

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08223

研究課題名(和文)腎臓オルガノイドを用いた腎線維化増悪因子の探索

研究課題名(英文) Investigation of aggravating factors for renal fibrosis using kidney organoids

研究代表者

須佐 紘一郎 (Koichiro, Susa)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50735842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)では原疾患によらず線維化が進行することから、良い治療標的であると考えられる。腎線維化の重症度は個人差が大きいことから、重症度を規定する増悪因子が存在すると考え、本研究ではその同定を目指している。

そのためのスクリーニング系の構築を行っており、線維化領域を可視化するための蛍光発色するレポーターの作製、「易線維化腎臓オルガノイドモデル」としてのNPHP1欠損iPS細胞・オルガノイドの作製を行った。

さらに、我々は野生型とNPHP1完全欠損時の蛋白・遺伝子発現を網羅的解析によって比較し、NPHP1と相互作用して線維化に寄与する候補蛋白・遺伝子を複数絞り込んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記のNPHP1欠損iPS細胞については、両アリルにおける長大な遺伝子欠失をiPS細胞において生じさせるその作製手法自体に新規性があったため、その部分について論文報告を行った。

また、本研究によってNPHP1と腎臓線維化を結び付ける因子も複数絞り込むことができ、NPHP1が関連する腎臓線維化の一部機序を解明する糸口をつかんだ。

今後、そこから腎臓線維化を増悪させる因子を同定し、最終的には国民病とも言えるCKDの治療法開発に貢献することを目指している。

研究成果の概要(英文)：In chronic kidney disease (CKD), fibrosis progresses regardless of the primary disease. Therefore, renal fibrosis should be a promising therapeutic target. Since the severity of renal fibrosis absolutely varies between individuals, we hypothesize that there are aggravating factors that determine the severity. This study aims to identify these factors. To this end, we have constructed a screening system including fluorescent reporter organoids to visualize fibrotic areas, and NPHP1-deficient iPS cells and organoids as a "fibrosis-prone kidney organoid model."

Furthermore, we compared protein and gene expression in wild-type and complete NPHP1 deficiency cases through comprehensive analysis. As a result, we identified several candidate proteins and genes that interact with NPHP1 and might contribute to fibrosis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓オルガノイド 修飾遺伝子 慢性腎臓病 線維化

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)は国内患者数 1300 万人に上り、その治療法開発が強く求められている。CKD における腎機能低下は、糸球体病変よりむしろ、尿細管間質病変、特に線維化に強く関連する。CKD の原疾患は多様であるにも拘らず、ある程度進行すると、同じように間質線維化が不可逆的に進展していく。つまり、腎線維化には原疾患によらない共通の機序が存在すると推測され、線維化は良い治療標的と考えられる。しかし、その分子機構の解明は不十分で、はっきりと CKD における腎線維化に強く寄与すると証明された遺伝子もまだはっきりしない。そのため根本治療も未開発である。

この問題を解決するにあたり、「単独で疾患を発症させるわけではないが、病態の進展を強く制御する因子」として最近提唱されている、「修飾遺伝子(modifier gene)」という概念が手掛かりになり得ると我々は考えている。間質線維化を呈するいくつかの遺伝性腎疾患に着目すると、これらの疾患は全く同じ遺伝子変異を有しながら、重症度や表現型は様々に異なる。このことから、線維化の進展は単独の遺伝子だけでは規定されず、他の何らかの要因により加速すると考えられる。その要因の一つとして modifier gene の関与があるのではないかとというのが我々の問いであり、さらにはこのような modifier gene が、遺伝性でない一般的な CKD 進行についても制御している可能性もあると考えている。しかし、従来手法でこのような modifier gene の存在を検証するには膨大な種類のノックイン・ノックアウトマウスを作製するしかなく、現実的ではなかった。

一方で近年、iPS 細胞等のヒト多能性幹細胞の分化誘導技術が急速に進歩し、径 1mm ほどの細胞塊の内部に多様な細胞から成る糸球体から尿細管まで連続したネフロンを三次元構造で有する「腎臓オルガノイド」の作製が可能となった。in vitro でありながら成熟腎臓に近い現象を観察できる革新的な病態解析モデルであるオルガノイドを利用することで、上記のような既存の培養細胞や動物での検証が困難であった問題を解決できる可能性が現実味を帯びてきた。実際に申請者はオルガノイド上で腎線維化を再現できることも確認した。

2. 研究の目的

この間質線維化の鍵となる分子の探索には、他臓器や環境因子としての糖尿病・高血圧などの研究にヒントを得た分子を遺伝子改変して検討する reverse genetics を用いた研究が行われてきたが、腎臓の線維化は他臓器と異なる機序を有するため、このアプローチには限界がある。従って、後述する「forward genetics」によって新規にスクリーニングすることで腎臓固有の責任分子や機序を解明していくアプローチが有用と考えられる。だが、動物モデルに forward genetics を応用すると莫大な系統数の飼育が必要で、実際の利用には難があった。また、複雑で多様な細胞が関与する腎線維化を、単純かつ単一の培養細胞系で再現することも困難であった。

そこで本研究では、forward genetics を腎臓オルガノイド上で応用するという新しいスクリーニング方法を開発し、前述のような腎線維化進行に強く影響する modifier gene を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

腎臓オルガノイドの個々の細胞のゲノム DNA にランダムに変異を組み込み、線維化の phenotype に変化が出た細胞をスクリーニングし、解析すれば、理論上、線維化に影響を与える因子を探索することが可能である。動物モデルでは莫大な系統数の飼育が必要となるため forward genetics の適用は困難だったが、オルガノイドではそのような問題はない。

modifier gene が存在するとしても、それ単独で線維化を発症・進展させるわけではなく、何らかの因子との相互作用により発症・進行すると考えられるため、探索にはあらかじめ腎線維化を生じやすいモデルを用意する必要がある。そこで本研究では、目的の modifier gene を発見する確率を高めるため、複数方向から並行してアプローチする。第一は間質線維化を呈する遺伝性腎疾患の原因遺伝子である NPHP1 の変異を導入した腎臓オルガノイド、第二は線維化を惹起するサイトカインを腎臓オルガノイドに投与するモデルである。これらのモデルに forward genetics を適用し、線維化を加速・増悪させる modifier gene の探索を行う。

4. 研究成果

線維化レポーターの開発：

腎線維化を可視化するため、既に我々はレンチウイルスベクターにより線維化亢進領域が GFP によって蛍光発色するレポーターを設計・作製済みであり、これらを iPS 細胞に導入した。次に、SIX2 陽性ネフロン前駆細胞へ分化誘導し、糸球体から尿細管まで連続したネフロンや間質組織を有する腎臓レポーターオルガノイドを作製した。

尿細管間質障害を起こす遺伝性腎疾患の iPS 細胞の作製：

NPHP1 の変異による遺伝性腎疾患は、全く同じ遺伝子変異を有していても、間質線維化の重症度が大きく異なる。従ってこれらの疾患には線維化を加速させる modifier gene が存在する可能性があり、このような modifier gene が、遺伝性腎疾患ではない CKD の線維化進行についても制御している可能性もある。そこで、NPHP1 に変異を持つ iPS 細胞を、CRISPR Cas9 システムにより作製した。この部分の成果については論文報告を行った。

線維化誘発サイトカインによる腎臓オルガノイド線維化モデルの最適化：

で作製した各種レポーターオルガノイドに対し、線維化を惹起するサイトカインである IL-1、TGF、TNF をそれぞれ投与して、線維化の可視化に最適なレポーターとサイトカインの組み合わせを検討した。

腎臓オルガノイドを用いた、線維化修飾遺伝子候補を選定する新規スクリーニング法の確立と実施：

で作製した間質線維化を起こす腎臓オルガノイドに対し、約 6000~19000 種類の遺伝子を網羅するレンチウイルス型 CRISPR ライブラリ (Cell 2015 等) によって、ランダムな遺伝子ノックアウト・遺伝子転写活性化を行うという部分である。

まず FACS sorting によるスクリーニングを行うための条件検討を行った。レンチウイルスがオルガノイド内部の細胞に対し十分な感染能を持つことは、GFP 搭載レンチウイルスベクターによる予備実験により既に確認した。線維化責任分子や修飾遺伝子が改変された細胞は線維化亢進により蛍光発色し、それを sorting で選別するが、この過程でのレポーターが期待した通りの性能を得られていないことがわかり、レポーターの再作製を行った。その後、条件検討を再開している。

また、腎臓線維化は myofibroblast が中心的役割を果たすため、オルガノイド中の myofibroblast-like cell を選別するアプローチも並行して行う。選別された細胞から改変された遺伝子を同定することで、腎臓線維化に関わる新規遺伝子候補を得る。これについても条件検討を行っている。

候補遺伝子同定に関しては、CRISPR ライブラリには各々の gRNA にタグがついており、PCR によってターゲット遺伝子を同定可能な仕組みである。

今後は、上記のスクリーニング系を完成させるべく、条件検討を進めていく。スクリーニングの結果候補遺伝子を得ることが出来たら、それが本当に線維化増悪因子として機能するかどうかの検証を行いたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tomoki Yanagi, Hiroaki Kikuchi, Koichiro Susa, Naohiro Takahashi, Naohiro Takahashi, Hiroki Bamba, Takefumi Suzuki, Yuta Nakano, Tamami Fujiki, Yutaro Mori, Fumiaki Ando, Shintaro Mandai, Takayasu Mori, Koh Takeuchi, Shinya Honda, Satoru Torii, Shigeomi Shimizu, Tatemitsu Rai, Shinichi Uchida, Eisei Sohara	4. 巻 28
2. 論文標題 Absence of ULK1 decreases AMPK activity in the kidney, leading to chronic kidney disease progression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 5-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12989	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuta Nakano, Koichiro Susa, Tomoki Yanagi, Yuichi Hiraoka, Takefumi Suzuki, Takayasu Mori, Fumiaki Ando, Shintaro Mandai, Takami Fujiki, Tatemitsu Rai, Shinichi Uchida, Eisei Sohara	4. 巻 58
2. 論文標題 Generation of NPHP1 knockout human pluripotent stem cells by a practical biallelic gene deletion strategy using CRISPR/Cas9 and ssODN	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal	6. 最初と最後の頁 85-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11626-022-00655-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanagi Tomoki, Kikuchi Hiroaki, Takeuchi Koh, Susa Koichiro, Mori Takayasu, Takahashi Naohiro, Suzuki Takefumi, Nakano Yuta, Fujiki Tamami, Hara Yu, Suzuki Soichiro, Mori Yutaro, Ando Fumiaki, Mandai Shintaro, Honda Shinya, Torii Satoru, Shimizu Shigeomi, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Sohara Eisei	4. 巻 -
2. 論文標題 ULK1-regulated AMP sensing by AMPK and its application for the treatment of chronic kidney disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 552390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.08.09.552390	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomoki Yanagi, Hiroaki Kikuchi, Koh Takeuchi, Koichiro Susa, Naohiro Takahashi, Yuta Nakano, Fumiaki Ando, Shintaro Mandai, Takayasu Mori, Shinya Honda, Satoru Torii, Shigeomi Shimizu, Tatemitsu Rai, Shinichi Uchida, Eisei Sohara
2. 発表標題 ULK1-Regulated AMP Sensing Mechanism by AMPK Is Disrupted in CKD
3. 学会等名 KIDNEY WEEK 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤丸拓也, 蘇原映誠, 森崇寧, 千賀宗子, 萬代新太郎, 中野雄太, 森雄太郎, 安藤史顕, 須佐紘一郎, 東海 林隆男, 福留裕一郎, 稲葉直人, 北村健一郎, 中西太一, 木村寿宏, 田村禎一, 小澤潔, 内田信一
2. 発表標題 成人期に末期腎不全に至った患者の遺伝的背景の検討
3. 学会等名 第 66 回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柳 智貴, 蘇原 映誠, 菊池 寛昭, 竹内 恒, 須佐 紘一郎, 藤木 珠美, 森 雄太郎, 安藤 史顕, 萬代 新太郎, 森 崇寧, 本田 真也, 鳥居 暁, 清水 重臣, 頼 建光, 内田 信一
2. 発表標題 AMP感知機構をバイパスしたAMPK活性化によるCKDの新規治療戦略の発見
3. 学会等名 第66 回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 健文
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いたネフロン癆病態モデル腎オルガノイドの作製
3. 学会等名 第1回日本腎臓学会若手基礎研究フォーラム
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	柳 智貴 (Yanagi Tomoki)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鈴木 健文 (Suzuki Takefumi)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科 腎臓内科学・大学院生 (12602)	
研究協力者	蘇原 映誠 (Sohara Eisei)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科 腎臓内科学・准教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関