

常染色体優性多発性嚢胞腎患者の疾患特異的 iPS 細胞からの腎臓オルガノイドを用いた嚢胞形成の評価
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系腎臓内科学専攻

大野 迪子

修了年 2021 年

指導教員 阿部 雅紀

常染色体優性多発性嚢胞腎 (autosomal dominant polycystic kidney disease : ADPKD) は最も頻度の高い遺伝性腎疾患であるが、その詳細な病態はいまだ完全に解明されておらず、根治的な治療法も確立されていない。近年、ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS 細胞) から誘導した腎臓オルガノイドを用いて腎嚢胞を再現することが可能になってきた¹⁻³。オルガノイドは生体内器官に類似した組織体であり、生体内器官の組織学的、機能的特徴を模倣するため⁴、創薬研究や再生医療の移植片、遺伝性疾患の病態解明のツールとして注目を集めている。ADPKD 疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した腎臓オルガノイドでも腎嚢胞の再現が報告されたが^{5,6}、その成熟度には未だ課題が残り、バソプレシン刺激による嚢胞形成の再現には至っていない。本研究ではより成熟した腎臓オルガノイドの効率的な分化誘導方法を検討するとともに、ADPKD 患者由来の腎臓オルガノイドを作製しバソプレシンに対する反応性の評価を試みた。

まず健常人の末梢血単核球より iPS 細胞を樹立し、健常人由来 iPS 細胞から腎臓オルガノイドを効率よく作製する方法を検討し確立したうえで、ADPKD 患者の腎臓オルガノイドを作製しバソプレシンへの反応を検討した。

腎臓オルガノイドは腎臓の発生過程を模倣して分化誘導される。腎臓オルガノイドを古典的 Wnt シグナルと FGF9 シグナルを模倣した分化誘導系により作製した際、オルガノイド形成初期において、Wnt シグナル刺激物質である CHIR99021 の高濃度による短時間刺激 (CHIR pulse) により最大数のネフロンが形成され、この方法で作製された腎臓オルガノイドはネフロンを構成する全ての要素を含んでいたと報告された⁷。ADPKD の腎嚢胞は集合管由来の嚢胞が主体とされているが、ネフロンのどの部位からも嚢胞を形成し得るため^{8,9}、今回我々はこの方法⁷を基に CHIR pulse の濃度や時間を改変し、より高率に発達したネフロンを誘導し、かつ集合管が構築される実験方法を検討した。CHIR99021 の濃度や作用時間を変更するとオルガノイドの組織構造に明らかな変化を認め、10 μ M CHIR99021 3 時間の CHIR pulse¹⁰ によって発達したネフロン様構造が誘導された。誘導された腎臓オルガノイドにはネフロンを構成する各組織の遺伝子発現が確認され、肉眼的にも糸球体様構造物の発生が確認できた。また免疫染色の結果、一部に管腔構造を呈する集合管様構造物の構築を確認した。これらの結果より、以降は 10 μ M CHIR99021 3 時間の CHIR pulse により腎臓オルガノ

イドを作製した。また分化誘導した腎臓オルガノイドには一部に未分化の iPS 細胞が残存していた。iPS 細胞より分化誘導した組織および細胞に未分化の iPS 細胞が残存していると、これらの組織および細胞を用いた創薬開発実験などは正確に行うことができない。そこで本研究では rBC2LCN-PE23¹¹ により腎臓オルガノイドからの未分化 iPS 細胞の除去処理を行った。

健康人由来 iPS 細胞で腎臓オルガノイドの有用な分化誘導方法を検討したのち、2名の ADPKD 患者（患者 1、患者 2）の末梢血単核球より iPS 細胞を樹立し、腎臓オルガノイドを作製した。2名の ADPKD 患者由来の腎臓オルガノイドにおいても糸球体様構造物の発生を確認したが、健康人由来の腎臓オルガノイドと比較し個々の糸球体様構造物のサイズは小さかった。この原因として腎臓組織への分化が不十分である可能性を考えたが、ADPKD 由来の腎臓オルガノイドでは患者 2 で近位尿細管に発現する遺伝子の 1 つである *organic cation transporter 1 (OCT1)* の発現を確認できなかったものの、患者 1 では健康人由来の腎臓オルガノイドと同様に各腎臓組織の遺伝子発現を認めた。planar cell polarity(PCP)経路は腎臓の発生過程において正常な形態やサイズを有するネフロン構築のため重要な役割を担うが¹²、ADPKD ではこの PCP 経路や細胞分裂の極性の異常が報告されている¹²。ADPKD 患者由来の腎臓オルガノイドはネフロンを構成する各腎臓組織の遺伝子発現を認めており、健康人由来の腎臓オルガノイドと比較し腎臓組織への分化が不十分なのではなく、PCP 経路異常がネフロン様構造の形態に影響を与えた可能性があると考えられた。

ADPKD の腎嚢胞は cAMP 依存性の増大を示し、バソプレシン刺激により嚢胞の増大が促進される¹³⁻¹⁵。そこで樹立した腎臓オルガノイドのバソプレシン刺激に対する反応性を評価した。

まず健康人と 2名の ADPKD 患者から樹立した腎臓オルガノイドを用いてバソプレシン刺激によるオルガノイドの面積の変化について検討した。健康人由来の腎臓オルガノイドではバソプレシン刺激による面積の過大な増大反応は認めなかった。ADPKD 患者由来の腎臓オルガノイドでは患者毎に反応が異なり、患者 2 の腎臓オルガノイドではバソプレシン刺激により面積の過大な増大反応を認めた一方、患者 1 では腎臓オルガノイドの面積に顕著な変化を認めなかった。腎臓オルガノイドの面積の変化という点では健康人と ADPKD 患者のバソプレシン刺激に対する反応性の違いを表現することが困難であったが、その反

応性の違いが最も顕著に表れたのが組織構造の変化であった。

健常人由来腎臓オルガノイドではバソプレシン刺激による嚢胞形成を認めなかった一方、2名のADPKD患者の腎臓オルガノイドではバソプレシン刺激により組織構造の変化を認めたが、その形態や発生様式は患者毎に異なっていた。患者1の腎臓オルガノイドではバソプレシン刺激により嚢胞の形成を認めたが、患者2の腎臓オルガノイドでは嚢胞は形成されず、集合管上皮と思われる組織の異常増殖を認めた。そしてバソプレシン刺激による組織構造の変化の進展様式は、個々の患者の臨床像と相関する点がみられた。2名のADPKD患者はそれぞれ異なるPKD遺伝子変異を有しており、こうした組織構造の変化やその進展様式の違いは個々の遺伝子変異を反映したものと考えられた。また患者2では細胞遊走や細胞分裂の極性の維持に関わる遺伝子変異が生じたために増殖上皮が極性を失い、嚢胞を形成しなかった可能性があると考えられた^{12,16,17}。

ADPKDではその嚢胞増大と病状の進行にGlycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)の関与が報告されており^{18,19}、続いてバソプレシン刺激によるGSK3 β mRNAの発現量の変化について検討した。ADPKD患者1の腎臓オルガノイドではControlと比較し一定濃度以上のバソプレシン刺激によりGSK3 β mRNAの発現が増加する傾向があった。これに対し患者2の腎臓オルガノイドではバソプレシン刺激によるGSK3 β mRNAの発現の増加反応は認められなかった。これらの結果にも患者毎の遺伝子変異が関与していると考えられ、患者1ではバソプレシン刺激による嚢胞形成にGSK3 β を介する悪化のサイクル¹⁹が関与している一方で、患者2の嚢胞形成には異なるメカニズムが関与している可能性があると考えられた。しかしながら今回の実験はサンプル数が少なく各データの有意差を証明するには至っておらず、今後サンプル数を増やしてデータを蓄積し、さらに検討を重ねていく必要があると考えられた。

本研究の限界として腎臓オルガノイドの成熟度が挙げられる。本実験方法で作製された腎臓オルガノイドはヒト胎生期の腎臓に類似し、成人の腎臓と比較しその構造は未熟であり⁷、今回作製した腎臓オルガノイドにおいても一部に管腔構造を呈する集合管様構造物を認めたが、構造的に未熟な組織も多く含まれていた。また集合管以外のネフロン構造については免疫染色による証明はできておらず、腎臓オルガノイドの組織評価および機能評価についてさらに検討が必要である。

本研究は ADPKD 患者由来の腎臓オルガノイドを用いてバソプレシン刺激に対する反応性の評価に成功した初めての報告である。2名の ADPKD 患者から作製した腎臓オルガノイドはバソプレシン刺激により異なる組織構造の変化を示し、これらは患者毎の遺伝子変異を反映したものと考えられた。また患者 2 の腎臓オルガノイドにおいてバソプレシン刺激による嚢胞形成がみられなかったことに、何らかの極性の維持に関わる遺伝子変異が関与している可能性が示唆されたのは腎臓オルガノイドを用いた研究では初めてのことである。ADPKD 患者の嚢胞形成メカニズムにはかなりの heterogeneity があり、これは個々の患者の遺伝子変異に基づいている可能性があると考えられた。組織構造の成熟度や機能性に課題が残っているものの、今回腎臓オルガノイドを用いた研究で初めてこうした可能性が示唆されたことは、基礎的にも臨床的にも意義があると考えられた。

【引用文献】

1. Freedman BS, Brooks CR, Lam AQ, *et al.* Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat. Commun.* **6**, 8715(2015).
2. Cruz NM, Song X, Czerniecki SM, *et al.* Organoid cystogenesis reveals a critical role of microenvironment in human polycystic kidney disease. *Nat. Mater.* **16**, 1112–1119 (2017).
3. Low JH, Li P, Chew EGY, *et al.* Generation of Human PSC-Derived Kidney Organoids with Patterned Nephron Segments and a De Novo Vascular Network. *Cell Stem Cell.* **25**, 373-387.e9 (2019).
4. Takebe T, Wells JM. Organoids by design. *Science.* **364**, 956–959 (2019).
5. Shimizu T, Mae S, Araoka T, *et al.* A novel ADPKD model using kidney organoids derived from disease-specific human iPSCs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **529**, 1186–1194 (2020).
6. Kuraoka S, Tanigawa S, Taguchi A, *et al.* PKD1-dependent renal cystogenesis in human induced pluripotent stem cell-derived ureteric bud/collecting duct organoids. *J. Am. Soc. Nephrol.* **31**, 2355–2371 (2020).
7. Takasato M, Er PX, Chiu HS, *et al.* Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature.* **526**, 564–568 (2015).
8. Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet.* **369**, 1287–1301 (2007).
9. Nakanishi K, Yoshikawa N. Ciliopathy. *Nihon Shoni Jinzobyō Gakkai Zasshi.* **25**, 127–131 (2012).
10. 高里実：自己組織化を利用した iPS 細胞由来腎臓オルガノイド作製、実験医学別冊 決定版 オルガノイド実験スタンダード 開発者直伝！ 珠玉のプロトコール集（佐藤俊朗，武部貴則，永樂元次 編）、Page 190-200、羊土社、東京、2019年4月
11. Tateno H, Onuma Y, Ito Y, *et al.* Elimination of tumorigenic human pluripotent stem cells by a recombinant lectin-toxin fusion protein. *Stem Cell Reports.* **4**, 811–820 (2015).

12. Happé H, de Heer E, Peters D. J. M. Polycystic kidney disease: The complexity of planar cell polarity and signaling during tissue regeneration and cyst formation. *Biochim Biophys Acta*. **1812**, 1249–1255 (2011).
13. Belibi FA, Reif G, Wallace DP, *et al.* Cyclic AMP promotes growth and secretion in human polycystic kidney epithelial cells. *Kidney Int*. **66**, 964–973 (2004).
14. Yamaguchi T, Pelling JC, Ramaswamy NT, *et al.* cAMP stimulates the in vitro proliferation of renal cyst epithelial cells by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Kidney Int*. **57**, 1460–1471 (2000).
15. Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: The last 3 years. *Kidney Int*. **76**, 149–168 (2009).
16. Wilson PD. Apico-basal polarity in polycystic kidney disease epithelia. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis*. **1812**, 1239–1248 (2011).
17. Nishio S, Tian X, Gallagher AR, *et al.* Loss of Oriented Cell Division Does not Initiate Cyst Formation. *J Am Soc Nephrol* **21**, 295–302 (2010).
18. Tao S, Kakade VR, Woodgett JR, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 β promotes cyst expansion in polycystic kidney disease. *Kidney Int*. **87**, 1164–1175 (2015).
19. Kakade VR, Tao S, Rajagopal M, *et al.* A cAMP and CREB-mediated feed-forward mechanism regulates GSK3 β in polycystic kidney disease. *J. Mol. Cell Biol*. **8**, 464–476 (2016).