

多能干细胞诱导分化为肾脏类器官的分子机制及应用前景分析

张登禄^{1,3} 杜泉航³ 孔峰³ 赵升田^{2,3}

【摘要】 干细胞具有自我更新和多向分化潜能,在再生医学领域发挥着越来越大的作用。肾脏类器官是一种由干细胞分化而来具有一定肾脏功能的组织结构,可用于肾脏疾病的细胞修复治疗,也可以模拟肾脏发育和疾病发生及用于筛选改善肾功能的药物。肾脏类器官的体外培育成为了当前研究热点,其体外培育可分为几个阶段:干细胞-原始体节中胚层-中间中胚层-输尿管芽(后肾间质)-集合管(肾单位)。本文重点介绍了目前两种较为成熟的肾脏类器官体外诱导方法,并对肾脏类器官的应用前景进行了综述。

【关键词】 多能干细胞; 肾脏; 类器官; 诱导分化

Molecular mechanism and application of kidney organoids from pluripotent cells Zhang Denglu^{1,3}, Du Xiaohang³, Kong Feng³, Zhao Shengtian^{2,3}. ¹Central Laboratory, ²Department of Urology, the Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China; ³Key Laboratory of Kidney Regeneration of Shandong Province, Jinan 250033, China Corresponding author: Zhao Shengtian, Email:zhaoshengtian@sdu.edu.cn

【Abstract】 Stem cells with the potential of self-renewal and multilineage differentiation play an increasingly important role in the field of regenerative medicine. Kidney organoids, a kind of tissue structure with certain renal function that derived from stem cells, could be used for cell repair therapy of renal diseases, or for imitating kidney development and disease occurrence so as to screen the drugs which could improve renal function. The culture of kidney organoids in vitro becomes a research hotspot at present. The in vitro culture could be divided into several stages as follows: stem cells-primordial somatic mesoderm-intermediate mesoderm-ureteric bud/metanephric mesenchyme-collecting tube/nephron. Two kinds of more mature in vitro induction methods of kidney organoids at present are focused on and the application prospect of kidney organoids are reviewed.

【Key words】 Pluripotent stem cells; Kidney; Organoid; Induced differentiation

多能干细胞(pluripotent stem cell, PSC)主要包括胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)等。随着人们对干细胞特性认识的提高,干细胞在再生医学研究及应用领域发挥着越来越大的作用。在世界范围内慢性肾病发病率高达10%,日益成为一个严重的公众健康问题^[1]。临床中,慢性肾病诊断为肾小球肾炎、隐匿性肾炎、肾盂肾炎、过敏性紫癜肾炎、红斑狼疮肾炎、痛风肾、肾病综合征、膜性肾病、肾病综合征和糖尿病肾病等等。慢性肾病如未能及时有效救治,导致病情恶化进展,则随病程迁延,慢性肾病患者将发展成为慢性肾功能不全、肾衰竭,最终形成尿毒症,严重威胁患者生命。慢性肾病的病理过程是一个渐进的、不可逆的肾单位损失,而肾单位是维持肾脏功能的基本单位。因此,肾单位再生研究具

有重要的研究意义及临床价值。近年来,PSC体外诱导分化产生功能性的肾单位方法越来越成熟^[2-4]。其中肾脏类器官的出现是肾脏再生领域中一个突破性的进展。2015年来自澳大利亚和美国的科研团队分别于10月份和12月份在Nature杂志发表肾脏类器官的体外培育的方法与结果^[3-4]。两种方法培育出的肾脏类器官均具备肾单位的基本结构肾小管、肾小球、集合管,具有重要的应用和研究价值。

一、肾脏发育生物学基础

在发育生物学上,哺乳动物肾脏来源于中间中胚层(intermediate mesoderm, IM)。细胞从原始体节中胚层(primitive streak mesoderm, PSM)分化形成IM。IM分化产生两种关键的肾脏祖细胞(nephric progenitor cell, NPC)群体,即输尿管芽(ureteric bud, UB)和后肾间质(metanephric mesenchyme, MM),分别形成集合管和肾单位。像许多器官一样,肾脏的发育涉及不同细胞之间相互诱导、自我组装形成最终的肾脏结构。在哺乳动物肾脏发育中,三对排泄器官(前肾、中肾、后肾)由头至尾依次排列。其中只有后肾成为出生

DOI: 10.3877/ema.j.issn.2095-1221.2018.01.009

作者单位: 250011 济南, 山东中医药大学附属医院实验中心¹, 泌尿外科²; 250033 济南, 山东省肾脏再生医学省级重点实验室³

通信作者: 赵升田, Email:zhaoshengtian@sdu.edu.cn

后动物的永久性器官。后肾发育起始于 MM 产生胶质细胞源性神经生长因子诱导 UB (肾管的分支) 产生^[5]。UB 成长为间充质, 然后通过二叉分支形成肾脏集合管。这种上皮分支的延长需要周围间质分泌胶质细胞源性生长因子, 同时间质需要来自 UB 的信号。与 UB 关系最为密切的间质是帽间质(capmesenchyme)。这一细胞群体需要来自顶端的信号进行增殖与自我更新, 同时也可以分化成具有滤过功能的肾单位。经典的 Wnt 信号可以诱导帽间质经过间质上皮转化产生肾单位^[6-7], 而 FGF (FGF9, FGF20)、BMP (Bmp7 信号通过 JNK)、低水平的 Wnt 信号及来自周围间质的信号是帽间质维持和增殖所必需的。因此, 器官的发育过程是生态空间内自我组装过程。

二、PSC 诱导分化成肾脏类器官的方法与分子机制

基于上述肾脏胚胎发育的机理, 许多实验室最近报道了体外诱导人 PSC 生成肾脏类器官的方法^[2-4]。

(一) 基本方法

肾脏类器官的形成分为 3 个主要阶段。干细胞首先分化成 PSM, 进一步分化成 IM, IM 再分化成 MM 和 UB。第一阶段: 干细胞分化成 PSM。PSM 是中胚层和内胚层的祖细胞群, 可以由小鼠 ESC 经过激活素 A (activin A) 与 BMP4 诱导而成^[8], 其中 activin A 决定了内胚层向前体节中胚层分化而中胚层向后 PSM 分化^[9]。在小鼠和人的 ESC 分化过程中, 经典的 Wnt 信号也可以作为 PSM 的诱导剂^[10]。

第二阶段: PSM 分化成 IM。原肠胚形成后, 中胚层进一步产生 IM、傍轴中胚层(paraxial mesoderm, PM) 和侧板中胚层(lateral plate mesoderm, LPM)。过去的研究认为转录因子 OSR1 是 IM 甚至 MM 形成的标志^[11], 最近研究发现 OSR1 在躯体中胚层延伸至 LPM^[12]。PSM 经 BMP4/activin A, 诱导后 3 d 会有 OSR1 的表达, 而 IM 其他标志物, 比如 PAX2 和 LHX1 并无表达^[12-13], 这一结果提示第二阶段分化需要新的生长因子的参与, FGF 信号也可能参与该过程, FGF8 从 PSM 至后躯干中胚层阶段均有表达, 而 FGF9 在 IM 和 PM 中有表达^[14-15]。在体外 MM 的生存需要培养基中加入 FGF2/BMP7 或 FGF9。在 FGF2 或 FGF9 因子的刺激下, OSR1、PAX2 和 LHX1 共同表达, 其中 PAX2 的表达率超过 80%, 这些都是 IM 的分化特征^[16]。FGF9 诱导 IM 产生是浓度依赖性的 (最佳浓度为 200 ng/ml) 抑制 LPM 的分子标志 FOXF1 和 OSR1 的表达^[16]。因此, FGF 信号可以有效并特异性地诱导 PSM 分化成 IM。

第三阶段: IM 分化成 MM 和 UB。在哺乳动物发育过程中, IM 分化成肾脏、性腺和肾上腺, 肾管是首先形成的结构, 沿着肾管从头至尾依次排列着三对排泄器官(前肾、中肾、后肾), 他们均发源于同一肾源性脊髓, 只有后肾一直保留, 并且成为动物永久性器官, 后肾形成的关键是重要细胞组分之间相关诱导作用。MM 通过表达 GDNF 促进 UB 生成, UB 通过表达 FGF9 为 MM 的生存提供了必要条件, 通过 Wnt 信号通路诱导肾单位的形成, 每个肾单位延长或分

段形成许多不同功能的细胞类型。研究证实维甲酸(retinoid acid, RA) 具有促进 UB 生长的功能^[17], RA 和 BMP7 能够诱导小鼠 ESC 向肾系分化^[18], 而 FGF9 可以维持小鼠肾单位祖细胞的状态^[19]。利用 BMP4/activin A 诱导人体胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESC) 分化后, 从第 6 天至第 17 天加入 200 ng/ml FGF9、50 ng/ml BMP7 和 0.1 μmol/L RA。整个诱导过程利用 RT-PCR 检测, 结果显示: hESC 逐渐从 PSM 中胚层(MIXL1, LHX1) 经 IM (OSR1、PAX2、LHX1) 分化成 MM (SIX2、WT1、GDNF、HOXD11)^[16]。HOXD11 的表达提示了后肾的出现, 重要的是, 肾管(输尿管) 上皮基因(C-RET、HOXB7) 也同时被诱导表达, 在诱导程序的第 14 天, ECAD⁺ PAX2⁺ 上皮结构就已经出现, RA 以浓度依赖的作用方式对这些早期上皮结构的形成起了促进作用, 这些上皮结构和周围间质被证明有增殖的作用。在肾脏发育过程中, 阳性表达 SIX2 和 WT1 的初始间质区被 ECAD⁺ 输尿管上皮所包围, WT1⁺ 细胞的百分比在输尿管上皮出现后继续增加, 提示 WT1 在肾单位祖细胞和分化更好的肾结构中均有表达, 在诱导分化的第 22 天, 足细胞标志基因(SYNPO、NPHS1 和 WT1)、肾小管标志基因(AQP1 和 SLC3A1) 和集合管标志基因(AQP2 和 SCNNB1) 都有明显表达^[16]。

另外利用 CHIR99021 起始诱导程序, 加入 RA/FGF9 可产生大量的输尿管上皮, 但其周围的 PAX2⁺ MM 细胞变得稀疏, 相反, 单独延长 FGF9 诱导分化, 同样可以逐步诱导 PSM、IM 至 MM/UB 的分化, 此方法可以更快地诱导干细胞表达肾脏标志物, MM 基因比如 SIX2 表达持续时间更长^[16]。另外一个输尿管上皮标志分子 GATA3 与 PAX2 共表达于输尿管上皮, 更重要的是, 输尿管上皮周围的 MM 更致密, 更接近发育的肾脏, 在这种方法中, PAX2 在间质和输尿管上皮均有表达, 在 WT1⁺ 和 WT⁻ 的细胞中均有 HOXD11 蛋白分子的表达, 这一结果提示 MM 的存在。

(二) 肾脏发育中不同细胞群的自我组装过程

在肾脏发育中形成了许多不同类型的细胞群, 这些细胞群通过彼此间的信号转导形成自我组织的组织。Takasato 等^[16] 利用 CHIR99021-FGF9 诱导程序对 hESC 进行了诱导培养, 在第 12~18 天撤掉生长因子, 到第 18 天伸长的 ECAD⁺ 输尿管上皮被几簇间质(表达 MM 分子标志, WT1、SIX2 和 PAX2) 所包围, 这种 MM 的形成看上去像肾单位(肾小囊), 表达 JAG1 和 CDH6 蛋白, 此外, 连接输尿管上皮与肾小囊腔体在肾单位成熟过程中出现。

肾单位形成是一个复杂的分段、形态改变和分化的过程。重聚实验结果表明, 小鼠胚肾分离成单细胞可以与不分化 and 分化 12 d 的 hESC 形成聚集, 以聚集体形式培养 4 d 后, 进行分割鉴定。hESC 源的细胞诱导分化成肾脏发育的主要组分, 包括 PAX2⁺ CALB⁺ 输尿管上皮、CDH6⁺ JAG1⁺ 早期肾囊、SIX2⁺ WT1⁺ NPC 间质, 而 hESC 源的细胞经 BMP4/activin A-FGF9/BMP7/RA 诱导只能分化成 MM 和 UB^[16], 这

种细胞聚集在未分化的 hESC 细胞之间并不发生。

分离胚胎肾脏体外培养可以长成类器官：在周围输尿管上皮的刺激下分支产生输尿管上皮并经历肾单位的形成、形态改变和分段。hESC 以单层细胞形式进行分化，可以用于研究不良环境对自我组装和形态变化的影响，在 IM 形成之后，将细胞消化分散以不同的密度重新接种继续培养，按 CHIR99021-FGF9 程序进行至第 18 天，以高密度接种的形成均匀的单层，而那些低密度接种产生许多小的、半球形的类器官分散于平板上。在上述两种情况下，WT1⁺MM 和 ECAD⁺UB 均有分布，而体积较小的半圆形克隆形成紧密组装、更高级的结构，这一结果说明 3D 环境能够增强自我组装。

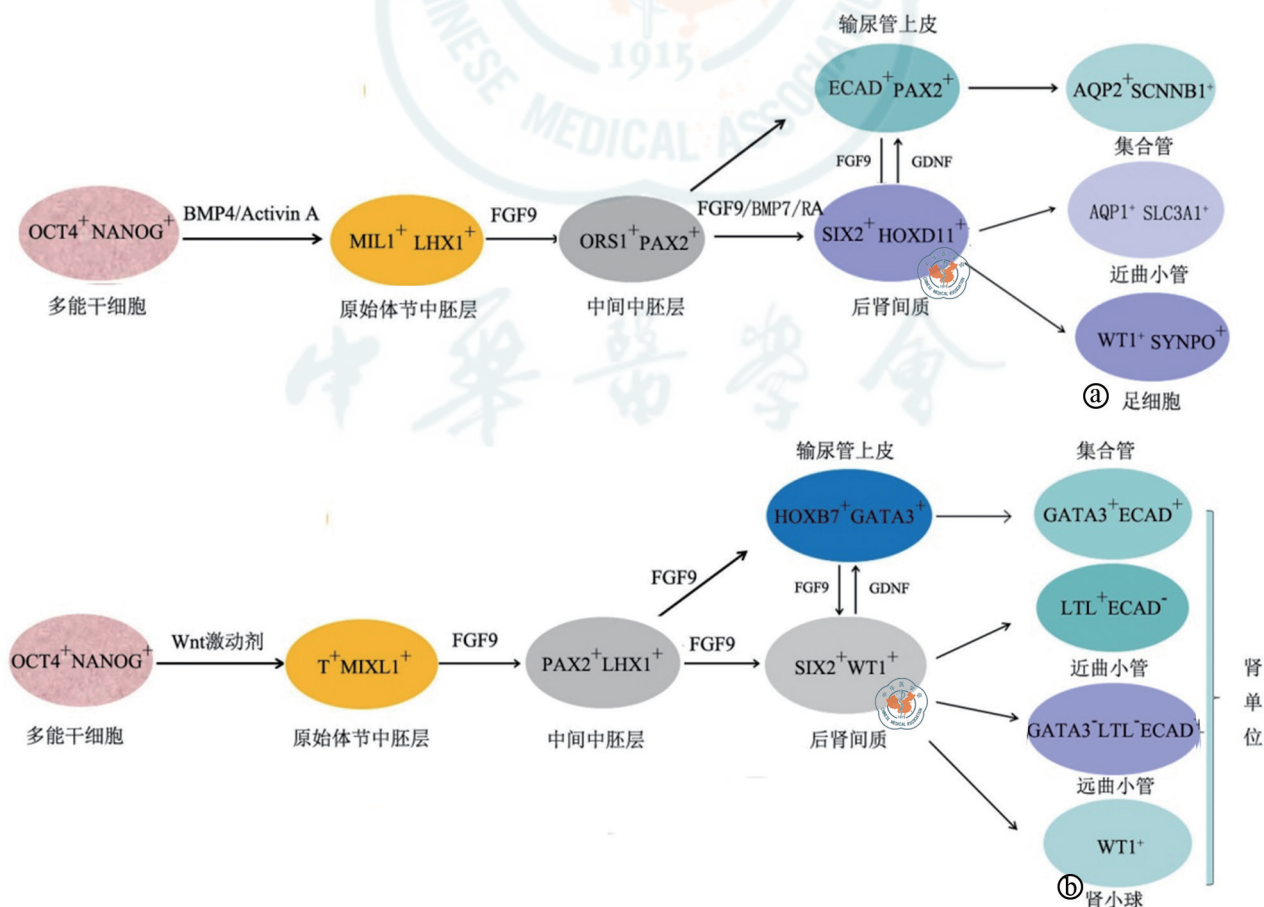
如果肾脏形态发生所需的细胞群都存在，培养 hESC 向肾脏方向诱导，应该可以形成肾脏类器官，不要其他支持细胞的参与。hESC 分化培养至第 18 天后进行消化分离，离心形成细胞团块，继续培养 4 d，组织分析发现 ECAD⁺ 小管存在输尿管上皮分子标志 PAX2、AQP2，或近端小管的分子标志 AQP1 和 SLC3A19。同时发现，WT1⁺PAX2⁺MM 存在于 ECAD⁺ 输尿管上皮周围，这提示 JAG1⁺ECAD⁺ 肾小囊形成，hESC 通过培养分化形成的结构与正常小鼠胚胎肾脏通过分离、重聚形成的结构并没有不同，通过 3 次独立实验证实 83% (5/6) 的细胞团块具有自我组装能力^[16]。

在发育过程和损伤修复过程中细胞均具有自我组装的能力。在自我组装过程中，不同的细胞类型彼此之间采用特定的模式形成复杂的结构，这一过程涉及特异性的细胞 - 细胞识别、配体 - 受体信号和细胞 - 基质相互作用。

hESC 分化过程产生相互作用的 NPC 群，后者自我组装形成早期肾脏，这体现了 PSC 分化产生肾组织技术上的巨大进步，然而，正常的肾脏发育涉及 NPC 自我更新与分化成肾单位之间的平衡。hESC 诱导分化过程中形成许多肾小囊，但同时随着时间推移 NPC 会显著减少，产生祖细胞早熟的现象，这一现象在 Six2 突变小鼠中可以见到，这一点是改进分化诱导方法需要特别关注的一点。方法改进的策略包括生长因子、细胞外基质和氧含量的改变，以便更充分的再现胚肾，此外，利用生物反应器为类器官的培养提供 3D 环境，可能有利于类器官的分化组装。

(三) 肾脏类器官诱导过程中主要信号通路

目前文献报道比较成功肾脏类器官诱导的策略主要有两种：BMP/FGF 途径(图 1a)；CHIR99021-FGF 途径(图 1b)。BMP/FGF 途径：首先 PSC 在 BMP4/activin A 的刺激下向 PSM 分化，然后在 FGF9 的刺激下分化成 IM，IM 在 FGF9/BMP7/RA 的刺激下分化成 MM 和 UB，二者进一步分化成集合管、近端小管和足细胞在内的类器官。CHIR99021-



注：a 图为 BMP/FGF 途径涉及的信号通路及各分化阶段标志分子；b 图为 CHIR99021-FGF 途径涉及的信号通路及各分化阶段标志分子

图 1 肾脏类器官诱导过程中主要信号通路

FGF 途径: PSC 在 Wnt 激动剂 CHIR99021 刺激下分化成 PSM, 后者在 FGF9 刺激下分化成 IM, 进而分化成 MM 和 UB, 两者相互诱导分化成包含集合管、肾小管和肾小球的肾脏类器官。

三、PSC 诱导分化为肾脏类器官的分子机制及应用前景分析

目前利用 PSC 诱导分化得到的类器官通常是不成熟的, 类似于胎儿阶段的器官, 与真正的器官相比外形上小很多。在目前的培养体系中肾脏类器官通常长到直径 2~3 mm, 没有血管并且缺乏尿排出的途径, 因此无论从体积还是复杂程度上距离达到临床移植的标准还很远。然而, 将肾脏类器官可应用于疾病模型的制备、药物筛选和再生治疗, 其中再生治疗包括生物组织工程和细胞治疗。多细胞性和不同细胞群体之间的特定相互作用使这些结构信息可以反映肾毒性, 体外缺乏可靠的对药物毒性进行评估的模型, 这是新药开发中的一个重要障碍。药物进入临床需要肾毒性检测, 目前通常采用分离原代近曲小管上皮预测体内反应, 这种方法并不太稳定^[20]。目前, 研究正在尝试利用人 PSC 诱导分化得到的肾近曲小管上皮进行肾脏毒性检测^[21], 利用肾脏类器官检测药物肾毒性可以提高检测的可靠性, 因为近曲小管细胞周围存在间质成分, 比单纯的近曲小管细胞更接近体内环境, 利用成体胃肠道干细胞制备的胃类器官可用于幽门螺杆菌检测已得到实验论证^[22], 利用患者来源的 iPS 细胞产生的类器官可用于建立疾病模型。当进行鉴定新的致病基因研究时, 制备患者特异性的类器官有利于对新基因进行快速的功能鉴定, 利用类器官开发高含量-低通量筛选模型进行特定治疗药物的筛选是可行的。一般情况下, 干细胞产生的类器官由于缺乏血管通常大小是有限的。放大这样的组织或类器官用于移植在生物工程学上是一大挑战, 特别是像肾脏这样的大器官。三维旋转培养已经用于改善脑类器官的结构, 但开发能够支撑类器官向更成熟体积更大的方向发展的器官培养器非常有必要。

参 考 文 献

- 1 Radhakrishnan J, Remuzzi G, Saran R, et al. Taming the chronic kidney disease epidemic: a global view of surveillance efforts[J]. *Kidney Int*, 2014, 86(2):246-250.
- 2 Little MH, McMahon AP. Mammalian kidney development: principles, progress, and projections[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(5).
- 3 Kobayashi A, Valerius MT, Mugford JW, et al. Six2 defines and regulates a multipotent self-renewing nephron progenitor population throughout mammalian kidney development[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(2):169-181.
- 4 Carroll TJ, Park JS, Hayashi S, et al. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system[J]. *Dev Cell*, 2005, 9(2):283-292.
- 5 Takasato M, Er PX, Chiu HS, et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis[J]. *Nature*, 2015, 526(7574):564-568.
- 6 Morizane R, Lam AQ, Freedman BS, et al. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(11):1193-1200.
- 7 Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, et al. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables Generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(1):53-67.
- 8 Gadue P, Huber TL, Paddison PJ, et al. Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(45):16806-16811.
- 9 Soares ML, Haraguchi S, Torres-Padilla ME, et al. Functional studies of signaling pathways in peri-implantation development of the mouse embryo by RNAi[J]. *BMC Dev Biol*, 2005, 5:28.
- 10 Sumi T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N, et al. Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, Activin/Nodal and BMP signaling[J]. *Development*, 2008, 135(17):2969-2979.
- 11 Mae S, Shono A, Shiota F, et al. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells[J]. *Nat Commun*, 2013, 4:1367.
- 12 James RG, Kamei CN, Wang Q, et al. Odd-skipped related 1 is required for development of the metanephric kidney and regulates formation and differentiation of kidney precursor cells[J]. *Development*, 2006, 133(15):2995-3004.
- 13 Tsang TE, Shawlot W, Kinder SJ, et al. Lim1 activity is required for intermediate mesoderm differentiation in the mouse embryo[J]. *Dev Biol*, 2000, 223(1):77-90.
- 14 Crossley PH, Martin GR. The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo[J]. *Development*, 1995, 121(2):439-451.
- 15 Colvin JS, Feldman B, Nadeau JH, et al. Genomic organization and embryonic expression of the mouse fibroblast growth factor 9 gene[J]. *Dev Dyn*, 1999, 216(1):72-88.
- 16 Takasato M, Er PX, Becroft M, et al. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(1):118-126.
- 17 Rosselot C, Spraggon L, Chia I, et al. Non-cell-autonomous retinoid signaling is crucial for renal development[J]. *Development*, 2010, 137(2):283-292.
- 18 Kim D, Dressler GR. Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(12):3527-3534.
- 19 Barak H, Huh SH, Chen S, et al. FGF9 and FGF20 maintain the stemness of nephron progenitors in mice and man[J]. *Dev Cell*, 2012, 22(6):1191-1207.
- 20 Tiong HY, Huang P, Xiong S, et al. Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical *in vitro* models[J]. *Mol Pharm*, 2014, 11(7):1933-1948.
- 21 Li Y, Kandasamy K, Chuah JK, et al. Identification of nephrotoxic compounds with embryonic stem-cell-derived human renal proximal tubular-like cells[J]. *Mol Pharm*, 2014, 11(7):1982-1990.
- 22 Bartfeld S, Bayram T, van de Wetering M, et al. *In vitro* expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1): 126-136.e6.

(收稿日期:2016-09-30)

(本文编辑:李少婷)

张登禄, 杜泉航, 孔峰, 等. 多能干细胞诱导分化为肾脏类器官的分子机制及应用前景分析 [J/CD]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2018, 8 (1): 49-52.