

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17699

研究課題名(和文)腎臓オルガノイド上でのForward Geneticsによる慢性腎臓病機序の解析

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism of chronic kidney disease by forward genetics on kidney organoids

研究代表者

須佐 紘一郎(SUSA, Koichiro)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病は新たな国民病とも言える疾患だが、その機序はまだ不明な点が多く、根本的な治療法も未開発である。我々は慢性腎臓病における間質線維化の増悪因子として働く未知の修飾遺伝子が存在するのではないかと仮説を立てた。そこで、iPS細胞から分化誘導して作製した「腎臓オルガノイド」と呼ばれるミニチュア腎臓を利用して、そのような修飾遺伝子を同定することを目指している。本研究では、線維化の解析に用いるためにまず腎臓線維化を起こす遺伝性腎疾患の原因遺伝子をノックアウトしたiPS細胞を作製し、線維化領域を可視化できるようなレポーターも作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓線維化の増悪因子を見つけるのに利用するため、線維化を起こす遺伝性腎疾患と同じ変異を持つiPS細胞を作製した。また、線維化レポーターも作製し、線維化した領域を蛍光発色して可視化できるような仕組みをiPS細胞の内部に組み込んだ。これらの成果物を腎臓オルガノイドと組み合わせることにより、今後腎臓オルガノイド上での腎臓線維化の可視化をする実験の実現可能性を示したことになる。さらに、腎臓線維化を増悪させる修飾遺伝子を同定し、最終的には慢性腎臓病の治療法開発につなげたい。

研究成果の概要(英文)：CKD is a national disease in Japan, however, the drastic treatment of CKD has not been established due to lack of systematic elucidation of CKD mechanism. We have hypothesized that some unidentified modifier genes play a role to aggravates fibrosis on CKD. Our purpose is identification of those modifier genes using kidney organoids, which are differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSCs). In this study, we notice NPHP1, which is a causative gene which induces fibrosis in stromal tissues of the kidney. Initially we generated mutant iPSCs with genetically fibrotic phenotype to utilize for screening of modifier genes. In addition, we prepared reporters to visualize fibrotic lesions.

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(modifier gene) forward genetics 慢性腎臓病(CKD) 常染色体優性多発性嚢胞腎

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CKD 患者は日本に 1300 万人以上存在し、しかも高齢化に伴い患者数は年々増加している。CKD における腎機能低下は、糸球体病変ではなく、「間質の線維化」や「尿細管拡張・嚢胞形成」などの尿細管間質病変の程度とよく相関することが知られている。注目すべきは、CKD の原疾患は多様であるにも関わらず、ある程度進行すると、原疾患の種類によらず同じように間質線維化が不可逆的に進展していく点である。従って、CKD の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るが、その鍵となる分子が不明であり、根本治療が存在しない。

CKD の機序を解明するに際し、「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」の存在が疑われる。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、小児期から重篤な腎障害を示す症例から一生透析導入不要な症例まで、重症度や表現型が全く異なるケースがある。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、epigenetic な変化など、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、何らかの修飾遺伝子(modifier gene)が関与してい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遺伝子が、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マウスを作製するしかないため、非現実的であった。

近年、iPS 細胞に代表されるヒト多能性幹細胞を各臓器に分化誘導する技術が急速に進歩し、径 1mm ほどの細胞塊の内部に腎臓類似組織を擁する「腎臓オルガノイド」の作製も可能となった(Nat Biotech., 2015)。腎臓オルガノイドは、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し、in vitro でありながら成熟腎臓における現象を観察できる革新的な病態解析モデルである。この利用により、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るために頓挫していた問題を解決できる可能性が現実味を帯びてきた。

2. 研究の目的

研究の目的は、腎臓オルガノイドを用いた新規スクリーニング法を開発し、CKD の進行に強く影響する因子である modifier gene を明らかにすることである。この尿細管間質障害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。しかし、腎臓の線維化は他臓器と異なった機序を有すると考えられるため、このアプローチには限界があり、依然として線維化の責任分子は明らかとなっていない。従って、新しいスクリーニング法が必要であると考えられる。しかし、動物モデルを用いたスクリーニングでは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や、三次元構造の表現型である嚢胞形成を、単純かつ単一の培養細胞で再現することも不可能であった。

そこで本研究では、まず腎臓オルガノイドを用いた新規スクリーニング法の開発を目指す。さらに、本研究の波及効果として、間質線維化進行を制御する責任分子、modifier gene を同定できれば、これらを治療ターゲットとした新規治療法の開発につながり、創造性・応用性も大きいと考えている。

3. 研究の方法

1: 尿細管間質障害を起こす遺伝性腎疾患の患者由来 iPS 細胞樹立と腎臓オルガノイド作成:

間質線維化を呈する遺伝性腎疾患の原因遺伝子に変異を持つ iPS 細胞の樹立。iPS 細胞の樹立は、血液検体から分離した単核球に対し、センダイウイルスベクターを用いて初期化して行う。この iPS 細胞については、線維化の責任分子や modifier gene のスクリーニングに使用するため、レンチウイルスベクターにより I 型コラーゲン/ α -SMA/fibronectin プロモーターで蛍光発色するレポーターを組み込み、腎線維化を可視化できるようにしておく。

作製した iPS 細胞は、SIX2 陽性ネフロン前駆細胞への高効率な分化誘導を介して、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オルガノイドに分化誘導する。

2: 尿細管間質病変を起こす遺伝性腎疾患患者由来腎臓オルガノイドを用いた、CKD 進行を制御する因子の候補を選定する新規スクリーニング:

間質線維化に寄与する modifier gene 同定を目的とした新規スクリーニング法の開発。スクリーニングにはレンチウイルスを用いることとし、まず、オルガノイドにおけるレンチウイルス

の感染能について、GFP 搭載レンチウイルスベクターにより事前に評価を行う。レンチウイルス感染能に問題がないことを確認出来たら、項目 1 で作製した間質線維化を起こす遺伝性腎疾患の患者由来腎臓オルガノイドに対し、レンチウイルスベクター・CRISPR-Cas9 システムにより遺伝子改変を行う。線維化責任分子や modifier gene が遺伝子改変された細胞は線維化亢進により蛍光発色するため、FACS sorting で選別し、そこ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分子候補を得る。

3：浮上した候補遺伝子が尿管間質病変進行に関わる真の modifier gene であるかどうかの検証：

上記の間質線維化を起こす遺伝性腎疾患の患者由来 iPS 細胞に対して、項目 2 で得られた modifier gene 候補遺伝子をゲノム編集し、そこから腎臓オルガノイドを作成して間質線維化や嚢胞形成を再現できるか評価することにより、候補分子の病態への関与を検証する。

4．研究成果

尿管間質病変を呈する遺伝性腎疾患の原因遺伝子に変異を持つ iPS 細胞の樹立だが、当初計画では我々が持つ遺伝性腎疾患患者レジストリ内の患者検体から樹立することとしていた。この方法では複数の由来を持つ iPS 細胞同士の形質を比較することとなるが、その場合はそれぞれの株固有の background の影響を強く受けることになり、検出された差異が遺伝子変異による直接的な影響なのか、それとも単なる background の違いに起因するものかの特定が困難である可能性が浮上してきた。そのため、患者から樹立するのではなく、健常者由来 iPS 細胞をまず入手し、それを CRISPR-Cas9 システムにより遺伝子改変して樹立する方針に変更した。健常者由来 iPS 細胞は、京都大学 iPS 研究所樹立株の購入及び、センダイウイルスベクターを使用した健常ボランティアからの樹立により入手した。

次に、当該の遺伝子変異(NPHP1 ノックアウト)を持つ iPS 細胞の作製を行った。実際の患者ではヘテロ接合型の変異では発症しないため、ホモ接合型のノックアウトを行うこととした。まずヘテロノックアウトを作製し、それをさらにノックアウトしてホモ接合型のノックアウトを作製するという二段階の作業が必要となり、概ね完成に近づいているが、現在は核型異常が発生していないか等、品質検査を施行している段階である。また、NPHP1 変異の組織学的な表現型の解析も行った(Kidney International Reports, 2021)。

腎臓オルガノイドを実際の病態解析に使用できるかどうかの検証として、腎毒性のある薬剤を投与してヒト成熟腎臓に類似した障害を観察できることも示した(米国腎臓学会にて学会発表、2018)。並行して、腎臓オルガノイド内部の細胞に対してレンチウイルスの感染が可能かどうかにも検討した。当初はオルガノイドの外周を構成する細胞間隙をベクターが透過せず、外周の細胞にしか変異導入させることができなかつたため、改良のための検討を施行し、最終的には内部の細胞全体にレンチウイルスベクターを感染させる手法を確立した。

また、レンチウイルスベクターにより I 型コラーゲン/ α 1(SMA) プロモーターで蛍光発色するレポーターを作製し、一部は完成した。

これらの成果により、CKD 進行を制御する因子の候補を選定するスクリーニングを進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Fujimaru Takuya, Koichiro Susa, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Genetic Background and Clinicopathologic Features of Adult-onset Nephronophthisis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney International Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ekir.2021.02.005	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koichiro Susa, et al.
2. 発表標題 A Drug-Specific Nephrotoxicity Prediction System Using Kidney Organoids
3. 学会等名 The 52nd Annual Meeting of American Society of Nephrology（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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