



TITLE:

A modular differentiation system maps multiple human kidney lineages from pluripotent stem cells(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kasahara, Tomoko

CITATION:

Kasahara, Tomoko. A modular differentiation system maps multiple human kidney lineages from pluripotent stem cells. 京都大学, 2020, 博士(医科学)

ISSUE DATE:

2020-09-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22748>

RIGHT:

京都大学	博士（医科学）	氏名	笠原 朋子
論文題目	A modular differentiation system maps multiple human kidney lineages from pluripotent stem cells (ヒト多能性幹細胞から複数の腎臓系譜細胞への系統的な分化誘導システムの確立)		
(論文内容の要旨) <p>【目的】腎臓は、胎生初期組織の一つである中間中胚葉から派生する前腎および中腎という二つの一時的な原基が前方から順に形成され、最終的な成体の腎臓のもととなる胎児の後腎は体幹の最後部に生じるという複雑な発生過程を経る。成体腎は、ネフロン前駆細胞を含む後腎間葉と尿管芽の二つの腎前駆組織の相互作用によって発生する。現在、ヒト iPS 細胞を用いて腎オルガノイドを作製した報告は散見されるが、後腎間葉と尿管芽を別個に分化誘導し、その相互作用による器官形成を再現したものは存在しない。そこで、本研究では胎生腎を構成する複数の前駆細胞を誘導するための新規の分化培養システムを確立し、相互連結した腎臓構造の再構築を目的とした。</p> <p>【方法・結果】まず、発生学の知見を集約し、段階的な後腎ネフロン前駆細胞の分化誘導を試みた。具体的には、ヒト iPS 細胞から、中胚葉に分化指向性の高い CDX1 陽性エピプラスト様細胞と中間中胚葉に分化指向性の高い CDX2 陽性後期原始線条を順に誘導し、最後に Activin A を添加することで、後腎ネフロン前駆細胞の起源細胞とされる HOX11 陽性後期後方原始線条細胞を高効率に分化誘導することができた。次に、原始線条細胞からネフロン前駆細胞への誘導因子を組み合わせることにより、SIX2,HOXD11 共陽性の後腎ネフロン前駆細胞を誘導した。同時に、同様の方法にて Activin A を添加しない条件下で誘導を行うことで、SIX2 陽性 HOXD11 陰性の中腎ネフロン前駆細胞様の細胞の作製にも成功した。また、同分化誘導方法において BMP シグナルの勾配を適用することにより、中間中胚葉の分化系譜に隣接する側板中胚葉由来の血管内皮細胞と沿軸中胚葉由来の軟骨細胞の分化誘導にも成功した。</p> <p>最後に、後腎ネフロン前駆細胞と尿管芽を別個に分化誘導し、共培養することで、尿管芽は先端部様上皮構造を形成し、ネフロン前駆細胞由来の S 字体様組織の管腔と結合した。さらに、管腔の結合した腎オルガノイドは糸球体、近位及び遠位尿細管、ヘンレのループ、集合管へと分化した。次に、免疫不全マウスに後腎ネフロン前駆細胞と尿管芽の細胞塊を移植することで in vivo においても腎オルガノイドを作製することに成功し、内部にホストマウス血管と統合した糸球体、近位及び遠位尿細管、ヘンレのループ、集合管の分化も認め、血管化された糸球体はホスト血流と連結していることも確認された。</p> <p>【考察】現在までに報告された多能性幹細胞から腎オルガノイドの作製では、非腎系譜細胞を含んでおり、腎臓構成細胞のみの作製が困難であることが示唆されていた。一方、本研究では同一単層培養系において選択的かつ高効率に複数の腎臓構成細胞を作製することに成功した。さらに、別個に作製したネフロン前駆細胞と尿管芽を組み合わせることより、管状構造の相互連結した腎臓構造を再構築することに成功した。今後、本分化系は、腎臓分化の細胞運命決定のメカニズム解明など発生生物学的解析に加え、先天性腎疾患モデルへの応用、再生治療のための細胞供給源に寄与し得ると考える。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本研究では iPS 細胞から胎生腎を構成する複数の前駆細胞を誘導する新規分化システムを構築し、未確立のヒト腎臓構造の再構築を行った。

まず、発生学の知見を集約し段階的な後腎ネフロン前駆細胞の分化誘導を試みた。ヒト iPS 細胞から中胚葉に分化指向性の高い CDX1 陽性エピプラスト様細胞と中間中胚葉に分化指向性の高い CDX2 陽性後期原始線条を順に誘導し、Activin A を添加することで HOX11 陽性後期後方原始線条を経て後腎ネフロン前駆細胞を高効率に分化誘導できた。また、同方法を改変することにより、中間中胚葉に隣接する側板中胚葉と血管内皮細胞及び沿軸中胚葉と軟骨細胞の分化誘導にも成功した。また、同方法にて Activin A を添加しない条件下で中腎ネフロン前駆細胞の作製にも成功した。最後に、別個に分化誘導した後腎ネフロン前駆細胞と尿管芽を共培養することで、尿管芽は先端部様上皮構造を形成し、ネフロン前駆細胞由来の S 字体様組織の管腔と結合した。さらに、管腔の結合した腎オルガノイドは糸球体、尿細管、集合管へと分化した。in vivo でも同様の結果が認められ、血管化された糸球体はホスト血流と連結していることも確認された。

以上の研究は、ヒト iPS 細胞から腎臓組織を再構築する方法を供給するものであり、腎発生機構と腎疾患病態の解明、再生医療開発に貢献することが期待され、再生医学の進展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医科学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 2 年 7 月 15 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降