

学位論文抄録

Generation of the organotypic kidney structure
by integrating pluripotent stem cell-derived renal stroma
(多能性幹細胞由来の間質の統合による腎臓高次構造構築)

田中悦子

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻発生・再生医学研究者育成コース

指導教員

西中村 隆一 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻腎臓発生学

Abstract of the Thesis

Background and Purpose: Organs consist of the parenchyma and stroma, the latter of which coordinates the generation of organotypic structures. Despite recent advances in organoid technology, induction of organ-specific stroma and recapitulation of complex organ configurations from pluripotent stem cells (PSCs) have remained challenging. The embryonic kidney forms its complex structure by nephron progenitors (NPs), ureteric bud (UB) and stromal progenitors (SPs), and my laboratory established the protocols to induce NPs and UB from PSCs. Thus, my purpose is establishment of an *in vitro* induction protocol for stromal progenitors from PSCs and generation of completely PSC-derived kidney organoids with the complex kidney structure.

Methods: I searched for the SP-specific genes and signaling-related genes along the dorsoventral axis of the renal stroma, by using single cell RNA sequencing (scRNA-seq) analysis of mouse embryos. To establish the culture condition to induce dorsal SPs that contribute to the intrarenal stroma, I isolated the posterior intermediate mesoderm (IM), which is the origin of SPs, from mouse embryos, and cultured the cells in the presence of growth factors. Next, we induced dorsal SPs from mouse ES cells (ESCs) based on the protocol obtained from the mouse embryo experiments. Finally, we aggregated SPs, NPs and UB that were induced from mouse ESCs.

Results: scRNA-seq analysis and the culture of the posterior IM revealed that FGF and BMP signaling regulates the dorsoventral patterning of SPs. I found that the PDGFRA+/ROBO2+ cells represented the posterior IM of the mouse embryos, and that culture of these cells with Y27632, retinoic acid, FGF, SHH and BMP inhibitor (YRFSL condition) could induce dorsal SPs. We next applied this condition to mouse ESCs, and successfully induced the dorsal SPs that could generate the kidney organoids with the higher-order structure, when combined with ESC-derived UB and NPs. Finally, transplantation of the completely ESC-derived kidney organoids promoted their further development: multiple types of interstitial cells (cortical and medullary stroma, mesangial cells, and renin cells) and parenchyma (nephrons and UBs/collecting ducts) were generated.

Conclusions: By elucidating the molecular features of the renal stromal lineages at a single-cell resolution *in vivo*, we established the protocol to induce dorsal SPs from mouse ESCs *in vitro*. Inclusion of the induced SPs enabled the generation of organoids that consisted of branching UBs with multiple nephrons. Furthermore, the induced SPs differentiated into multiple types of interstitial cells in the completely ESC-derived kidney organoids upon transplantation.

学位論文抄録

[目的] 腎臓は、ネフロン前駆細胞と尿管芽、間質前駆細胞の 3 種類が相互作用して発生する。所属研究室ではこれまでに多能性幹細胞からネフロン前駆細胞と尿管芽の誘導法を確立してきた。さらに腎臓に特徴的な高次構造を構築するには、この二つに加えて間質前駆細胞を組み合わせることが必須であることも報告している。そこで、腎臓の間質前駆細胞を多能性幹細胞から分化誘導し、完全に多能性幹細胞由来の腎臓高次構造を構築することを目的とした。

[方法] マウス胎仔のシングルセル RNA シークエンス (scRNA-seq) 解析を行い、腎臓間質の発生過程における発現遺伝子やシグナルを同定した。その情報を元に、腎臓間質の起源である後方中間中胚葉をマウス胎仔から採取して成長因子を加えて培養し、間質前駆細胞に特徴的な遺伝子が発現する条件を RT-qPCR 解析で検討した。この条件を使って、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) から間質前駆細胞を誘導した。更に、ES 細胞から誘導した間質前駆細胞とネフロン前駆細胞、尿管芽を凝集して培養し、完全に ES 細胞由来の高次構造を持つ腎臓オルガノイドを作製した。

[結果] scRNA-seq や細胞系譜追跡によって、マウス胎生 11.5 日の腎臓間質は、背腹軸に沿って 3 種類に分かれていることを見出し、それぞれに発現する特徴的遺伝子やシグナル関連遺伝子を同定した。腎臓内の間質に分化するのは最も背側に位置する *Foxd1* 陽性の間質前駆細胞であり、これを胎生 9.5 日の後方中間中胚葉から誘導した。この過程で、背腹軸のパターニングが FGF と BMP シグナルによって制御されていることを見出した。さらに、胎生 9.5 日胚の scRNA-seq 及び FACS 解析から、後方中間中胚葉が PDGFRA+/ROBO2+ 分画として単離できること、そこから Y27632、レチノイン酸、FGF、SHH、BMP 阻害剤の添加 (YRFSL 条件) によって背側間質前駆細胞が誘導できることを明らかにした。この細胞を、マウス胎仔から採取したネフロン前駆細胞および尿管芽と凝集すると、尿管芽の分岐が認められた。

次に、ネフロン前駆細胞誘導法の前半部を用いてマウス ES 細胞から後方中間中胚葉まで誘導した PDGFRA+/ROBO2+ 細胞を、YRFSL 条件で培養した。誘導された間質前駆細胞は、ES 細胞から誘導したネフロン前駆細胞及び尿管芽との凝集により、*in vitro* で高次構造を持つ腎臓オルガノイドを形成した。更に、マウス腎被膜下に移植することで複数種の間質細胞 (皮質、髄質、メサンギウム細胞など) に分化し、新生児期の腎臓間質で見られる遺伝子を発現した。

[考察] 腎臓間質前駆細胞の *in vivo* での発生過程をシングルセルレベルで解析し、多能性幹細胞から *in vitro* で腎臓間質前駆細胞を誘導することができた。この知見がどこまでヒトに応用可能なのか検討が必要である。また、尿管を介して尿を排出するオルガノイド作製には、尿管周囲の間質に寄与する前駆細胞の誘導も必須である。

[結論] 腎臓間質前駆細胞の分化には FGF と BMP シグナルによる背腹軸のパターニングが重要であることを見出し、生体内の発生学的知見を *in vitro* で再現することで、間質前駆細胞の誘導及び完全に多能性幹細胞に由来する高次構造を持ったマウス腎臓オルガノイド作製に成功した。更に、多能性幹細胞由来腎臓オルガノイドは、マウスへの移植によって多種の間質や実質細胞に分化・成熟した。これらの結果をヒト iPS 細胞に応用することで、高次構造を持ったヒト腎臓の構築が期待される。