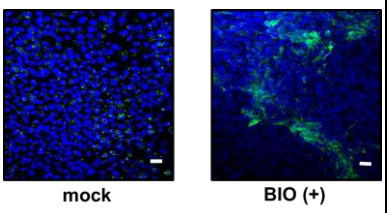


Fig. 5

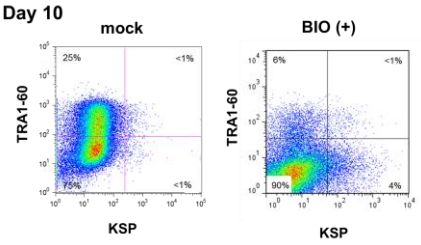


Fig. 6

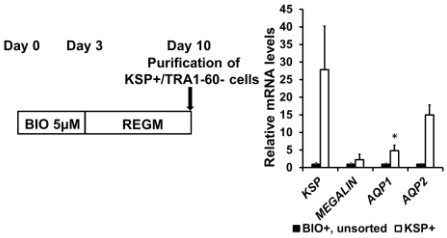


Fig. 7

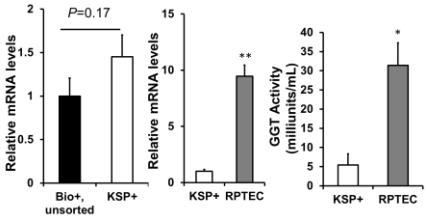


Fig. 8

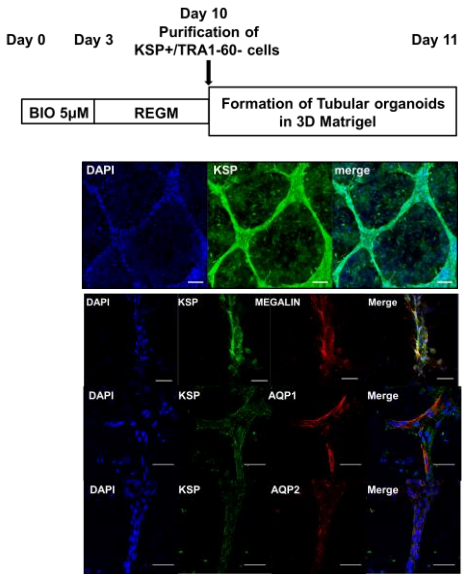
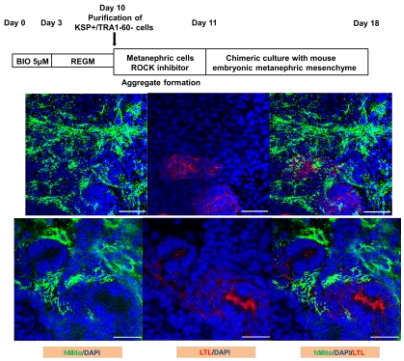


Fig. 9



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計２件）

1. Morizane R, Fujii S, Monkawa T, Hiratsuka K, Yamaguchi S, Homma, K, Itoh H. miR-363 induces transdifferentiation of human kidney tubular cells to mesenchymal phenotype. *Clinical and experimental nephrology*, 1-8, 2015. DOI 10.1007/s10157-015-1167-2 査読あり.
2. Morizane R, Fujii S, Monkawa T, Hiratsuka K, Yamaguchi S, Homma K, Itoh H. miR-34c attenuates epithelial-mesenchymal transition and kidney fibrosis with ureteral obstruction. Scientific reports. 4.2014. doi:10.1038/srep04578 査読あり.

〔学会発表〕（計　0　件）

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　件）

○取得状況（計　0　件）

〔その他〕
なし

６．研究組織

(1) 研究代表者
山口　慎太郎（YAMAGUCHI SHINTARO）
慶應義塾大学医学部　内科　特任助教
研究者番号：50464855

(2) 研究分担者　なし
(3) 連携研究者　なし