



TITLE:

Expansion of human iPSC-derived ureteric bud organoids with repeated branching potential( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Ryosaka, Makoto

---

CITATION:

Ryosaka, Makoto. Expansion of human iPSC-derived ureteric bud organoids with repeated branching potential. 京都大学, 2021, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2021-01-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22879>

RIGHT:

DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107963. © <2020>. This manuscript version is made available under the CC-BY-NC-ND 4.0 license  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

京都大学	博士（医学）	氏名	兩坂 誠
論文題目	Expansion of human iPSC-derived ureteric bud organoids with repeated branching potential（繰り返す分岐形態形成能力を有するヒト iPSC 細胞由来尿管芽オルガノイドの作製と拡大培養）		
<p><b>【背景、目的】</b>  腎臓は、後腎間葉と尿管芽と呼ばれる主に2つの胎生期前駆組織の相互作用によって発生し、後腎間葉はネフロンと間質、尿管芽は集合管から膀胱の一部までの下部尿路を派生させる。ヒト多能性幹細胞から尿管芽様構造の作製に関する数報の報告が存在するが、尿管芽の特徴である繰り返す分岐形態形成能力を有する組織の作製は可能となっていない。ヒト多能性幹細胞を用いた集合管の作製に向けて、十分な分岐能をはじめとする発生学的能力を持つ尿管芽組織を作製することが重要である。そこで本研究では、分岐を繰り返す尿管芽オルガノイドの作製と拡大培養方法の確立、および、その発生学的能力の評価を目的とした。</p> <p><b>【方法、結果】</b>  はじめに、生体内の尿管芽が極性のある管腔構造を有していることに着目し、これを再現するために、以前に開発したヒト多能性幹細胞から尿管芽様構造を誘導する方法を改良した。まず、尿管芽の前駆組織である中腎管の作製ステップにレチノイン酸シグナルのアゴニストである TTNPB を加え、細胞塊作製時に上皮化を促す目的で、中腎管誘導因子（CHIR99021, FGF8, GDNF, LDN193189, TTNPB）を継続して使用することにより、凍結保存が可能な中腎管細胞塊を作製することに成功した。この細胞塊を低濃度マトリゲル含有培地で培養を行ったところ、極性のある管腔構造と、先端部（tip）と幹部（trunk）のドメインおよび複数の発芽部位を有する尿管芽オルガノイド（iUB オルガノイド）を作製することに成功した。作製した iUB オルガノイドの tip 領域を切離培養することにより、新たな iUB オルガノイドを再構築可能であり、シングルセル RNA シークエンス解析にて、単一細胞レベルで tip と trunk の関連遺伝子を発現する別個の細胞集団が iUB オルガノイド内に存在することを確認した。</p> <p>次に、ハイドロゲル上で iUB オルガノイドを解離した単一細胞から tip の性質を有するコロニーを形成する培養条件を開発した。また、tip 細胞が VLDL レセプターを発現していることを見出し、DiI で標識された VLDL を取り込ませることで、tip 細胞をモニタリング可能であることを示した。このモニタリングシステムを用いることにより、tip コロニーが、iUB オルガノイド由来の tip 細胞のみならず、trunk 細胞からも形成されることが明らかになった。また、tip コロニーを浮遊培養することで iUB オルガノイドを再構築できることを示した。以上の結果より、iUB オルガノイドは生体内の尿管芽の機能の多くを再現していることが確認された。</p> <p>さらに、tip コロニーから再構築された iUB オルガノイドに対して、Wnt シグナル阻害剤 IWR1 と TGFβ阻害剤 A83-01 を添加して培養することによって、集合管マーカーである AQP2、FOXA1 が発現する細胞の作製が可能であった。RNA シークエンス解析によって、他の集合管主細胞マーカーや集合管介在細胞マーカーの発現が認められないことから、作製した細胞は胎生7週頃の集合管前駆細胞に相当すると考えられた。</p> <p>最後に、iUB オルガノイドを用いて、先天性腎尿路異常（CAKUT）の1種である多嚢胞性異形成腎（MCDK）の病態モデルを作製するため、責任遺伝子の1つである <i>HNF1β</i> を CRISPR-Cas9 システムによって改変した iPSC 細胞から iUB オルガノイドを作製したところ、MCDK マウスモデルで報告された上皮極性の消失や tip 細胞の減少が認められた。</p> <p><b>【考察、結論】</b>  以上、ヒト iPSC 細胞から生体内のものと類似した発生学的能力を有する尿管芽オルガノイドの作製法、尿管芽 tip 細胞モニタリング法、尿管芽細胞拡大培養法を開発した。これらの手法は再生医療開発、CAKUT モデルの作製や病態解明、創薬といった幅広い分野への応用が期待される。</p>			

（論文審査の結果の要旨）

胎生期腎前駆組織の一つである尿管芽は、樹状分岐構造の形成を繰り返して先端部／幹部の領域化を獲得し、幹部から集合管・尿管などの尿路が発生する。申請者はヒト iPSC 細胞を用いた in vitro 分化誘導により、上記の組織構築形成能と分化能力を有する尿管芽オルガノイドの作成を目指した。

低濃度マトリゲル含有培地を用いた浮遊培養法の導入や分化誘導因子の再検討を含む既報プロトコールの改変により、頂底極性を有する管腔構造が分岐構造形成を繰り返し、先端部／幹部の領域化を有するオルガノイドの作製に成功した。作成された尿管芽オルガノイドは、切離した先端部が新たなオルガノイドを形成する能力や、集合管前駆細胞への分化能力など、マウス胎児尿管芽と類似した機能を獲得していた。また、先端部細胞の拡大培養法と性状評価法を開発し、安定供給への道を開いた。さらに先天性腎尿路異常(CAKUT)の1種である多嚢胞性異形成腎（MCDK）の原因となる *HNF1β* 遺伝子変異を iPSC 細胞に導入し、尿管芽オルガノイドを作製したところ、マウスモデルで報告されている MCDK の病態を再現していることを示した。

以上の研究は iPSC 細胞を用いた尿管芽系譜組織の再生医療開発だけでなく CAKUT をはじめとする腎・尿路疾患のモデル作成による病態解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）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11月11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