

## 田中 悦子 氏の学位論文審査の要旨

### 論文題目

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)

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2つに間質前駆細胞を組み合わせたことが必須である。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。

方法として、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。その情報を基に、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後に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発現の条件を RT-qPCR 解析で検討した。この知見を使って、マウス胚性幹細胞(ES 細胞)から間質前駆細胞を誘導し、さらに ES 細胞由来間質前駆細胞とネフロン前駆細胞、尿管芽とを凝集して培養することにより、完全に ES 細胞由来の高次構造をもつ腎臓オルガノイドの作製を試みた。

その結果、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。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、この形成過程での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ることを見出した。さらに、胎生 9.5 日胚の scRNA-seq および FACS 解析から、後方中間中胚葉が PDGFRA<sup>+</sup>ROBO2<sup>+</sup>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。さらに、上記条件にてマウス ES 細胞から後方中間中胚葉まで誘導した PDGFRA<sup>+</sup>ROBO2<sup>+</sup>細胞を YRFSL 条件で培養した後、ES 細胞由来ネフロン前駆細胞および尿管芽と凝集することにより、*in vitro* で高次構造をもつ腎臓オルガノイドが形成された。これをマウス腎被膜下に移植すると、複数の間質細胞(皮質、髄質、メサンギウム細胞など)への分化、および新生児期の腎臓間質でみられる遺伝子発現が確認された。

以上から、腎臓間質前駆細胞の分化には FGF と BMP シグナルが重要であることを示し、生体内の発生学的知見を *in vitro* で再現することで、完全に多能性幹細胞に由来する高次構造をもつマウス腎臓オルガノイド作製に成功した。さらに、この腎臓オルガノイドを移植すると種々の間質細胞への分化・成熟が認められた。これらの結果をヒト iPS 細胞に応用することで、高次構造をもつ腎臓の構築の可能性が示唆された。

審査では、1) scRNA-seq の方法と結果の解釈、2) 個々の遺伝子改変マウスの作製方法、3) *in vivo* 移植における糸球体血管の由来、4) *in vitro* で作製したオルガノイドと移植実験での高次構造の差異、5) *in vivo* 移植における実際の糸球体濾過の有無、6) ネフロン前駆細胞や尿管芽との相互作用とその機序、7) 間質細胞の定義、8) 実験手技や結果の再現性、9) 研究における申請者の寄与度、10) ヒト iPS 細胞を用いた検討と今後の腎臓再生への展望、などについて質問がなされ、申請者から概ね適切な回答と考察がなされた。

本研究は、腎臓発生に必須の腎臓間質細胞の発生過程を解析してその誘導法を確立するとともに、完全に多能性幹細胞由来から成る腎臓高次構造の *in vitro* での構築に初めて成功したものであり、今後の腎臓発生機序解明、腎臓再生治療進展のために重要な研究と考えられ、学位の授与に値すると評価した。

審査委員長 腎臓内科学担当教授

向山 政志