

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20881

研究課題名（和文）尿細管オルガノイドによるsemi-personalized病態モデルの構築

研究課題名（英文）Development of semi-personalized disease modeling based on renal tubular organoid

研究代表者

森 雄太郎（Mori, Yutaro）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・テニュアトラック助教

研究者番号：00781618

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト腎癌などの患者の摘出腎に由来する尿細管上皮初代培養細胞を21例樹立し、そのほぼ全例でオルガノイド化に成功した。腎機能が正常な腎臓に由来する尿細管オルガノイドを薬剤刺激により人工的に慢性腎臓病（CKD）に近い状態にすることに着手し、人工CKD尿細管オルガノイドが、細胞老化、炎症性サイトカイン・線維性サイトカイン分泌などのCKDの表現系をほとんど模倣できることがわかった。我々の方法は、摘出された腎臓の断片から、初代培養細胞の樹立、オルガノイドの作製までを全て同一の条件で行うことができることもわかった。これらの成果については論文投稿中、ないし近日中に投稿を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで慢性腎臓病の病態モデルは完全な不死化培養細胞株によるものかマウスによるものしか存在しなかった。培養細胞株によるものは、実際の腎臓からの乖離が著しく、また、マウスによるモデルでは、数十年単位で進行する慢性腎臓病を寿命2年のマウスで再現するには限界があった。我々は、ヒトの腎臓に直接由来する初代の上皮細胞でオルガノイドを作製し、さらにそれを人工的に慢性腎臓病の状態にすることに成功している。また末期腎不全の患者の腎臓からのオルガノイド樹立にも成功している。これらの2つの尿細管オルガノイドによる慢性腎臓病モデルは、腎機能を改善しうる治療薬を探索するための重要なツールとなることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We established 21 cases of tubular epithelial primary culture cells derived from the resected kidneys of patients with human renal cancer and other diseases, and succeeded in organoidization in almost all of them. We set out to artificially mimic chronic kidney disease (CKD) by drug stimulation of tubular organoids derived from kidneys with normal renal function and found that artificial CKD tubular organoids can mimic most of the phenotypes of CKD, including cellular senescence and inflammatory and fibrogenic cytokine secretion. We also found that our method can be used to establish primary cultured cells from resected kidney fragments and to produce organoids, all under identical conditions. These results are being submitted for publication or will be submitted soon.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：オルガノイド 慢性腎臓病 初代培養 尿細管上皮細胞 細胞老化

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) は、体内の老廃物と不要な水分を濾過し尿として排泄する腎臓の機能が、年単位の経過で悪化していく慢性の致死性疾患である。国民の 8 人に 1 人が罹患している新たな国民病という表現がなされているにもかかわらず、その病態解明や創薬は十分には進んでいない。その大きな原因の一つが、マウスを中心とした実験動物で CKD の病態を完全に再現することが難しいという点である。マウスの寿命は一般に 2 年程度であり、数年から数十年の経過で進行する慢性腎臓病の病態を忠実に模倣することは不可能である。このことから、マウスとヒトの間を埋める、ヒトにより近い病態モデルの開発が切望されてきた。

一つの試みとして、ヒト多能性幹細胞 (iPS 細胞) に由来する腎臓オルガノイド (iPS 腎臓オルガノイド) による病態モデルの作製が実施されてきた。これにより、ヒトをベースにするモデルの作製が可能になり、上記の課題を克服するかに思われた。しかし、iPS 腎臓オルガノイドは、現段階では成人ではなく胎生期の腎臓を再現したものであること、作製するのに 1 ヶ月以上の時間を要すること、複数のヒト個体に由来するオルガノイドを並列で同じ条件で大量に作製するのは難しいこと、などの欠点を抱えており、CKD の病態再現と創薬という観点での応用には課題がある。

申請者は、糖尿病性腎臓病の病態解明と新規創薬を行うプロジェクトの中で、ヒトの摘出腎から腎上皮初代培養細胞を樹立し、さらにそれを 3 次元に展開することで尿細管様構造物である尿細管オルガノイドの作製に成功した (Cell Metab. 33 (5):1042-1061)。尿細管オルガノイドが CKD の病態に近い、腎臓線維化のモデルとして使用できることも報告した。尿細管オルガノイドの利点は、iPS オルガノイドに比べて短い時間で非常に簡便に培養でき、同一条件で複数の株の培養を並列して容易に行うことができ、かつヒトの胎児ではなく成人の腎臓の尿細管を再現していることである。

本研究では、この初代培養由来尿細管オルガノイドの作製を、数十例の腎摘出術を受ける患者から実施してライブラリ化し、個々の患者の特性を再現する、ヒトをベースにした病態モデルおよび薬効・毒性検証のプラットフォームとして確立することを目的とする。これにより、マウスと実際のヒトの間を埋め、かつヒトの個体差をも反映する病態モデルとして活用し、慢性腎臓病を中心とした慢性腎疾患の病態解明と創薬に応用していくことを目指す。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、初代培養由来尿細管オルガノイドの作製を、数十例の腎摘出術を受ける患者から実施してライブラリ化し、個々の患者の特性を再現する、ヒトをベースにした病態モデルおよび薬効・毒性検証のプラットフォームとして確立することである。

本研究の独自性は、オルガノイドの作製のために摘出腎からの初代培養という方法を取ることである。通常各臓器のオルガノイドを作製する際、iPS 細胞からの分化誘導を行うことが多い。本研究の方法により、iPS オルガノイドでは達成できなかった、胎生期ではなく成人の腎臓尿細管の再現、由来する患者間の簡便な比較、さらにはそれに基づく semi-personalized な薬剤の薬効・毒性評価のプラットフォームの確立の、全てを可能とする。

## 3. 研究の方法

治療により摘出された数十例の腎臓組織から腎上皮初代培養細胞を樹立して冷凍ストックを取る。それらを、並列に基底膜ゲルを用いて尿細管オルガノイドに展開し、尿細管上皮細胞の各種マーカーの免疫染色、および上皮細胞が分泌して腎障害を促進する炎症性・線維性サイトカインの定量的評価を行う。これらの分析所見と、由来する患者の年齢、腎機能、尿所見、摘出した腎臓組織の染色所見、尿や血中の腎障害マーカーなどとの対応関係を検討し、患者の所見を尿細管オルガノイドが反映するかを調べる。尿細管オルガノイドの所見としては、分化度を示す Lrp2 や LTL、障害度を示す KIM-1、炎症を惹起する IL-1 $\beta$ 、線維化を誘導する TGF- $\beta$  などが既報より候補となる。患者の所見との対応についてはそれぞれのマーカーとの 1 対 1 での検討を行う。

また、健全な腎機能の腎臓に由来する尿細管オルガノイドに対して、細胞老化を惹起する薬剤刺激を行うことで、CKD に近い表現型を示す人工 CKD 尿細管オルガノイドの作製を行うこととした。

ヒトの摘出腎検体の入手に予定していた以上に時間を要したため、semi-personalized な表現型の確認から変更し、由来する患者の腎機能に応じて、正常腎、軽症 CKD 腎、末期腎不全腎に分けてそれぞれ数例ずつのオルガノイドを作製し、同じ期間培養させて成熟後、それらを単細胞に分離し、一例一例の患者由来の細胞が同数になるようにミックスして、上記の 3 群のオルガノイドの混合単細胞+軽症 CKD 腎由来のオルガノイドに近年 CKD に対する治療効果が指摘されているダパグリフロジンを投与したオルガノイド数例を同じように培養後単細胞化してミックスしたサンプルを、シングルセル RNA-seq 解析に提出し、それぞれの群間で比較し、特徴的な遺伝子発現パターンや、新規の CKD のバイオマーカー、可能であればそれらのパスウェイ解析を実施し、新規治療標的となり得る分子を探索することとした。

なお、ヒト臍出腎検体の入手に当たっては、東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会の承認を受け（承認番号 M2022-005）、患者自身に十分な説明を行い、書面による同意を取得して実施している。

#### 4. 研究成果

約1年半強の時間で、本学病院泌尿器科で腎癌の臍出手術を受ける患者から合計21例の腎上皮初代培養細胞を樹立することができた。内訳は腎機能正常群5例、軽症CKD群10例、末期腎不全群6例であった。

それらの第一例の細胞（軽症CKD群に属するeGFR 58.2 mL/min/1.73m<sup>2</sup>）を用いて、シスプラチンの反復投与を行うことで、人工CKDモデルを作製することを試みた。シスプラチンの少量の反復投与はマウスにおいて、尿細管上皮細胞に対するCKDの表現型を示すようになることが昨の患者の腎上皮初代培養細胞から尿細管オルガノイドを樹立し、それらに対し、シスプラチンの単回投与や反復投与を行い、急性腎障害(AKI)からCKDに至る表現型を解析した。

その結果図1に示すように、老化誘導オルガノイドはCKDで報告されているのと同様の、細胞老化(p16の発現)を示し、細胞老化随伴分泌現象(SASP)としてのIL-1 $\beta$ の産生や、fibrosis bioassayによるシスプラチンで刺激を受けたオルガノイドの培養上清中への線維性サイトカインの分泌、上皮細胞自体の上皮間葉転換(EMT)など、CKDで報告されている表現型の主要部分を模倣することができた。これらの研究成果はプレプリント論文としてまとめてすでに発表している(medRxiv 2024. 03. 17. 24304404)。当初IF 10.3のJournal of the American Society of Nephrologyに投稿したところ査読されたがrejectとなった。このため、IF 10.0のAdvanced Healthcare Materialsに再投稿し、現在査読中である。

また、一般に多く作成されているiPS細胞由来の腎臓オルガノイドは、iPS細胞の下部により文化誘導の条件が異なり、完全に同条件で培養し樹立するということが一般には極めて困難である（そのため、多発性嚢胞腎などのmonogenic diseaseの解析では患者由来の細胞ではなく健康なiPS細胞に病因変異をCRISPR/Cas9システムで導入し、細胞のバックグラウンドを揃えてから同条件で培養するというようなことを行う）。この点は、オルガノイドを完全にpersonalizedなものないしはsemi-personalizedなものとして薬剤の薬効や毒性を評価するプラットフォームとするための障害となると考えている。我々のヒト臍出腎由来の尿細管オルガノイドは、一度同条件で腎上皮初代培養細胞の樹立を行ってしまえば、どの患者由来の株であっても完全に同条件でオルガノイド化が可能である。このことを示すために、正常腎由来の細胞4例、軽症CKD腎由来の細胞4例から、同条件でのオルガノイド化を同時に実施し、それが可能であることを示し、現在ほぼデータがまとまり論文投稿準備中である。来月の前半には投稿が可能になるものと思われる。

これらに加えて、末期腎不全腎（すなわち透析を受けている患者から臍出された）由来の腎上皮初代培養細胞も、通常の臍出腎と同様に培養することが可能であり、オルガノイド化することにも成功した。現在末期腎不全腎由来の尿細管オルガノイドが上記の人工CKDオルガノイドと同様にCKDに相当する表現型を示すかどうかを確認中であり、数ヶ月以内に論文として投稿を実施する予定である。

さらに、正常腎、軽症CKD腎、末期腎不全腎に分けてそれぞれ数例ずつのオルガノイドを作製し、同じ期間培養させて成熟後、それらを単細胞に分離し、一例一例の患者由来の細胞が同数になるようにミックスして、上記の3群のオルガノイドの混合単細胞+軽症CKD腎由来のオルガノイドに近年CKDに対する治療効果が指摘されているダパグリフロジンを投与したオルガノイ

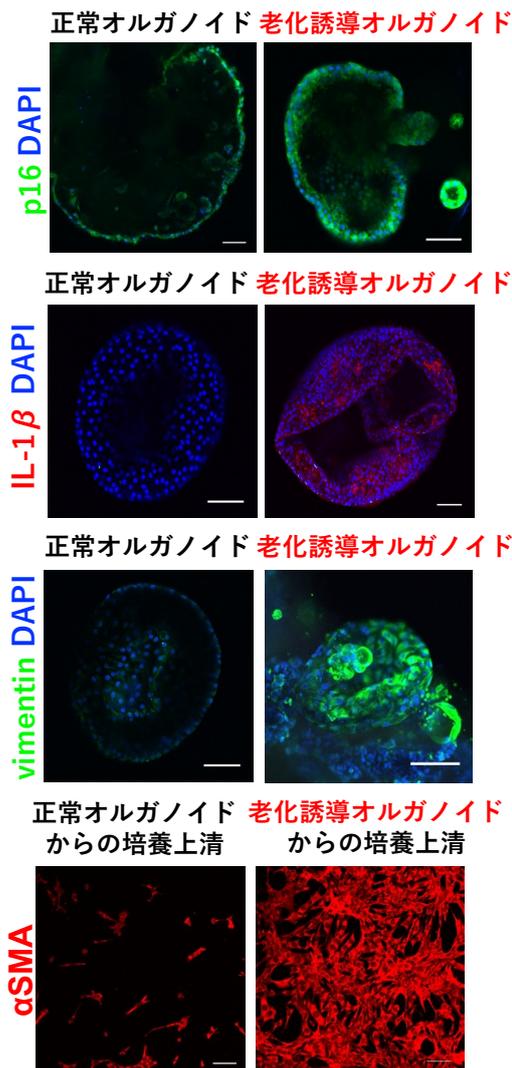


図1. 老化誘導オルガノイドはCKDの病態モデルとなり得る。p16の発現に代表される細胞老化を引き起こした結果、SASPにより炎症(IL-1 $\beta$ 産生)、線維化誘導(vimentin発現により示される上皮間葉転換と線維芽細胞の分化刺激)を引き起こしている。

ド数例を同じように培養後単細胞化してミックスしたサンプルを、シングルセル RNA-seq 解析に提出し、その解析を実施した。その結果、特に末期腎不全腎に特徴的な細胞集団が見つかり、現在それらの中で主要な遺伝子（すなわち新規の腎機能のバイオマーカーや CKD の治療標的になり得る遺伝子）を見出すべく解析中である。十分な解析ののちに、こちらも論文として発表を行なっていきたい。

本科研費により得られた成果はこちらにまとめられているので、別個に参照されたい。

[https://researchmap.jp/yutaro\\_mori/research\\_projects/39812981#!#rm-research-project-achievements](https://researchmap.jp/yutaro_mori/research_projects/39812981#!#rm-research-project-achievements)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 森槇子;仲尾祐輝;森雄太郎	4. 巻 55
2. 論文標題 新たな病態モデルとしての尿細管オルガノイド	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月刊 細胞	6. 最初と最後の頁 76-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 森槇子;仲尾祐輝;森雄太郎	4. 巻 39
2. 論文標題 新たな病態モデルとしての尿細管オルガノイド	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 57-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Makiko Mori;Yutaro Mori;Takaharu Ichimura;Keisuke Sako;Shinichi Uchida;Joseph V. Boventre
2. 発表標題 Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) is a Receptor for SARS-CoV-2 in Lung and Kidney
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 森雄太郎;森槇子
2. 発表標題 尿細管・気道の上皮におけるKIM-1を介したCOVID-19感染機構の解明
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Makiko Mori, Yutaro Mori, Corby Fink, Takaharu Ichimura, Keisuke Sako, Yuki Nakao, Astrid Weins, Shinichi Uchida, Joseph V. Bonventre
2. 発表標題 Kidney Injury Molecule-1 Is an Independent Receptor from ACE2 for SARS-CoV-2 in Lung and Kidney
3. 学会等名 Kidney Week 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Nakao, Yutaro Mori, Makiko Mori, Shintaro Mandai, Tamami Fujiki, Fumiaki Ando, Koichiro Susa, Takayasu Mori, Eisei Sohara, Shinichi Uchida
2. 発表標題 Tubuloids on Primary Human Renal Tubular Epithelial Cells (hRTECs) Recapitulates Cisplatin-Induced Kidney Injury
3. 学会等名 Yuki Nakao, Yutaro Mori, Makiko Mori, Shintaro Mandai, Tamami Fujiki, Fumiaki Ando, Koichiro Susa, Takayasu Mori, Eisei Sohara, Shinichi Uchida
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 腎臓尿管を舞台とするtranslational research
2. 発表標題 森 雄太郎
3. 学会等名 Wednesday 4 MEETUP (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yuta Sekiguchi, Yutaro Mori, Yuki Nakao, Makiko Mori, Shintaro Mandai, Tamami Fujiki, Fumiaki Ando, Koichiro Susa, Takayasu Mori, Eisei Sohara, Shinichi Uchida
2. 発表標題 Dapagliflozin protects against cisplatin-induced acute kidney injury on primary human renal tubular epithelial cells (hRTECs)
3. 学会等名 東京医科歯科大学大学院リトリート
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 仲尾 祐輝, 森 雄太郎, 森 槿子, 萬代 新太郎, 藤木 珠美, 菊池 寛昭, 安藤 史顕, 須佐 紘一郎, 森 崇寧, 蘇原 映誠, 内田 信一
2. 発表標題 ヒト患者由来尿管Organoidは細胞老化・炎症・線維化をも再現し得る新規病態モデルである
3. 学会等名 第3回御茶ノ水腎研究会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

腎臓の細胞から3次元オルガノイド培養に成功 産学連携促進プラットフォーム化目指す <a href="https://tmdu-oi.jp/promoter/">https://tmdu-oi.jp/promoter/</a>
---

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	三宅 健介  (Miyake Kensuke)	東京医科歯科大学・統合研究機構・テニユアトラック准教授  (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		
米国	Brigham and Women's Hospital	Harvard Medical School	
カナダ	Western University		