

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08707

研究課題名(和文)ネフリンの動態解明による腎臓系球体スリット膜形成促進薬の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic compounds for slit diaphragm formation by elucidating dynamics of Nephrin protein using human iPS-derived kidney organoids

研究代表者

谷川 俊祐 (Tanigawa, Shusuke)

熊本大学・発生医学研究所・講師

研究者番号：10726318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ネフリンは腎臓の系球体の濾過膜(スリット膜)を構成する主要タンパク質であり、その異常は蛋白尿を引き起こす。しかし濾過膜を直接修復して蛋白尿を消失させる根治的治療法は存在せず、保存的治療にとどまっている。

本計画では、腎臓のネフロン構造や系球体のスリット膜形成能を持つ唯一の実験系である腎臓オルガノイド誘導法を基盤にして、ネフリンタンパク質の動態メカニズムを解明するとともに、スリット膜の形成及び再生を促進するシグナル・化合物の同定を目的とした。その結果、ネフリンタンパク質の発現や局在を制御する化合物の候補を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本計画では、ヒトiPS細胞由来腎臓オルガノイドを用いたネフリンの膜局在化を促進する化合物の同定を目的として実施し、いくつかの候補化合物を得た。申請者は本研究期間にヒトiPS由来ネフロン前駆細胞の増幅方法も報告しており(Tanigawa et al., Stem Cell Reports, 2019)、理論上、増幅した患者由来のオルガノイドを用いたスクリーニング系の確立が可能である。今後、変異ネフリンタンパク質の人為的制御が可能になると先天性疾患のみならず、濾過膜の傷害が関与すると考えられている糖尿病性腎症等他の慢性腎臓病などの系球体の濾過機能が減衰した腎疾患に対する創薬にも発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The kidney is composed of nephrons (glomeruli and renal tubules), the minimal functional units, and collecting ducts located downstream of nephrons. NEPHRIN is a trans-membrane protein that constitutes the filtration slits of the glomerulus, and its mutation causes congenital nephrotic syndrome, which is characterized by urinary leakage of blood proteins. To elucidate the mechanisms that control the dynamics of NEPHRIN to form slit diaphragm, we utilized our original kidney organoid technology that can reproduce the structure of nephron and slit diaphragm formation of the kidney. In this study, we identified several candidate compounds that facilitate membrane localization of NEPHRIN in human iPS-derived kidney organoids.

研究分野：腎臓発生学

キーワード：病態再現 iPS細胞 腎臓オルガノイド ネフリン 系球体 スリット膜 ネフロン

1. 研究開始当初の背景

腎臓の糸球体は血液を濾過して不要な物質を尿中に排出し生体の恒常性を維持している。ネフリンは糸球体の濾過膜（スリット膜）を構成する主要タンパク質であり、その異常は蛋白尿を引き起こす。しかし濾過膜を直接修復して蛋白尿を消失させる根治的治療法は存在せず、レニン・アンジオテンシン系阻害剤などの間接的治療にとどまっている。これまでの研究は、HEK293, Hela といった汎用性の高い株化細胞系を利用したタンパク質の過剰発現系による解析が主流であったため、タンパク質の異常蓄積による非生理的条件の副作用が排除できず、適切な実験系が存在していない。また、腎臓のネフロン構造や糸球体の濾過膜形成能もないため目的タンパク質の動態と病態との関連を直接解析することができなかった。

2. 研究の目的

申請者は、先天性ネフローゼ患者由来の iPS 細胞から糸球体を誘導することによって、濾過膜を含む初期病態を再現し、ネフリンの膜移行障害が疾患原因であることを証明した (Tanigawa et al. Stem Cell Reports, 2018)。そこで本計画では、腎臓の構造と糸球体濾過膜を再構築できる唯一の実験系である腎臓オルガノイド誘導法を基盤にして、ネフリンタンパク質の動態メカニズムを解明するとともに、スリット膜の形成及び再生を促進するシグナル・化合物の同定を目的とした。

3. 研究の方法

ヒト iPS 由来腎臓オルガノイドを用いて、糸球体ができる間にネフリンがどのような機構を経て成熟し膜に移行するのかをウエスタンブロッティングにより膜移行型ネフリンを指標として化合物を探索する。

4. 研究成果

膜移行型ネフリンを誘導する候補化合物の同定

翻訳されたネフリンタンパク質は N-結合型糖鎖修飾を受け成熟化することが膜移行と濾過機能に重要であるが、変異ネフリンは小胞体の品質管理機構による制御を受け細胞内に留まり膜移行できず、濾過膜を形成できない。実際に腎臓オルガノイドの系を用いて先天性ネフローゼ患者由来の iPS 細胞から糸球体を誘導することにより、健常由来 iPS の糸球体には濾過膜を形成するネフリンが細胞間と基底に発現するが、患者由来では細胞内にネフリンが留まることを見出した。(図 1A) (Tanigawa et al. Stem Cell Reports, 2018)。さらに、過剰発現系による研究で報告されていた膜移行型のネフリン変異 (R460Q) と同一のミスセンス変異を有する患者由来の iPS 細胞から誘導した糸球体ではネフリンの膜局在化は見られず、過剰発現培養系との結果に乖離があった。これにより、ネフリンが膜に移行しないことが患者由来の組織における共通の症状であることを明らかにした (Ohmori, Tanigawa, Sci Rep, 2021)。

このネフリンの動態は判定量的に WB で評価できる。患者由来 iPS (E725D) の腎臓オルガノイドのネフリンは、高マンノースの小胞体局在型として WB により 1 本のバンド (下バンド) として検出される (図 1B)。これに対し、ミスセンスを遺伝子編集によって修復したオルガノイドでは、複合型糖鎖修飾を受けた高分子 (上バンド) のネフリンを含む二本のバンドが検出され、健常の iPS 由来腎臓オルガノイドにおけるネフリンの発現パターンと一致する (図 1B)。

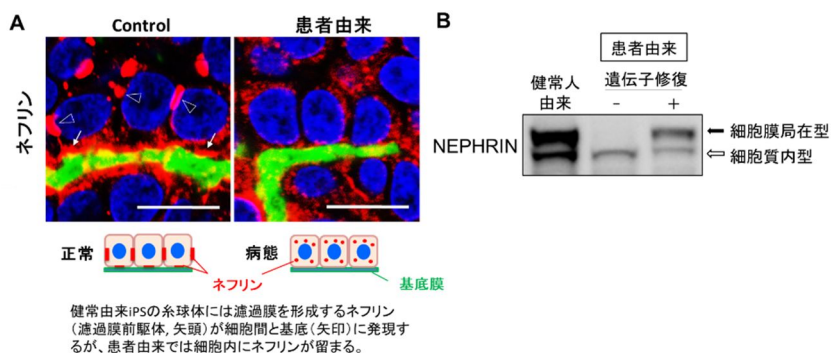


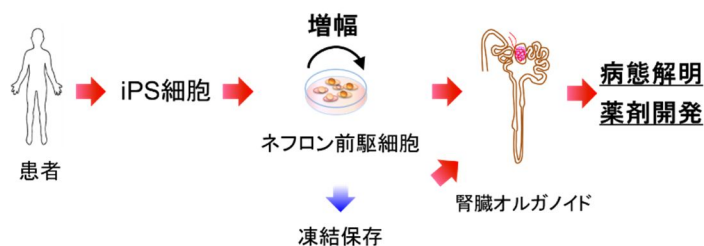
図1. 患者iPS由来の糸球体におけるネフリンの膜移行障害

この膜移行型（上バンド）の誘導を指標に化合物を処理した腎臓オルガノイドを、WBによりネフリンを検出し、膜移行型のネフリンを誘導する化合物を同定した(未発表)。また、効果は弱いが同様の傾向を示す化合物もあるため濃度や時間の調節が今後必要である。また異なる化合物の組み合わせによる相乗効果の検証も必要である。今後は、これらの解析によりどの経路の活性化及び相互作用がネフリンの安定化に重要であるかを見出し、膜移行の最適条件を決定する。

今後の展開

本計画において、ネフリンの膜局在化を促進するいくつかの候補化合物を得ることができたため今後は候補化合物の組み合わせや、類似化合物による効果スクリーニングによって絞り込み、将来的には変異したネフリンを矯正する化合物に応用することが必要である。それには糸球体の濾過膜や尿細管を形成する能力を有する大量の細胞が必要である。申請者は本研究期間にヒト iPS 由来ネフロン前駆細胞の増幅方法も報告しており (Tanigawa et al., *Stem Cell Reports*, 2019)、理論上、増幅した患者由来のオルガノイドを用いたスクリーニング系の確立が可能である (図 2)。本研究成果を今後さらに発展させるためにタンパク質動態と腎臓の構造、病態を再現できる独自のシステムを駆使し、最終的には患者由来腎臓オルガノイドにおけるスリット膜の形成さらに濾過機能を修復する薬剤開発に発展させたい。

ヒトiPS細胞由来ネフロン前駆細胞の 再生医療に向けた基盤構築



Tanigawa et al., *Stem Cell Reports* 2018
Tanigawa et al., *Stem Cell Reports* 2019

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ohmori Tomoko, De Shankhajit, Tanigawa Shunsuke, Miike Koichiro, Islam Mazharul, Soga Minami, Era Takumi, Shiona Shinichi, Nakanishi Koichi, Nakazato Hitoshi, Nishinakamura Ryuichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Impaired NEPHRIN localization in kidney organoids derived from nephrotic patient iPS cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83501-9	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 Tanigawa S, Naganuma H, Kaku Y, Era T, Sakuma T, Yamamoto T, Taguchi A, Nishinakamura R.	4. 巻 13
2. 論文標題 Activin Is Superior to BMP7 for Efficient Maintenance of Human iPSC-Derived Nephron Progenitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 322-337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2019.07.003.	査読の有無 有
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6件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷川俊祐、西中村隆一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来腎臓ネフロン前駆細胞の増幅培養法の確立と病態再現
3. 学会等名 第44回分子生物学会 ワークショップ「新たな国民病、慢性腎臓病の病態を分子生物学的に解明する」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷川俊祐、西中村隆一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来腎臓ネフロン前駆細胞の増幅培養法確立と病態再現
3. 学会等名 第51回日本腎臓学会西部学術総会 シンポジウム「腎構成細胞と多臓器連関」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷川俊祐、長沼英和、Mazharul Islam、賀来祐介、太口敦博、西中村隆一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来腎臓ネフロン前駆細胞の増幅培養法の確立と病態再現
3. 学会等名 第43回分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷川俊祐、西中村隆一
2. 発表標題 患者由来iPS細胞による先天性ネフローゼ症候群の病態再現
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷川俊祐、西中村隆一
2. 発表標題 患者由来iPS細胞による先天性小児腎臓病の病態再現
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷川俊祐、西中村隆一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来腎臓ネフロン前駆細胞の増幅培養法の確立とその応用
3. 学会等名 第42回分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

アクチビンはBMP7よりも効率良くヒトiPS細胞由来腎臓ネフロン前駆細胞を増幅できる
<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/np102/>

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	西中村 隆一 (Nishinakamura Ryuichi) (70291309)	熊本大学・発生医学研究所・教授 (17401)	

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