

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
(幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) iPS 細胞由来腎集合管嚢胞モデルを用いた ADPKD に対する新規治療薬の探索
(英 語) Development of novel therapeutic compounds for ADPKD using iPS cell-derived renal collecting duct cystogenesis model

研究開発実施期間: 令和 3 年 6 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 前 伸一
(英 語) Shin-Ichi Mae

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人京都大学・iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門・特定拠点講師
(英 語) Kyoto University・Dept. of Cell Growth and Differentiation, Center for iPS Cell Research and Application・Program-Specific Research Center Junior Associate Professor

II 研究開発の概要

常染色体優性(顕性)多発性嚢胞腎(ADPKD)は進行性に多数の腎嚢胞が形成されることにより腎腫大が生じ、末期慢性腎不全に至る難治性疾患である。ADPKD 患者総数は本邦約 3 万人、欧州約 20 万人、米国約 12 万人で、末期腎疾患患者の 5～10%を占めている。また、遺伝性の疾患の中でも発症頻度が高く、約 4,000 人に 1 人が発症すると推定されている。従来、マウスなどのモデル動物を用いた研究が行われてきたが、ヒトにおける腎嚢胞形成機序は依然として未解明であるため、根治療法も未開発のままである。患者には透析療法や対症療法が施されているのが現状であるが、本邦において透析療法を必要とする末期慢性腎不全患者は 33 万人以上となり、毎年 1 万人ずつ増加していることから、透析医療費は年間 1 兆 5,000 億円を超え、全医療費の約 5%を占めるに至っている。さらに、唯一の根治療法である腎移植も年間 1,700 例程度に留まり、依然としてドナー不足は深刻な問題である。

ADPKD の腎嚢胞は糸球体や尿細管で構成されるネフロンからも形成されるが、大部分は集合管に由来する。これまでのところ、ADPKD の原因遺伝子である *PKD1* をノックアウトした iPS 細胞から集合管を派生させる尿管芽オルガノイドに対し、forskolin 刺激を加えることによって嚢胞形成を行ったことが報告されている(Kuraoka S., 2020)。しかし、forskolin 刺激で強制的かつ低効率で嚢胞形成を行うことが実際の病態を反映しているか否かは不明である。より正確に病態を再現するためには、患者と同様に自発的な嚢胞形成が起こり、かつ ADPKD に対する唯一の承認薬である tolvaptan による嚢胞サイズの増大抑制効果を認めるモデルを作製することが求めら

れている。そして、ヒト細胞を用いた ADPKD の腎嚢胞形成を再現する病態モデルを作製することにより、新規の医薬品や医療技術を開発し、医学的および医療経済的な問題を解決することが望まれている。そこで、①ヒト iPS 細胞から自発的に腎集合管嚢胞を形成する病態モデルの開発、②ADPKD 患者由来 iPS 細胞を用いた腎嚢胞の作製、③ADPKD の腎嚢胞形成を抑制する化合物の同定を達成することを目標に掲げ、本研究開発を実施した。

① ヒト iPS 細胞から自発的に腎集合管嚢胞を形成する病態モデルの開発

まず、ヒト iPS 細胞から分化誘導した尿管芽オルガノイドを単一の細胞にまで解離し、尿管芽先端部 (tip) 細胞を選択的に増殖させることで尿管芽 tip 細胞コロニーを作製し、そこから尿管芽オルガノイドを再生後、集合管オルガノイドへ誘導する方法を開発した。次に、尿管芽 tip 細胞の拡大培養には内在性の TGFb シグナルを抑制することが重要であることを突き止め、長期間に渡る拡大培養を可能にした。さらに、拡大培養によって尿管芽 tip 細胞の発生分化段階が進むことを明らかにし、腎発生後期の集合管オルガノイドを作製することに成功した。その方法を応用することで *PKDI* ホモ変異 iPS 細胞から自発的な嚢胞形成というクライテリアを満たす病態モデルを開発し、100%の集合管オルガノイドで多発性に嚢胞を形成させることにも成功した。

PKDI ホモ変異 iPS 細胞から作製した嚢胞を含む腎集合管オルガノイドにおけるシングルセル RNA シークエンシングを行い、擬似系譜解析によって嚢胞形成に伴って *SOX2* や *HNF4A* などの嚢胞関連遺伝子の発現を認めることを明らかにした。また、これまでに報告のない嚢胞増大に伴って発現上昇する複数の遺伝子を新たに見出した。そこで、siRNA 技術を用いてそれらの遺伝子発現をノックダウンしたところ、嚢胞増大が有意に抑制されることが分かった。

② ADPKD 患者由来 iPS 細胞を用いた腎嚢胞の作製

すでに樹立されている 3 株の ADPKD 患者由来 iPS 細胞 (Ameku T., 2016) から腎発生後期の集合管オルガノイドを作製したところ、形成頻度は低いが、1 株において嚢胞形成を認めた。さらに、患者由来 iPS 細胞および *PKDI* ホモ変異 iPS 細胞から作製した尿管芽 tip 細胞を共培養しながら拡大培養を行い、集合管オルガノイドを作製したところ、キメラの嚢胞が形成されたことから、嚢胞細胞は性質が似通っていることが考えられる。また、嚢胞形成を認めた iPS 細胞株は早い時期から透析導入となった重症度の高い ADPKD 患者由来であったことから、開発した *in vitro* 嚢胞モデルは ADPKD の重症度に関わる要因を探索することに応用することが期待される。そこで、嚢胞形成を認めた ADPKD 患者と同じ *PKDI* 遺伝子変異をヘテロもしくはホモで有する iPS 細胞株を CRISPR/Cas9 による遺伝子編集技術を用いて樹立した。樹立した *PKDI* ヘテロおよびホモ変異 iPS 細胞株から腎発生後期の集合管オルガノイドを作製したところ、ヘテロ変異株からはほとんど嚢胞形成が認められなかった。一方で、ホモ変異株からは高効率に嚢胞形成を認めたことから、両アレルにおける *PKDI* 遺伝子変異が ADPKD の嚢胞形成に大きくかかわっていると考えられる。さらに、嚢胞を含む集合管オルガノイドにおいてシングルセル RNA シークエンシングを実施したところ、*PKDI* ヘテロおよびホモ変異 iPS 細胞株から形成される嚢胞には大きな違いは認められず、これまでのところ嚢胞形成機序の違いを見出すことができていない。

③ ADPKD の腎嚢胞形成を抑制する化合物の同定

腎集合管オルガノイドには大きさの違う嚢胞が多数形成され、形成される嚢胞数はオルガノイド毎に異なっている。そのため、嚢胞形成や増大を抑制する化合物を探索するためには、それらの違いをできる限り少なくする方法を開発する必要がある。そこで、オルガノイドから嚢胞のみを機械的に切離し、単一の細胞にまで解離し、嚢胞を再生する培養法を開発することにより、その問題点を解決した。さらに、単一の嚢胞細胞を 96 ウェルプレートに播種し、自動分注機を用いた評価化合物の添加タイミングや評価期間、蛍光顕微鏡を用いた嚢胞増大率測定方法の最適化を行うことによって、嚢胞増大抑制化合物のハイスループットスクリーニング (HTS) 系を確立した。確立した HTS 系では、唯一の承認薬である tolvaptan, bardoxolone methyl や venglustat などの治験が行われた候補薬について嚢胞増大抑制効果の評価が可能であったことから、京都大学 iPS 細胞研究所が保有する

1280 種類の既存薬ライブラリーを用いて嚢胞増大抑制化合物を探索した。嚢胞増大抑制効果を認めた化合物について、濃度依存性や細胞毒性を評価し、複数の候補化合物を新たに同定することができたため、現在、嚢胞増大抑制機序について解明を進めている。

また、単一の嚢胞細胞から嚢胞を再生する方法を確立したが、再度、単一の嚢胞細胞にまで解離後に嚢胞形成を行うと細胞増殖が著しく低下することが分かった。そこで、嚢胞細胞の培養条件を改良し、約 1 カ月の継代培養を可能にする方法を開発した。その開発過程において、レチノイン酸受容体 (RAR) 作動薬が嚢胞細胞の増殖を抑えることを新たに見出した。RAR 作動薬によって発現変動する遺伝子を網羅的に探索したところ、RAR 作動薬によって細胞老化関連遺伝子である *CDKN2B* 発現が亢進することが分かった。さらに、嚢胞細胞においてコンディショナルに *CDKN2B* 発現を誘導したところ、嚢胞増大が有意に抑えられたことから、RAR 作動薬は細胞老化関連遺伝子発現を誘導することによって嚢胞細胞の増殖を抑制していると考えられる。また、RAR 作動薬を ADPKD モデルマウスに投与したところ、腎皮質領域での嚢胞形成が抑えられることによって腎臓の腫大が有意に抑制された。そのことによって、腎機能の低下を軽減し、ADPKD の病態進行を抑える治療効果があることも確認した。RAR 作動薬はすでに急性前骨髄球性白血病 (APL) の治療薬として用いられていることから、京都大学発のスタートアップ企業であるリジェネフロ株式会社にライセンスアウトし、iPS 創薬により同定された治療薬候補の国内 6 件目となる前期第 II 相試験を 2023 年 12 月より開始している。

近年、ADPKD に対する治療薬候補は臨床試験において腎機能低下抑制効果が認められず、開発が軒並み中止となっており、アンチセンスオリゴによる治療の安全性を調べる第 I 相試験が行われているのみである。ADPKD は単一の遺伝子異常による疾患として最多のものであるだけでなく、唯一の承認薬である tolvaptan の作用による頻尿や一部で認められる肝毒性などの副作用の問題があり、新たな治療法開発におけるアンメット・メディカルニーズは非常に高い。本研究開発において、これまでに報告がない腎集合管における嚢胞形成を再現する *in vitro* モデルを確立したことにより、新規治療薬の探索だけでなく、治療候補薬の薬効薬理評価、嚢胞形成機序の解明、新規治療標的の探索など幅広い応用が可能となっている。さらに、RAR 作動薬を ADPKD 治療薬候補として新たに同定し、iPS 創薬による国内 6 件目の治験を開始したことにより、オルガノイドの創薬利用の有効性を大いに示すことができたと考えられる。

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) causes the progressive formation of numerous renal cysts, leading to end-stage renal failure that requires renal replacement therapies such as dialysis therapy or kidney transplantation. The total number of ADPKD patients is estimated to be about 31,000 in Japan and over 10 million worldwide. However, the mechanisms of renal cyst formation remain to be elucidated, and curative treatments have not been established. Therefore, the development of novel therapies and medical technologies for ADPKD is a challenge because patients are currently undergoing renal replacement therapy or symptomatic therapy. For the goal, the development of novel disease models that reproduce renal cyst formation in human is required. Although primary cultured cells derived from ADPKD patients are very useful tools in disease research, the access to the patient samples is limited and the phenotypes of primary cells often change after *in vitro* cultures. To establish suitable human disease models, iPS cell technology is a powerful tool because iPS cells can expand forever and differentiate *in vitro* into the injured cell types or tissues including those of kidney.

Cyst formation has been reported by applying forskolin stimulation to ADPKD-specific iPS cell-derived ureteric bud (UB) organoids that develop collecting duct (CD). However, it is unclear whether forskolin stimulation accurately reflects actual pathology of ADPKD. In order to more accurately reproduce the pathology of ADPKD, it is necessary to create a model in which spontaneous cyst formation occurs as in patients and tolvaptan, the only approval drug for ADPKD, is effective in suppression of cyst enlargement. Therefore, we set the following goals: 1) to develop a novel model for spontaneous formation of renal CD cysts from human iPS cells, 2) to generate renal cysts using ADPKD patients-derived iPS cells, and 3) to identify the compounds that suppress cystogenesis in ADPKD.

First, we developed a method to advance the developmental stage by long-term expansion culture of UB tip cells to produce late-stage CD organoids. Next, by applying this method, we developed a model for spontaneous cyst formation from *PKDI* homozygous mutant iPS cells and succeeded in forming multiple cysts in 100% of the CD organoids. We have elucidated the mechanism of cystogenesis by single cell RNA sequencing and gene expression knockdown using siRNA, and established expansion culture method of cyst cells. Then, we attempted cyst formation from three previously established lines of ADPKD patient-derived iPS cell lines and observed cyst formation in one line, although the frequency of cyst formation was low. Therefore, iPS cell lines carrying heterozygous or homozygous *PKDI* mutations, which were the same as those of ADPKD patients who showed cyst formation, were established. The *PKDI* heterozygous and homozygous mutant iPS cell lines were used to generate CD organoids in the late stages of renal development, and the heterozygous mutant lines showed almost no cyst formation. Moreover, we developed a high-throughput screening (HTS) system to identify the compounds that suppress cyst enlargement, and successfully identified the compounds by HTS using the existing drug library. In the process of developing a method for passaging of cyst cells, we found that retinoic acid receptor (RAR) agonists can significantly inhibit cyst enlargement. RAR agonists suppress cyst enlargement by stimulating the expression of cellular senescence markers. RAR agonists administration significantly suppressed renal function decline in ADPKD model mice, confirming its therapeutic effect.

The establishment of an *in vitro* model that reproduces cystogenesis in the CD organoids, which has never been reported before, has opened the door to a wide range of applications, including not only the discovery of new therapeutic compounds, but also drug pharmacology evaluation of therapeutic candidates, elucidation of the mechanism of cyst formation, and discovery of new therapeutic targets.