

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08225

研究課題名(和文) 多発性嚢胞腎の疾患特異的iPS細胞由来腎集合管細胞の機能解析と治療薬の探索

研究課題名(英文) Functional analysis and investigation of medicines using the disease-specific iPS cell-derived collecting duct cells from ADPKD

研究代表者

及川 治(OIKAWA, Osamu)

日本大学・医学部・研究医員

研究者番号：60813590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性多発性嚢胞腎(ADPKD)患者の腎嚢胞形成を抑制する薬剤を選択する為に、ADPKD患者のPKD1、PKD2遺伝子解析を行い、末梢血から疾患特異的iPS細胞を樹立し、腎臓オルガノイドを分化誘導した。iPS細胞より分化誘導後18日目に腎臓オルガノイドが形成され、凍結切片においてEカドヘリン、アクアポリン2、バソプレシン2型受容体の各免疫染色は陽性で集合管を含んだ腎臓オルガノイドを確認した。ADPKD患者からの腎臓オルガノイドはバソプレシン、フォルスコリンに対し増大反応を示した。今後オルガノイドの増大抑制に最も有効な薬剤の評価を行い、ADPKDの個別医療の確立につなげていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADPKDは遺伝性腎臓疾患であり、遺伝子変異heterogeneityがある。今回ADPKD患者疾患特異的iPS細胞から腎臓オルガノイドを確立しバソプレシン、フォルスコリンに対する集合管増大反応にも遺伝子変異の違いから集合管上皮の増殖に違いを認めた。今後オルガノイドの増大抑制にトルバブタム、ピオグリタゾン、ソマトスタチン、タクロリムス、ラバマイシンの中で最も有効な薬剤の評価を行い、遺伝子変異heterogeneityを基にADPKDの個別医療の確立につなげていければ、医療社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：In order to select effective medicines to suppress the cyst-formations in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), we established kidney organoids from the disease-specific iPS cells derived from peripheral mononuclear blood cells. We confirmed structure of collecting duct in the kidney organoids by immunostaining of E-cadherin, aquaporin 2, vasopressin 2 receptor. We could completely eliminate the contamination of undifferentiated iPS cells in kidney organoids with rBC2LCN-PE23. The kidney organoids showed excessive enlargement responses of collecting duct in the kidney organoids from patients with ADPKD compared to kidney organoid from normal healthy person in responses to vasopressin and forskolin. We will investigate effective medicines including pioglitazone, tacrolimus, somatostatin, metformin and torvaptan suppressing the excessive enlargement of the patients-derived kidney organoids.

研究分野：腎臓病

キーワード：遺伝性多発性嚢胞腎 疾患特異的iPS細胞 個別医療

1. 研究開始当初の背景

臨床での遺伝性腎尿細管疾患の確定および鑑別診断が困難であっても、患者さん本人の疾患特異的 iPS 細胞から腎尿細管細胞を分化誘導すれば、培養尿細管細胞での正確な機能評価より確定診断が出来、臨床的治療薬の評価も出来、個別医療につながる。多発性嚢胞腎は最も頻度の高い遺伝性嚢胞性腎疾患であり、*PKD1*、*PKD2* 遺伝子異常が同定されている。PKD 細胞では遺伝子産物である蛋白 Polycystin の機能異常により、多発性嚢胞腎細胞の Ca 濃度は低値で、細胞内 Ca 濃度が低下すると、cAMP を分解する酵素(PDE)活性が低下し、細胞内 cAMP 濃度が高まり、cAMP 依存性 Protein kinase A 機能が高まり、シグナル経路 (EGF/EGFR, Wnt, Raf/MEK/ERK, JAK/STAT, mTOR 等) が活性化され細胞増殖が起きる。高まった cAMP は正常細胞では細胞増殖をむしろ抑制するが、多発性嚢胞腎細胞ではバソプレッシンによって高まった cAMP は嚢胞を増大させると報告されている。現在、進行性嚢胞形成を完全に抑制する治療法は確立されておらず、バソプレッシン阻害薬トルバプタンやチアゾリジン誘導体ピオグリタゾンの有効性が報告されているが未だ確立されていない。これまで尿細管疾患特異的 iPS 細胞から腎尿細管細胞を分化誘導の報告はない。ADPKD の治療薬としてトルバプタン、ピオグリタゾン、ソマトスタチン、ラパマイシンがある。今回疾患特異的 iPS 細胞からの集合管細胞の *in vitro* での薬剤の効果を観ることが出来れば、ADPKD の有効薬剤の個別医療へ繋がる。

2. 研究の目的

腎臓オルガノイドの効率的な分化誘導方法を検討し、ADPKD 患者由来の腎臓オルガノイドを作製しバソプレッシンに対する反応性の評価を試みた。

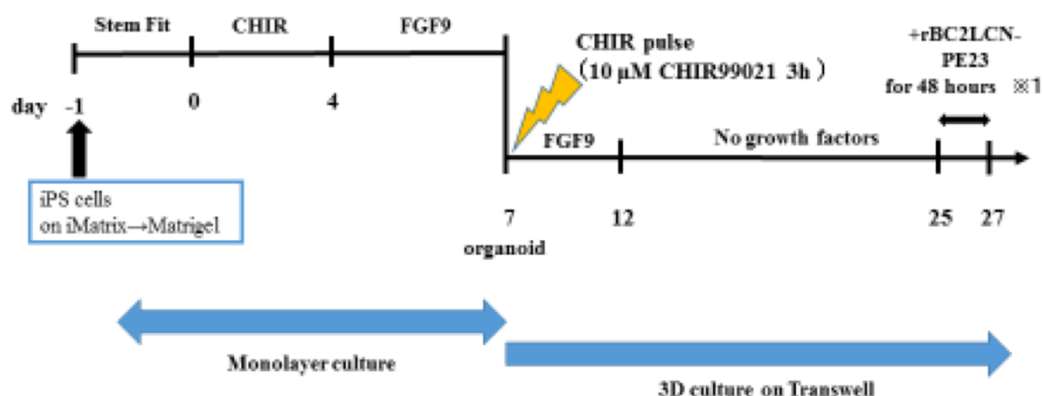
3. 研究の方法

(1) 末梢血からの iPS 細胞の樹立と腎臓オルガノイドの分化誘導

同意の得られた健康成人および ADPKD 患者より末梢血 10 ml を採取した。単核球細胞を分離し、CytoTune-iPS 2.0 を用いて Sendai ウイルスにより山中 4 因子を導入した。Takasato らのプロトコール (*Nature*. 526, 564-568 (2015)) を参考に腎臓オルガノイドを分化誘導した。

(2) 腎臓オルガノイドの未分化 iPS 細胞除去、増殖刺激

誘導したオルガノイドに対し、未分化 iPS 細胞を除去する為、rBC2LCN + 細胞毒 (PE23) 試薬とインキュベートした (*Stem Cell Reports* 4: 811-820, 2015)。集合管の構築を確認するため、アクアポリン 2、バソプレッシン 2 型受容体、GATA3 の免疫染色を行った。腎臓オルガノイドにバソプレッシン (10^{-6} M, 10^{-7} M) を添加、21 日間培養し、増大反応を IMAGE-J で評価するとともに組織構造の変化を検討した。GSK3 β mRNA 発現をリアルタイム PCR で評価した。



4. 研究成果

(1) 腎臓オルガノイドの作成での CHIR pulse の改変と組織構造の検討

構造的に成熟した腎臓オルガノイドの作製を目指し、3次元培養を開始する際にネフロンを高効率に誘導するための処理である CHIR pulse を改変しオルガノイドを作製。

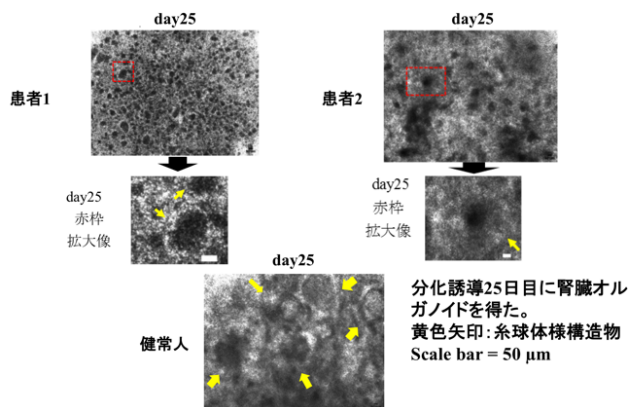
まずオリジナルの CHIR 5 μ M 1時間から 3-24 時間まで CHIR pulse の時間を延長しオルガノイドを作製。10 μ M CHIR 3 時間の CHIR pulse において発達したネフロン形成を確認したため、以降 10 μ M 3 時間の CHIR pulse をプロトコールとして採用した。

(2)ADPKD 患者の遺伝子変異

患者 1 では *PKD1* の Ex18 に 7394T>C のミスセンス変異が同定された。患者 2 では *PKD1* に c.4191G>C のミスセンス変異および c.361_362delAA の変異が同定された。

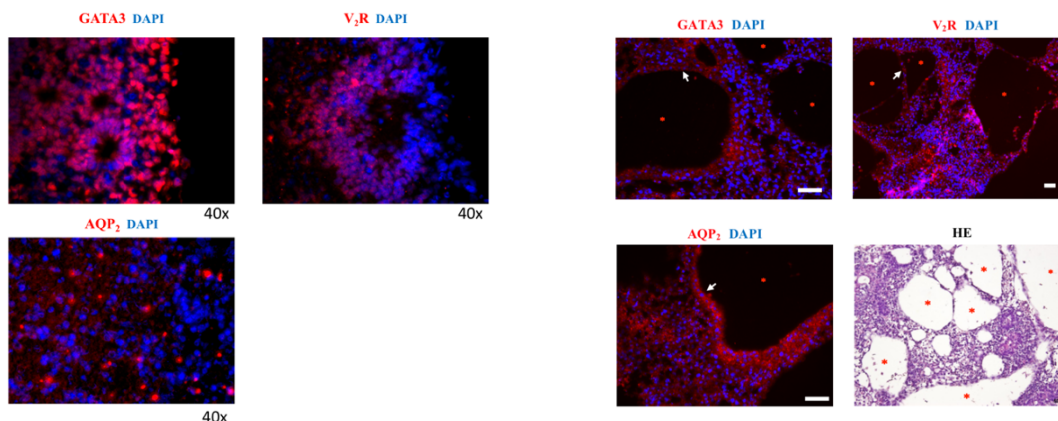
(3)ADPKD 患者の腎臓オルガノイドの作成

ADPKD 患者 2 名の末梢血単核球より樹立した iPS 細胞から腎臓オルガノイドを分化誘導した。分化誘導 15 日目に腎胞様構造物の形成を認め、25 日目には糸球体様構造物の発生を認めた。ADPKD 患者 P1 由来の腎臓オルガノイドでは *PODXL*, *CD13*, *SGLT2*, *OCT1*, *AQP1*, *NKCC2*, *NCCT*, *AQP3* の発現を認めた。ADPKD 患者 P2 由来の腎臓オルガノイドでは *PODXL*, *CD13*, *SGLT2*, *AQP1*, *NKCC2*, *NCCT*, *AQP3* の発現を認めたが、*OCT1* の発現を確認できなかった。



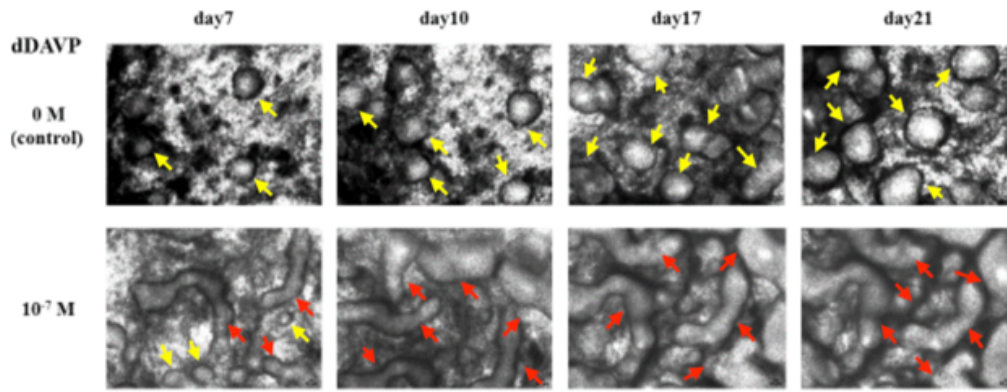
(4)バソプレシン刺激による腎臓オルガノイドの組織構造の変化

ADPKD 患者由来の腎臓オルガノイドにおいて、21 日間のバソプレシン刺激による組織構造の変化を倒立顕微鏡で観察した。組織観察において、固有の上皮で取り囲まれた腔を嚢胞腔、嚢胞腔を取り囲む上皮を嚢胞上皮とし、これらを合わせて嚢胞として観察を行った。ADPKD 患者 1 由来の腎臓オルガノイドでは 10⁻⁷ M バソプレシンで刺激した 3 つの腎臓オルガノイドのうち、1 つのオルガノイドで刺激開始 7 日目に 1 個の嚢胞様構造物が形成された。嚢胞様構造物は徐々に増大し、21 日目にはオルガノイド全体に及んだ。嚢胞様構造物の組織を検討するため HE 染色および免疫蛍光染色を施行すると、HE 染色において嚢胞腔が確認された。免疫蛍光染色では、嚢胞腔を取り囲む上皮に GATA3、V₂R、AQP₂ の局在を認めた。

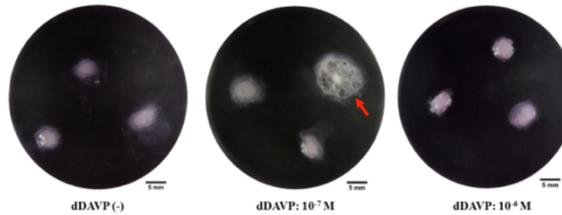


10⁻⁷ M バソプレシン刺激の腎臓オルガノイドに形成された嚢胞様構造物は肉眼で確認可能であった。ADPKD 患者 2 由来の腎臓オルガノイドにおいて、バソプレシン刺激開始 7 日目に Control およびバソプレシン刺激条件下いずれにおいても球状 (下図: 黄色矢印) や管状 (赤矢印) を呈する構造物の形成を認め、これらは経時的に増大した。

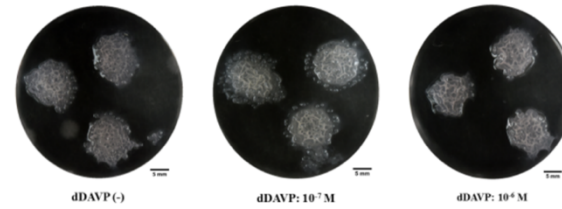
Control では主に球状構造物が増大し、バソプレシン刺激条件下では最初球状を呈した構造物も徐々に管状化し増大する傾向があった。形成された構造物は Control と比較しバソプレシン刺激条件下において増大傾向が強く、また構造物の増大、管状化傾向は濃度依存的ではなく 10⁻⁷ M バソプレシン刺激条件下で最も顕著であった。



[A]



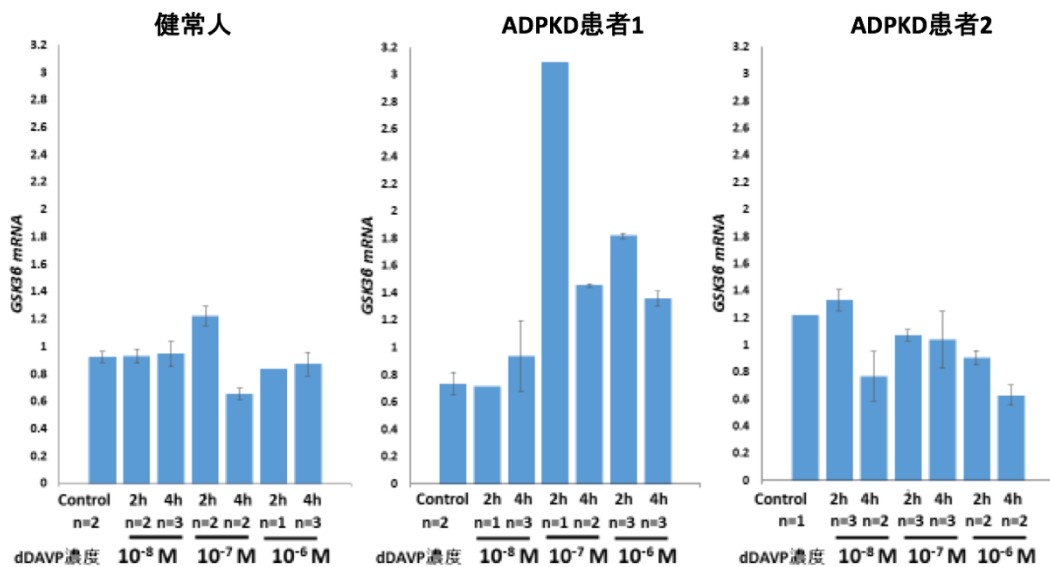
[B]



dDAVP : パソプレシン

(5) GSK3β mRNA 発現

健常人由来腎臓オルガノイドでは Control と比較し、 10^{-7} M パソプレシン刺激で一過性に *GSK3β* mRNA の発現が増加した。ADPKD 患者 1 では Control と比較し、 10^{-7} M 以上の濃度のパソプレシン刺激で *GSK3β* mRNA の発現が増加する傾向があった。一方、患者 2 由来の腎臓オルガノイドではパソプレシン刺激による *GSK3β* mRNA の発現の増加反応は認められなかった。



(6) 結論

本研究では ADPKD 患者由来の iPS 細胞から分化誘導した腎臓オルガノイドを用いた実験系において、初めてパソプレシン刺激による反応性の評価に成功した。ADPKD 患者の嚢胞形成メカニズムには 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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 馬場晴志郎、福田 昇、常見明子、大野迪子、阿部雅紀
2. 発表標題 多発性嚢胞腎への新規バイオ医薬としてのGSK3 に対するPIポリアミドの開発
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lan Chen, Noboru Fukuda, Akiko Tsunemi, Sho Tanaka, Asako Oguni, Kosuke Saito, Kyoko Fujiwara, Masanori Abe, Taro Matsumoto
2. 発表標題 Induction kidney organoid from disease-specific iPS cells.
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場晴志郎、福田 昇、常見明子、大野迪子、阿部雅紀
2. 発表標題 GSK3 に対する遺伝子制御薬PIポリアミドの多発性嚢胞腎への効果の検討
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野迪子、福田 昇、常見明子、Chen Lan、深澤みゆき、阿部雅紀
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からの腎臓オルガノイド作製での多発性嚢胞腎への個別医療
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田 昇、大野迪子、常見明子、Chen Lan、深澤みゆき、阿部雅紀
2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞からの腎臓オルガノイドを用いた多発性嚢胞 腎の個別医療の試み
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大野迪子、福田 昇、常見明子、Chen Lan、深澤みゆき、阿部雅紀
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からの多発性嚢胞腎疾患特異的腎臓オルガノイドの作製
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬場晴志郎、福田 昇、常見明子、大野迪子、阿部雅紀
2. 発表標題 多発性嚢胞腎への遺伝子転写制御薬としてのGSK3 に対するPIポリアミドの開発
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田 昇、大野迪子、常見明子、阿部雅紀、松本太郎
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021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 分担者	福田 昇 (FUKUDA Noboru) (40267050)	日本大学・医学部・教授 (32665)	
研究 分担者	阿部 雅紀 (ABE Masanori) (70459890)	日本大学・医学部・教授 (32665)	

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
---------	---------