

# 日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業 事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝性腎疾患の病態解明拠点  
(英語) Elucidation of the pathogenesis of inherited renal diseases using patient-derived iPS cells

研究開発実施期間: 平成 29 年 8 月 29 日～令和 5 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 西中村 隆一  
(英語) NISHINAKAMURA Ryuichi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 熊本大学・発生医学研究所・教授  
(英語) Kumamoto University, Institute of Molecular Genetics, Professor

## II 研究開発の概要

### 研究の背景

これまでの腎疾患研究は培養細胞あるいはマウスモデルに頼ってきたが、必ずしも病態を反映したものではなかった。例えば頻用される不死化ポドサイト細胞株における濾過膜蛋白の発現は本来の 1,000 分の 1 以下である。我々は世界に先駆けてヒト iPS 細胞から腎臓の 3 次元構造を試験管内で誘導することに成功した (Mae et al. Nat Commun 2013, Taguchi et al. Cell Stem Cell 2014)。さらにマウスへの移植によってヒト iPS 細胞由来の糸球体が血管と接続することを示し (Sharmin et al. J Am Soc Nephrol 2016)、ネフロン前駆細胞の増幅にも成功した (Tanigawa et al. Cell Rep 2016)。これらの成果によって、入手が極めて困難なヒト胎児の腎臓組織に相当するものが容易かつ頻回に回収できるようになった。本計画は、これらの研究を先導してきた 2 つの研究機関 (熊本大学と京都大学) が協力体制を組むことで、遺伝性腎疾患由来の iPS 細胞を使った疾患メカニズムの解明拠点を形成するものである。

### 研究の目的

Finland 型先天性ネフローゼ症候群は、糸球体濾過膜を構成するネフリンの変異によって、出生時から激しい蛋白尿を呈し数年で腎不全に陥る常染色体劣性の遺伝性糸球体疾患である。常染色体顕性多発性嚢胞腎は膜タンパク質 PKD1/PKD2 の変異によって尿細管・集合管が拡張して嚢胞を形成する疾患であり、腎不全に至る遺伝性疾患の中で最も頻度が高い。アルポート症候群は糸球体基底膜 IV 型コラーゲン (COL4A3/4/5) の変異によって腎

不全を呈する主に X 染色体連鎖型の遺伝病である。本研究の目的は、これら 3 つの遺伝性腎疾患由来のヒト iPS 細胞から腎臓組織を誘導して発症初期の病態を再現し、疾患のメカニズムを解明して創薬に向けた研究拠点を形成することである。具体的には

- 1) 先天性ネフローゼ症候群症例を熊本大学が中心となって集積し、iPS 細胞を樹立する体制を整備する。そこから糸球体を誘導し、蛋白濾過を司るポドサイトの異常を再現する。そして変異の違いによるポドサイト形成への影響と発症メカニズムを解明する。
- 2) 多発性嚢胞腎に関しては京都大学が iPS 細胞を樹立済みであり、情報を熊本大学と共有して誘導法の最適化を図りつつ、病態を解明する。
- 3) アルポート症候群は熊本大学が中心となって病態を解明しつつ、異常を回復させる薬剤を探索する。

## 研究成果

熊本大学のグループは、Finland 型先天性ネフローゼ症候群を呈する複数の患者由来の iPS 細胞から腎オルガノイドを誘導し、糸球体ポドサイトにおけるネフリンの細胞膜移行と濾過膜形成の異常を同定した。そして、これらの異常を修復できる化合物を探索した。多発性嚢胞腎に関しては、熊本大学と京都大学が協力して、患者由来 iPS 細胞およびゲノム編集によって作製した PKD1 欠損 iPS 細胞から尿細管と集合管での嚢胞の再現に成功した。これらを用いて嚢胞形成を抑制できる化合物を同定した。アルポート症候群患者由来の iPS 細胞からも腎オルガノイドを誘導し、変異タンパク質の発現異常を検出した。並行してコラーゲンの 3 量体形成・細胞外分泌能を基盤とした 2 次元スクリーニング系を用いて、変異により低下した活性を改善する化合物を同定した。

### 1. Finland 型先天性ネフローゼ症候群

糸球体濾過膜の構成分子であるネフリンの点変異をもつ先天性ネフローゼ症候群の患者から iPS 細胞を樹立し、ネフロン前駆細胞を経由して糸球体を含むネフロンオルガノイドを誘導した。これによって本疾患の初期病態を再現することに成功した。患者 iPS 細胞からは濾過膜前駆体の形成が見られず、細胞膜に移行すべきネフリンの発現は減弱し細胞質内に留まっていた。免疫不全マウスへの移植によって正常では濾過膜の形成が進むのに対して、患者由来ではそれが起きなかった。さらに点変異をゲノム編集によって矯正したところ、これらの症状が消失したため、この変異が疾患の原因であることが確定した。つまり、点変異によってネフリンが糸球体ポドサイトの膜上まで移行できないため、濾過膜が形成されず蛋白尿を発症することが明らかになった (Tanigawa et al. Stem Cell Reports 2018)。さらにネフリンの別の部位に点変異を持つ患者あるいはネフリンを完全に欠損する患者それぞれ 1 名からも iPS 細胞を樹立し、同様の病態を再現した (Ohmori et al. Sci Rep 2021)。この 2 名からの iPS 細胞 4 株は RIKEN Bio Resource Center に寄託した。並行して、iPS 細胞から糸球体ポドサイトを高効率 (90%以上の純度) に誘導する方法 (Yoshimura et al. J Am Soc Nephrol 2019)、iPS 細胞から誘導したネフロン前駆細胞を増幅して凍結できる方法を開発した (Tanigawa et al. Stem Cell Reports 2019)。これらの技術を疾患特異的 iPS 細胞由来腎臓オルガノイドに適用して、変異ネフリンの局在異常を回復させる化合物のスクリーニング系構築を行った。化合物は分担研究者の京都大学・中畑、布施が供給した。また並行して、分担研究者の熊本大学・甲斐がタグ付きの変異ネフリンを過剰発現させた培養細胞を用いた 2 次元でのスクリーニングを行った。これらの過程で得た化合物の効果を検証中である。

### 2. 常染色体顕性多発性嚢胞腎

多発性嚢胞腎では、尿細管に加えて集合管から高頻度に腎嚢胞が形成される。我々は集合管の前駆細胞である尿管芽を iPS 細胞から誘導するプロトコールを報告しており (Taguchi et al. Cell Stem Cell 2017)、この誘導法を常染色体優性多発性嚢胞腎の病態再現に応用した。CRISPR/Cas9 法を使って原因遺伝子である PKD1 のノックアウト iPS 細胞を樹立し、尿管芽あるいはネフロン (糸球体+尿細管) に誘導して、cAMP 刺激剤を加えたところ、どちらも嚢胞を形成した (Kuraoka et al. J Am Soc Nephrol 2020)。前者は尿管芽/集合管の茎部 (stalk) の、後者は近位尿細管の拡張が主体であり、両方の細胞系譜が多発性嚢胞腎の病態に関与していることが示された。さらに

PKD1 を欠失する尿管芽にバソプレシンを投与しても嚢胞が形成された。またヘテロ欠失 iPS 細胞あるいは点変異を持つヘテロ患者由来の iPS 細胞から誘導した尿管芽でも、低頻度ながら嚢胞形成が観察された。バソプレシンへの反応性と患者由来 iPS 細胞での嚢胞再現は本報告が初めてである。さらに分担研究者の京都大学・長船らが嚢胞形成頻度を向上させる方法を開発し、それを抑制できる化合物候補も同定した。これらの成果は、現在臨床で使用されているバソプレシン受容体阻害剤を超える薬剤同定に向けた基盤となることが期待される。

### 3. アルポート症候群

原因遺伝子である COL4A5 に点変異を持つ患者由来の iPS 細胞からネフロンオルガノイドを誘導した。ネフリン等糸球体濾過膜の形成には異常は認められなかったが、糸球体基底膜での COL4A5 発現低下を確認した。並行して、分担研究者の熊本大学・甲斐らは COL4A タンパク質にタグをつけてその細胞外への分泌を検出できる 2 次元スクリーニング系を確立した (Omachi et al. Cell Chem Biol 2018)。これは COL4A3/4/5 が三量体を形成して初めて分泌されることを利用した発光システムである。さらに患者に見られる様々な変異を導入することによって、患者の重症度と移行能が相関することも見出した (Kamura et al. Kidney Int Rep 2020)。この系を使って天然化合物ライブラリーをスクリーニングすることで複数のヒット化合物を得た。これを腎臓オルガノイドに添加したが、明確な効果は認められなかったため、化合物ライブラリーを用いた 2 次元スクリーニングを続行しつつ、同じ原理を用いた 3 次元スクリーニング系の確立を目指している。加えて、本疾患の原因遺伝子である COL4A3/4/5 は、現行の腎臓オルガノイドの未熟さの良い指標であることが我々の研究から明らかになった (Yoshimura et al. J Am Soc Nephrol 2019)。よって COL4A3/4/5 が増加するような培養法・移植法の改善を行っている。これはオルガノイドの成熟法につながり、それが進むほど本疾患の病態再現が正確になるとともに、より多くの疾患が解析対象となることが期待される。

### 意義・今後の展開

常染色体顕性多発性嚢胞腎は腎不全に至る最も頻度が高い遺伝性疾患であり、その治療薬候補の同定には大きな意義がある。特に、バソプレシン受容体阻害剤を超える薬剤同定に向けた基盤となることが期待される。糸球体ポドサイトの疾患である先天性ネフローゼ症候群とアルポート症候群はその頻度は低いものの、遺伝性に限らず多くの腎疾患が糸球体障害による蛋白尿の出現から始まること、アルポート症候群の原因遺伝子の一つである COL4A3 が成人の糖尿病性腎症の risk factor になっている。よって、これら 2 疾患の病態を解明して薬剤開発の基盤を作ることは、難病の治療に留まらず、腎臓の濾過機能を直接改善する薬剤の開発、ひいては腎不全予防に繋がる可能性がある。

### Research Background

Previous studies of kidney disease have relied on cultured cells or mouse models that do not necessarily reflect the pathophysiology of the disease. For example, the expression of filtration slit proteins in commonly used immortalized podocyte cell lines is less than 1/1000 of the original level. We were among the first to successfully induce 3D kidney structures from human iPS cells in vitro (Mae et al. Nat Commun 2013, Taguchi et al. Cell Stem Cell 2014). We have also shown that human iPS cell-derived glomeruli connect to blood vessels by transplantation into mice (Sharmin et al. J Am Soc Nephrol 2016) and also successfully expanded nephron progenitors (Tanigawa et al. Cell Rep 2016). This project will establish a center for the elucidation of disease mechanisms using iPS cells derived from hereditary kidney disease by creating a collaborative framework between two research institutions (Kumamoto University and Kyoto University) that have led these studies.

### Research Aims

Finnish-type congenital nephrotic syndrome is an autosomal recessive glomerular disease characterized by severe proteinuria from birth and renal failure within a few years due to mutations in NEPHRIN, a component of the glomerular filtration slits. Autosomal dominant polycystic kidney disease, in which mutations in the membrane proteins PKD1 and PKD2 cause dilation

of the tubules and collecting ducts to dilate and form cysts, is the most common inherited disease leading to kidney failure. Alport syndrome is an X-chromosome-linked inherited disease caused by mutations in glomerular basement membrane collagen type IV (COL4A3/4/5) leading to renal failure. The purpose of this study is to induce kidney organoids from human iPS cells derived from these three inherited kidney diseases to recapitulate the early pathogenesis of the diseases and to elucidate the disease mechanisms for drug discovery.

## Results

### 1. Finnish-type congenital nephrotic syndrome

We established iPS cells from a patient with congenital nephrotic syndrome who has a point mutation in NEPHRIN, a component of the glomerular filtration slit, and induced nephron organoids including glomeruli via nephron progenitors. This successfully recapitulated the original pathology of the disease. Patient iPS cells did not show formation of filtration slit precursors, and the expression of NEPHRIN, which should be translocated to the plasma membrane, was attenuated and remained in the cytoplasm. Transplantation into immunocompromised mice resulted in the formation of filtration slits in normal podocytes, but not in patient-derived cells. Further correction of the point mutation by genome editing eliminated these symptoms, confirming that this mutation was the cause of the disease. Thus, the point mutation prevents NEPHRIN from translocating to the membrane of glomerular podocytes, resulting in impaired filtration slit formation and proteinuria (Tanigawa et al. *Stem Cell Reports* 2018). We also established iPS cells from a patient with a point mutation at different position of NEPHRIN and a patient with a complete loss of NEPHRIN, and recapitulated the same pathology (Ohmori et al. *Sci Rep* 2021). Four iPS cell lines from these two patients were deposited at the RIKEN Bio Resource Center. In parallel, we developed a method for highly efficient (>90% purity) induction of glomerular podocytes from iPS cells (Yoshimura et al. *J Am Soc Nephrol* 2019) and a method to expand and freeze nephron progenitors derived from iPS cells (Tanigawa et al. *Stem Cell Reports* 2019). We applied these technologies to disease-specific iPS cell-derived kidney organoids to construct a screening system for compounds that restore the abnormal localization of mutant NEPHRIN. In parallel, a two-dimensional screening was performed using cultured cells overexpressing tagged mutant NEPHRIN. The effects of the compounds obtained in these experiments are now being verified.

### 2. Autosomal dominant polycystic kidney disease

In polycystic kidney disease, renal cysts are often formed from the collecting ducts in addition to the tubules. We have reported a protocol to induce ureteric buds, the progenitors of collecting ducts, from iPS cells (Taguchi et al. *Cell Stem Cell* 2017), and applied this induction method to recapitulate the pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. We treated the induced ureteric buds or nephrons (glomeruli + tubules) with cAMP activators, both of which formed cysts (Kuraoka et al. *J Am Soc Nephrol* 2020): the former consisting predominantly of dilatation of the ureteric bud/stalk and the latter consisting of dilation of the proximal tubules. Furthermore, vasopressin treatment of ureteric buds lacking PKD1 also resulted in cyst formation. Cyst formation was also observed in ureteric buds derived from heterozygous deletion iPS cells or iPS cells derived from heterozygous patients with point mutations. This is the first report of vasopressin responsiveness and cyst formation in patient-derived iPS cells. In addition, we developed a method to increase the frequency of cyst formation and identified a candidate compound that can inhibit cyst formation. These results are expected to provide a basis for identifying drugs beyond the vasopressin receptor inhibitors currently used in clinical practice.

### 3. Alport syndrome

Nephron organoids were generated from patient-derived iPS cells carrying a point mutation in COL4A5, the causative gene. Although no abnormality in the formation of glomerular filtration slits such as NEPHRIN was observed, decreased COL4A5 expression in the glomerular basement membrane was confirmed. In parallel, we established a two-dimensional screening system capable of detecting the extracellular secretion of tagged COL4A proteins (Omachi et al. *Cell Chem Biol* 2018). This luminescence system exploits the finding that COL4A3/4/5 is secreted only after forming a trimer. By introducing various mutations found in patients, we also found that the secretion capacity correlates with the severity of the symptom (Kamura et al. *Kidney Int Rep* 2020). We used this system to screen a library of natural products, and obtained several hits. These were

added to kidney organoids, but no clear effect was observed, so we are continuing the two-dimensional screening using the chemical compound library. We also aim to establish a three-dimensional screening system based on the same principle. In addition, our study showed that COL4A3/4/5, the causative gene of this disease, is a good indicator of current immaturity of kidney organoids (Yoshimura et al. J Am Soc Nephrol 2019). Therefore, we are improving culture and transplantation methods to increase COL4A3/4/5. This will lead to organoid maturation, and the more this progresses, the more accurately the pathogenesis of this disease will be reproduced and the more diseases will be analyzed.